

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

Die Funktion der ABC-ATPase Rli1p in der Translation

Von

Birgit Märtens

aus

Ruit

2007

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28.08.2007

.....

Birgit Märtens

Dissertation eingereicht am 28.08.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Beckmann

Mündliche Prüfung am 30.10.2007

Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen für die Überlassung des spannenden Themas, die Betreuung der Arbeit und ständige Diskussionsbereitschaft.

Einzelne Teile dieser Arbeit wurden in erfolgreicher Kooperation durchgeführt. Dafür danke ich Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner und A. Karcher für die immer hilfsbereite Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Roland Beckmann und Dr. Thomas Becker danke ich für das große Interesse an dem Projekt und Anregungen für zukünftige Experimente, die maßgeblich zur Funktionsaufklärung beitragen können.

Großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der AG Jansen und AG Sträßer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich auch bei drei sehr motivierten Studenten E. Lehmann, A. Angerer und M. Vedecnik, die an Teilen der Arbeit mitgearbeitet haben. Dr. Thomas Becker, Dr. Dominik Boos und Oliver Vesper möchte ich für die Korrektur der schriftlichen Arbeit danken.

Danken möchte ich auch meiner Familie, die mich in dieser Zeit immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	1
1 Einleitung	3
1.1 ATP <i>binding cassette</i> (ABC)-Proteine	3
1.2 Funktionen des humanen RLI1: HP68/ABCE1	3
1.3 Architektur von Rli1p	5
1.4 Funktionen des Rli1p.....	7
1.5 Ribosomenbiogenese und Rli1p	9
1.6 Translationsinitiation.....	10
1.6.1 Bildung des 43S Prä-Initiationskomplexes	12
1.6.1.1 Ternärer Komplex (TC)	12
1.6.1.2 Der Translationsinitiationsfaktor 3 (eIF3)	13
1.6.1.3 Der Multifaktorkomplex (MFC)	15
1.6.2 Bildung des 48S Prä-Initiationskomplexes	17
1.6.3 Scanning und 80S Komplex Bildung	18
1.7 Elongation und Termination	19
1.8 Die eIF3-Untereinheit eIF3j/Hcr1p.....	19
1.9 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Ergebnisse	22
2.1 Identifizierung essentieller Domänen in RLI1	22
2.1.1 Herstellung eines <i>RLI1 shuffle</i> Stamms	22
2.1.2 Ortsspezifische Mutagenese und Wachstumstest auf 5'-FOA	23
2.2 Konditionaler RLI1 Knockout.....	26
2.2.1 Herstellung einer temperatursensitiven <i>rli1</i> Mutante	26
2.2.1.1 Chemische Mutagenese	27
2.2.1.2 PCR-Mutagenese	28
2.3 Regulierbare Promotoren	29
2.3.1 Galaktose-Promotoren	30
2.3.2 Tet ^{off} -Promotor	31
2.3.3 Degradation mit einer UBI-R Destruktions-Markierung	31
2.4 High copy suppressor Screen	33
2.4.1 HCS Screen mit der <i>rli1^{ts}</i> -Mutante.....	33
2.4.2 HCS Screen mit dem <i>rli1 shuffle</i> Stamm	35
2.5 Lokalisierung von Rli1p	35
2.6 Subzelluläre Fraktionierung.....	36
2.6.1 Differentielle Zentrifugation	36
2.6.2 Glycerol-Gradient	38
2.6.3 Saccharose-Gradient	39
2.7 Identifizierung der Interaktionspartner von Rli1p	40
2.7.1 Bedingungen für die Bindung an eIF3 und Ribosomen.....	41
2.7.2 Bindung von rRNA an Rli1p	43
2.8 Untersuchung der letalen <i>rli1</i> Mutanten.....	45
2.8.1 Reinigung der mutanten <i>rli1p</i> -Proteinvarianten	45
2.8.2 <i>Yeast-two-hybrid</i> und Co-Immunopräzipitation	48
2.9 Dominant-negativer Phänotyp	52
2.10 Untersuchung der Funktion von Rli1p bei der Translationsinitiation.....	54
2.10.1 <i>In vitro</i> Depletion von Translationsextrakten	55
2.10.2 Immundepletionen.....	56
2.10.2.1 Depletion mit IgG-Sepharose.....	56
2.10.2.2 Depletion mit IgG-gekoppelte Dynal-Affinitätsmatrix.....	57

2.10.3	Inaktivierung mit Hilfe einer TEV-Protease Schnittstelle	58
2.10.3.1	Insertion der vier TEV-Protease Schnittstellen in <i>RLI1</i>	59
2.10.3.2	<i>In vitro</i> Spaltung von Rli1p ^{TEV1}	59
2.10.3.3	Spaltung des Rli1p ^{TEV1} <i>in vivo</i>	62
2.10.4	Immunoinhibition mit α -PAP- und α -HA-Antikörpern.....	64
2.10.5	Immunoinhibition mit einem α -RLI1-Antikörper	65
2.10.5.1	Spezifität des affinitätsgereinigten α -RLI1-Antikörper	65
2.10.5.2	Immunoinhibition von Translationsextrakten	66
2.10.6	Komplementation immunoinhibierter Translationsextrakte mit gereinigtem Rli1p	67
2.10.6.1	Reinigung von Rli1p	67
2.10.6.2	Rli1p komplementiert inaktivierte Translationsextrakte	68
2.10.7	Effekt des α -Rli1-Antikörper	70
2.10.7.1	Effekt des α -RLI1-Antikörpers in Zellextrakten.....	70
2.10.7.2	Effekt des α -RLI1-Antikörpers auf gereinigte 80S Ribosomen.....	73
2.10.8	Inhibition der Translation durch rli1p-Proteinvarianten	73
2.11	Untersuchungen der Interaktion von <i>RLI1</i> mit <i>HCR1</i>	76
2.11.1	Synthetisch-temperatursensitiver Phänotyp.....	76
2.11.2	Zusammensetzung des Rli1p-Komplexes im $\Delta hcr1$ <i>Knockout</i>	77
2.11.3	Zusammensetzung des Hcr1p-Komplexes	78
2.11.4	Polyribosomen Analyse des $\Delta hcr1$ <i>RLI1</i> -HA Stamm.....	79
2.11.4.1	Polyribosomenprofil mit Cycloheximid-behandelten Zellextrakten	79
2.11.4.2	Saccharose-Gradient ohne Stabilisierung der Polyribosomen	81
2.11.4.3	Verhältnis der 60S und 40S ribosomalen Untereinheiten	82
3	Diskussion	85
3.1	Identifizierung essentieller Domänen in Rli1p	85
3.2	Konditionale rli1 Mutante.....	87
3.3	Subzelluläre Lokalisierung von Rli1p in Zellen	88
3.4	Interaktion mit eIF3 und ribosomalen Proteinen.....	89
3.5	Translationsinhibition durch <i>in vitro</i> Depletion von Rli1p	92
3.5.1	Immundepletion und Inaktivierung von Rli1p	94
3.5.2	Immunoinhibition	96
3.5.3	Rekonstitution immunoinhibierter Extrakte.....	97
3.6	Untersuchungen der Interaktion von RLI1 mit HCR1	99
3.7	Bedeutung einzelner Rli1p Domänen für die Interaktion mit eIF3 und ribosomalen Proteinen	102
3.7.1	Bedeutung der ATPase Aktivität	102
3.7.2	Die Funktion des FeS Clusters.....	106
3.7.3	Die Funktion der <i>Hinge</i> Domäne	107
3.7.4	RNA-abhängige Bindungen von Rli1p zu eIF3-Untereinheiten	108
3.7.5	Inhibition der Translation durch rli1p-Proteinvarianten	110
3.8	Genetische Interaktionen	111
3.9	Funktion von Rli1p und Ausblick	112
4	Material	114
4.1	Laborausstattung.....	114
4.2	Verbrauchsmaterialien	114
4.3	Verwendete Antikörper.....	114
4.4	Verwendete Bakterienstämme	115
4.5	Verwendete Hefestämme.....	115
4.6	Vektoren und Plasmide	117
4.6.1	Vektoren.....	117

4.6.2	Plasmide	117
4.6.3	Für diese Arbeit erzeugte Plasmide:	117
4.7	Verwendete Oligos	118
4.7.1	Ortsspezifische Mutagenese:	118
4.7.2	Klonierung und Sequenzierung <i>RLI1</i> :	119
4.7.3	TEV-Protease Insertionen:	120
4.7.4	Epitopmarkierungen:	120
5	Methoden	121
5.1	Hefemedien	121
5.2	Molekularbiologische Methoden	121
5.3	Kultivierung der Hefen	121
5.4	Glukose- und Doxycyclin-Repression	121
5.5	Bestimmung der Zelldichte	122
5.6	Hefetransformation	122
5.6.1	Schnelle Transformation	122
5.6.2	Hoch-Effizienz-Transformation	122
5.7	Generierung eines <i>rli1 shuffle</i> Stamms	122
5.8	Knockout	123
5.9	Epitop-Markierung	123
5.10	Rekombinationsklonierung	123
5.11	Transformation von DNA in Bakterien	124
5.12	Präparation von Plasmid-DNA	124
5.13	Polymerasekettenreaktion (PCR)	124
5.14	Restriktionsverdau und Ligation	124
5.15	PCR aus Hefekolonien	125
5.16	Isolation von genomischer DNA aus Hefe	125
5.16.1	Lyse mit Glasperlen	125
5.16.2	Lyse durch Sphäroblastierung	125
5.17	Isolation von Plasmid DNA aus Hefe	126
5.18	Isolation von RNA aus Hefezellen	126
5.19	Fällung und Analyse von RNA	127
5.20	Southern Blot	127
5.20.1	Restriktionsverdau und Transfer	127
5.20.2	Hybridisierung	127
5.21	Northern Blot	128
5.21.1	RNA-Gel und Membran Transfer	128
5.21.2	Hybridisierung mit Oligo-Sonden	129
5.22	Ortsspezifische Mutagenese	129
5.23	Generierung einer <i>rli1</i> Genbank	129
5.23.1	Chemische Mutagenese	129
5.23.2	PCR-Mutagenese	130
5.24	High copy suppressor Screen	131
5.24.1	<i>ts</i> -Stamm	131
5.24.2	<i>Shuffle</i> Stamm	131
5.25	Mating, Sporulation und Tetradenanalyse	132
5.26	Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen	132
5.26.1	Schnelle Proteinextrakte	132
5.26.2	Alkalische Lyse	132
5.26.3	Lyse mit Glasperlen	133
5.27	TCA-Fällung	133
5.28	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	133

5.29	NuPAGE (Novex)	134
5.30	Western Blot.....	134
5.31	Coomassie-Färbung zum Nachweis von Proteinen.....	135
5.32	Immunofluoreszenz	135
5.32.1	Sphäroblastierung der Zellen für die Immunofluoreszenz	135
5.32.2	Immunofluoreszenz.....	135
5.33	Differentielle Zentrifugation	136
5.34	Glycerol-Gradient (20-40 %)	136
5.35	Saccharose-Gradienten	137
5.35.1	Formaldehydfixierung von Hefezellen und Zellaufschluss	137
5.35.2	Abweichungen vom Standard Protokoll	138
5.35.3	Auftrennung der Saccharose-Gradienten.....	138
5.36	Co-Immunopräzipitation	139
5.37	TAP Reinigung	139
5.37.1	Zellernte und Lyse.....	140
5.37.2	IgG-Sepharose Bindung und TEV Protease Spaltung	140
5.37.3	Calmodulin-Sepharose Bindung.....	141
5.37.4	Elution	141
5.37.5	Modifizierungen des Standard Protokolls.....	141
5.38	Bestimmung der Protein Konzentration.....	142
5.39	Herstellung von in vitro Translationsextrakte.....	142
5.40	In vitro Transkription.....	143
5.41	In vitro Translation.....	143
5.42	Micrococcus Nuklease Verdau	144
5.43	Immundepletionen.....	144
5.44	Kopplung von IgG an tosylaktivierte Dynabeads®	144
5.45	Reinigung der TEV-Protease	145
5.46	Inaktivierung von Rli1p ^{TEV1} mit TEV-Protease.....	146
5.47	α-RLI1-Antikörper Reinigung.....	146
5.47.1	Kopplung des Rli1p-Peptids.....	146
5.47.2	Affinitätsreinigung des Serums.....	146
5.47.3	Regenerierung der Peptid-gekoppelte Sepharose	147
5.48	Immunoinhibition	147
5.49	Komplementationsexperiment.....	147
6	Literaturverzeichnis	148
	Abkürzungsverzeichnis:	153
	Publikationen:.....	155
	Lebenslauf:	156

Zusammenfassung:

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der hochkonservierten, essentiellen ABC-ATPase Rli1p in *Saccharomyces cerevisiae* aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass beide Nukleotid-Bindungsdomänen und eine Scharnierregion, welche die beiden ABC-Domänen miteinander verbindet, wichtig für die Funktion von Rli1p sind. Des Weiteren konnte auch das N-terminale Eisen-Schwefel *Cluster* Bindemotiv als essentielle Domäne identifiziert werden. Durch Überexpression von inaktiven rli1p-Proteinvarianten wurde ein dominant-negativer Phänotyp erzeugt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Rli1p im Zytoplasma lokalisiert ist und mit den Polyribosomen, den 80S Ribosomen und hauptsächlich mit der 40S Untereinheit co-fraktioniert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rli1p mit einem Subkomplex des Translationsinitiationsfaktors eIF3 und ribosomalen Proteinen interagiert. Diese Interaktion ist abhängig von RNA und funktionalen ABC-Domänen, sowie von eIF3j/Hcr1p, einer Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF3. Um die zelluläre Funktion von Rli1p näher charakterisieren zu können, wurde versucht eine konditional temperatursensitive Mutante herzustellen und Rli1p durch Repression der Transkription *in vivo* zu depletieren. Beide Ansätze waren nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurden *in vitro* Depletionssysteme etabliert. Immundepletion oder Inaktivierung eines mit TEV-Protease spaltbarem Rli1p führte zu einer Reduktion der Translationsaktivität und demonstrierte damit einen direkten Einfluss von Rli1p auf die Translation. Eine vollständige Inhibition der Translation einer Reporter-mRNA konnte durch Zugabe eines α -RLI1-Antikörper erreicht werden, wobei die Translationsextrakte einen Zerfall von den Polyribosomen und der 80S Komplexe in 60S und 40S Untereinheiten aufwiesen. Die Immunoinhibition konnte durch die Zugabe von gereinigtem Rli1p rückgängig gemacht werden. Neben einer biochemischen konnte auch eine genetische Interaktion von *RLI1* mit *HCR1* nachgewiesen werden. Durch Kombination eines $\Delta hcr1$ *Knockout* mit einem C-terminal markierten Rli1p entstand ein synthetisch-temperatursensitiver Phänotyp. Nähere Untersuchungen dieses Stammes zeigten eine Reduktion von Polyribosomen und einen Defekt bei der 60S Bindung an den Prä-Initiationskomplex, während die Ribosomenbiogenese nicht beeinflusst wurde. Für die zelluläre Funktion von Rli1p konnte ein Modell erarbeitet werden, in dem Rli1p den Translationsinitiationsfaktor eIF3 auf dem 40S Ribosom assembliert oder richtig

positioniert. Diese Funktion des Rli1p könnte auch in der Anti-Assoziation von 80S durch eIF1, eIF1A und eIF3 von Bedeutung sein. Dieses Modell soll in Folgeexperimenten geprüft werden und die Bindungsstelle von Rli1p im 43S Prä-Initiationskomplex durch Cryo-EM näher analysiert werden.

1 Einleitung

1.1 ATP binding cassette (ABC)-Proteine

ATP binding cassette (ABC)-Proteine sind chemo-mechanische Maschinen, die an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt sind (Bauer et al., 1999). Die ABC-Superfamilie umfasst Proteine, die an Transportprozessen, an der DNA-Reparatur und der Chromosomensegregation sowie auch an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. Zusätzlich gibt es in dieser Familie auch Proteine, die in der Translation und in der Ribosomenbiogenese eine Rolle spielen. Diese Unterfamilie aus sechs löslichen ABC-ATPasen wird *YEF3* (eEF3) bzw. *RLI1* Unterfamilie genannt (Bauer et al., 1999). Sie besitzen zwei ABC-Domänen, die aus den charakteristischen Nukleotid-Bindungsdomänen (NBDs) aufgebaut sind. Beide NBDs beinhalten die für ATPasen typischen Walker A und B Motive, die an der Bindung und der Hydrolyse von ATP beteiligt sind (Abb.1.2 B), sowie das spezifische *Signature* Motiv, welches an der Bindung des ATP- γ -Phosphats beteiligt ist. Beide Walker Motive und das *Signature* Motiv sind für die ATPase Aktivität essentiell (Hopfner and Tainer, 2003). Der *YEF3* bzw. *RLI1* Unterfamilie fehlt jedoch die für andere ABC-Proteine typische Transmembran-Domäne. Drei Proteine aus dieser Unterfamilie sind an der Translationelongation bzw. Regulation beteiligt (Yef3p/eEF3, Hef3p, Gcn20p) (Kamath and Chakraburty, 1986) (Garcia-Barrio et al., 2000) (Maurice et al., 1998), (Andersen et al., 2006), während zwei Vertreter an der Ribosomenbiogenese beteiligt sind (Arb1p; New1p) (Dong et al., 2005; Wade et al., 2006). Alle diese Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert (Huh et al., 2003), wo auch die Translation stattfindet, bzw. die letzten Schritte der Ribosomenbiogenese (Fromont-Racine et al., 2003; Preiss, 2003). Bei den oben genannten Familienmitgliedern handelt es sich um nicht essentielle Gene, wohingegen *YEF3* und *ARB1* als essentielle Gene beschrieben sind. *RLI1* als weiterer essentieller Vertreter dieser Unterfamilie wird in dieser Arbeit als Faktor charakterisiert, der an der Translation beteiligt ist.

1.2 Funktionen des humanen RLI1: HP68/ABCE1

Die ABC-ATPase *RLI1*, die in humanen Zellen HP68 oder ABCE1 genannt wird, ist das am höchsten konservierte Protein innerhalb der oben beschriebenen ATPase

Familie mit einer Sequenzidentität von 45-50 % zwischen Archaea und Eukaryonten (Karcher et al., 2005). Man findet *RLI1* in Archaeobakterien und allen Eukaryonten, eine Ausnahme bilden die Eubakterien, in denen kein Ortholog existiert. *RLI1* ist essentiell in allen bisher untersuchten eukaryontischen Organismen (*S. cerevisiae*; *Drosophila*; *C. elegans*; Zebrafisch).

HP68/ABCE1 wurde zuerst als RNase L Inhibitor identifiziert (Bisbal et al., 1995). RNase L ist eine Endonuklease, die in höheren Eukaryonten am mRNA-Stoffwechsel beteiligt ist und zudem eine Rolle bei der Abwehr von Viren spielt. Die Aktivierung der RNase L erfolgt über den so genannten 2'-5'-Oligo-Adenylatweg, einen Interferon-induzierten Signaltransduktionsweg. Die Aktivierung führt dazu, dass die RNase L dimerisiert und virale bzw. zelluläre mRNA abgebaut werden kann. Ein Antagonist dieses Interferon-induzierten Signaltransduktionsweges ist das Protein HP68/ABCE1, dass durch einen noch unbekanntem Mechanismus, die Aktivierung der RNase L verhindert. Viele Viren leiten eine Überexpression von HP68/ABCE1 ein und rekrutieren dieses Wirtsprotein, um den Abbau ihres Genoms durch die RNase L zu verhindern bzw. die Interferon-induzierte Immunantwort zu umgehen. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass HP68/ABCE1 am generellen mRNA-Stoffwechsel der Zelle beteiligt ist und auch bei diesem Prozess als negativer Regulator der RNase L wirkt (Bisbal et al., 2001)

Zimmermann *et al.* zeigten zum ersten Mal eine weitere Funktion für das humane RLI1, HP68/ABCE1 (Zimmerman et al., 2002). In einem zellfreien System in dem die *human immunodeficiency virus* (HIV)-Capsid Bildung rekonstituiert werden kann, wurde demonstriert, dass HP68/ABCE1 essentiell für post-translationale Ereignisse der HIV-Capsid Assemblierung ist. In diesem zellfreien System können unreife HIV-Capside gebildet werden, die zur Reifung jedoch zusätzlich ATP und eine subzelluläre Fraktion benötigen, in der unter anderen Faktoren auch die ATPase HP68/ABCE1 identifiziert wurde. Die Vermutung, dass es sich bei dem Reifungsfaktor tatsächlich um HP68/ABCE1 handelte, wurde durch nachfolgende Depletions- und Rekonstitutionsexperimente in dem zellfreien System bestätigt. Diese *in vitro* Experimente wurden verifiziert durch *in vivo* Überexpression einer dominant-negativen HP68/ABCE1-Mutante. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es auch *in vivo* zu einer Reduktion der Ausbildung reifer HIV-Capside kommt, wenn eine dominant-negative HP68/ABCE1-Mutante in HIV-infizierten T-Zellen

überexprimiert wurde (Zimmerman et al., 2002). In Abb. 1.1 sind die beiden beschriebenen Funktionen des humanen *RLI1* HP68/ABCE1 kurz zusammengefasst.

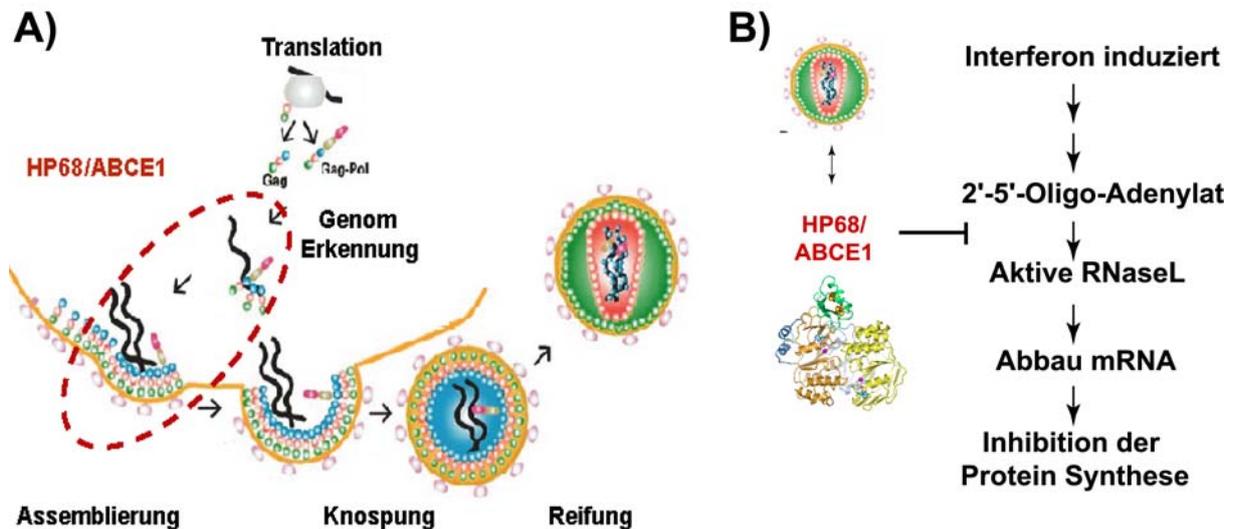


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Funktionen von HP68/ABCE1

A) HIV-1 Capsid-Assemblierung und Reifung. Nach der Translation des viralen Genoms werden das RNA Genom und die Capsid-Proteine assembliert. Ein neues Virus entsteht durch Knospung und Reifung dieses Capsids. Die rot markierten Ereignisse weisen auf die HP68/ABCE1 abhängigen Schritte hin. B) Interferon-induzierte Aktivierung der RNase L über den 2'-5'-Oligo-Adenylatweg. HP68/ABCE1 wirkt der Aktivierung der RNase L entgegen. Viele Viren rekrutieren das Wirtsproteins HP68/ABCE1 um die angeborene Interferon-induzierte Immunantwort auszuschalten.

Durch nachfolgende Studien wurde gezeigt, dass HP68/ABCE1 mit Gag, einem viralen Capsid-Protein, direkt interagiert und als eine Art Chaperon zu der Capsid-Assemblierung beiträgt (Lingappa et al., 2006) (Dooher et al., 2007). Bei diesen beschriebenen Aufgaben von HP68/ABCE1, als RNase L Inhibitor bzw. als Faktor für die HIV-1 Capsid-Assemblierung, muss es sich um später in der Evolution erworbene Funktionen des humanen *RLI1* handeln. Während *RLI1* hoch konserviert ist, handelt es sich bei RNase L um ein nicht konserviertes Protein, das nur in Vertebraten vorkommt und kein homologes Protein in den niederen Eukaryonten existiert.

1.3 Architektur von Rli1p

Am N-Terminus von Rli1p befinden sich zwei Domänen mit vier konservierten Cystein-Resten (CX₄CX₄CX₃C and CX₂CX₂CX₃C), die jeweils ein 4Fe-4S Cluster binden können (Barthelme et al., 2007). Die von Karcher *et al.* aufgeklärte Struktur von RLI1-ΔFeS aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) (Abb. 1.3) zeigt drei weitere wichtige

Strukturdomänen: zwei typische ABC-Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD1 und NBD2) und eine *Hinge* Domäne bestehend aus den *Hinge* I und *Hinge* II Subdomänen, die V-förmig angeordnet sind (Karcher et al., 2005). Die Anordnung der Domänen ist in Abb. 1.2 A schematisch dargestellt.

Die zwei NBDs zeigen eine charakteristische Kopf-zu-Schwanz Anordnung und bilden das aktive Zentrum aus, in dem ATP gespalten wird. Ein Molekül ATP wird durch das Walker A und Walker B Motiv einer NBD gebunden und durch Bindung des γ -Phosphats an das *Signature* (Walker C) Motiv der gegenüberstehenden zweiten NBD kommt es zu einer Konformationsänderung des Moleküls an der wahrscheinlich die *Hinge* Domäne beteiligt ist. Dieser ATP-Hydrolyse Zyklus ist in Abb. 1.2 B dargestellt.

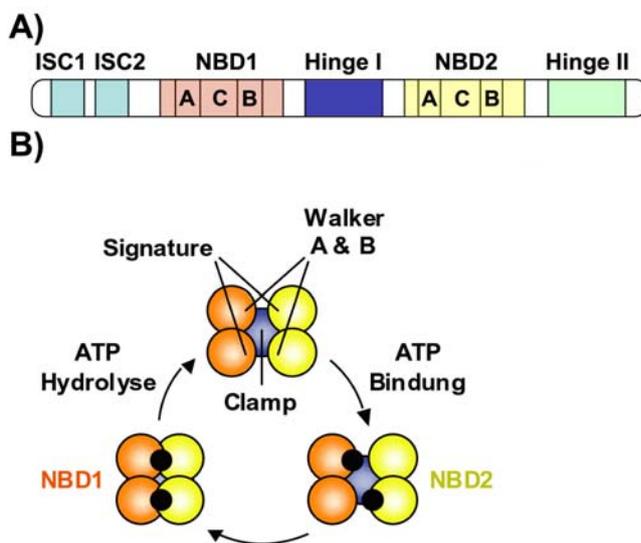


Abb. 1.2: Domänen von Rli1p und ATP-Hydrolyse

A) Schematische Darstellung der Domänen in Rli1p; Abkürzungen: ISC = FeS Cluster Bindemotiv; NBD = Nukleotid Bindungs-Domäne; A = Walker A Motiv; B = Walker B Motiv; C = *Signature* Motiv
 B) Modell des Rli1p ATP-Hydrolyse Zyklus mit Hilfe der NBDs und der *Hinge* I und *Hinge* II Domäne (*Clamp*). Die ATP Moleküle sind durch schwarze Kreise symbolisiert (Karcher et al., 2005).

Die *Hinge* Domäne oder Scharnierregion ist im Vergleich zu anderen ABC-ATPasen ein einzigartiges Merkmal für *RLI1*, sie besteht aus zwei Subdomänen, *Hinge* I (*Clamp* I) und *Hinge* II (*Clamp* II). Die Anordnung dieser Domänen ist in Abb. 1.3 anhand der *Pfu* RLI1- Δ FeS Kristallstruktur bzw. der *Pyrococcus abyssi* (*pab*) RLI1 Struktur mit rekonstituiertem FeS *Cluster* demonstriert.

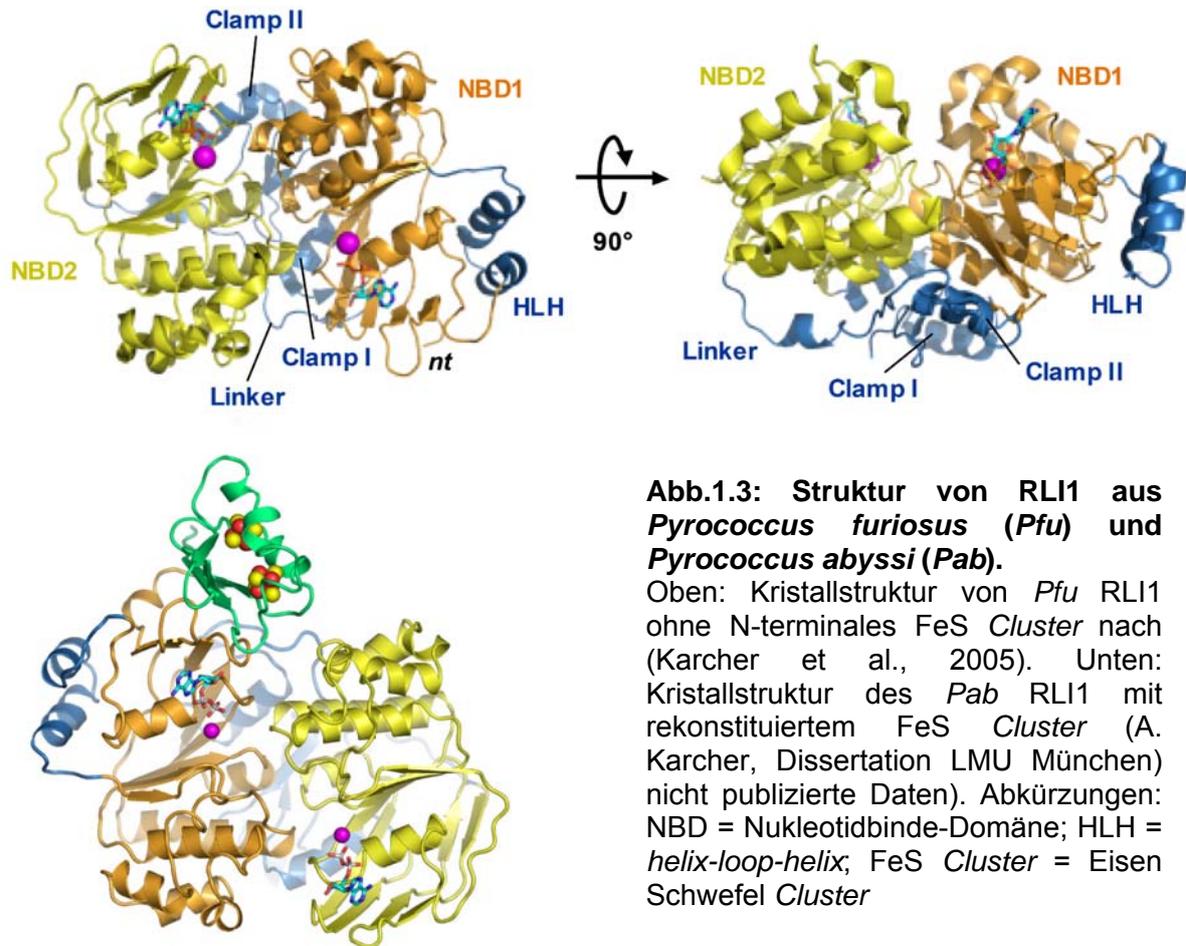


Abb.1.3: Struktur von Rli1 aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) und *Pyrococcus abyssi* (*Pab*).

Oben: Kristallstruktur von *Pfu* Rli1 ohne N-terminales FeS Cluster nach (Karcher et al., 2005). Unten: Kristallstruktur des *Pab* Rli1 mit rekonstituiertem FeS Cluster (A. Karcher, Dissertation LMU München) nicht publizierte Daten). Abkürzungen: NBD = Nukleotidbinde-Domäne; HLH = *helix-loop-helix*; FeS Cluster = Eisen Schwefel Cluster

Die *Hinge* I (*Clamp* I) Subdomäne besteht aus der Sequenzregion zwischen den zwei NBDs und wird über einen flexiblen *Linker* mit der NBD2 verbunden. Die *Hinge* II (*Clamp* II) Domäne wird von dem hoch konservierten C-Terminus gebildet. Die *Hinge* I und *Hinge* II Domäne binden über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken aneinander, das über konservierte Arginin-Reste ausgebildet wird, dem so genannten *R-Cluster*. Zusätzlich enthält die NBD1 noch ein konserviertes *helix-loop-helix* (HLH)-Motiv als Insertion. Die Struktur des *Pfu* Rli1 wurde in dieser Studie als Grundlage für eine Funktionsanalyse der beschriebenen Rli1p Domänen in *S. cerevisiae* verwendet (Karcher et al., 2005).

1.4 Funktionen des Rli1p

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde von Dong *et al.* eine Funktion des *S. cerevisiae* Rli1p in der Translation gezeigt (Dong et al., 2004). Die Autoren demonstrierten eine Interaktion mit den Translationsinitiationsfaktoren eIF3, eIF5 und eIF2. Darüber hinaus wurde mit einem Saccharose-Gradient die Co-Fraktionierung

von Rli1p mit der 40S ribosomalen Untereinheit gezeigt, und mit einem *in vivo* Depletionssystem konnte nach einer 8-stündigen Depletion ein Rückgang der Translationsaktivität um ein Fünftel beobachtet werden. Mit Hilfe eines Western Blots wurde demonstriert, dass die Depletion von Rli1p zu einer Destabilisierung des Prä-Initiationskomplexes führte. Daraus resultierend kam es zu einer Reduktion der Polyribosomen. Zusätzlich wurde die essentielle Funktion der zweiten NBD nachgewiesen. Die Überexpression einer ATPase-inaktiven Mutante in einem Wildtyp-Stamm führte zu einem dominant-negativen Phänotyp. Des Weiteren inhibiert das gereinigte ATPase-inaktive Protein die Translation einer Reporter-mRNA. Die Autoren postulieren eine duale Funktion des Proteins in Translationsinitiation und Ribosomenbiogenese, da zusätzlich zu den oben beschriebenen Beobachtungen die Depletion von Rli1p zu einem Defizit freier 60S ribosomaler Untereinheiten führt und eine Lokalisierung von Rli1p im Zellkern und Zytoplasma gezeigt wurde (Dong et al., 2004).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen von Dong *et al.* wurde dies auch für das Trypanosomen (*T. brucei*) Ortholog, *tbRLI*, gefunden (Estevez et al., 2004). Eine Depletion des *tbRLI* führte zu einem Block der Proteinbiosynthese. Chen *et al.* wiesen nach, dass dies auch für das humane *RLI1*, ABCE1, gilt. Durch siRNA vermittelte Repression des ABCE1 in HEK293 Zellen konnte eine Inhibition der Translationsinitiation aufgezeigt werden. In Saccharose-Gradienten wurde ein Rückgang der Polyribosomen einhergehend mit einer Zunahme des 80S *Peaks* beobachtet (Chen et al., 2006). Vor kurzem wurde von Andersen *et al.* ähnliche Ergebnisse auch für das *Drosophila* Homolog von Rli1p, Pixie, beobachtet (Andersen and Leever, 2007). Durch eine Affinitätsreinigung konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit eIF3 auch in *Drosophila* konserviert ist. Des Weiteren war auch die Co-Fraktionierung mit 40S ribosomalen Untereinheiten eine konservierte Eigenschaft.

Alle diese Studien deuten darauf hin, dass Rli1p eine duale Funktion sowohl in der Translation als auch in der Ribosomenbiogenese ausübt (Dong et al., 2004) (Kispal et al., 2005) (Yarunin et al., 2005). Um die primäre Funktion von Rli1p aufzuklären ist es deshalb wichtig diese zwei Prozesse, die sich stark gegenseitig beeinflussen, getrennt voneinander zu untersuchen.

1.5 Ribosomenbiogenese und Rli1p

Für die Translation einer mRNA werden neben den in Abschnitt 1.6 beschriebenen Translationsfaktoren auch Ribosomen benötigt. Ribosomen sind große Ribonukleinkomplexe, deren Assemblierung und Reifung hauptsächlich im Nucleolus stattfindet. Abb. 1.4 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Schritte (Leger-Silvestre et al., 2004).

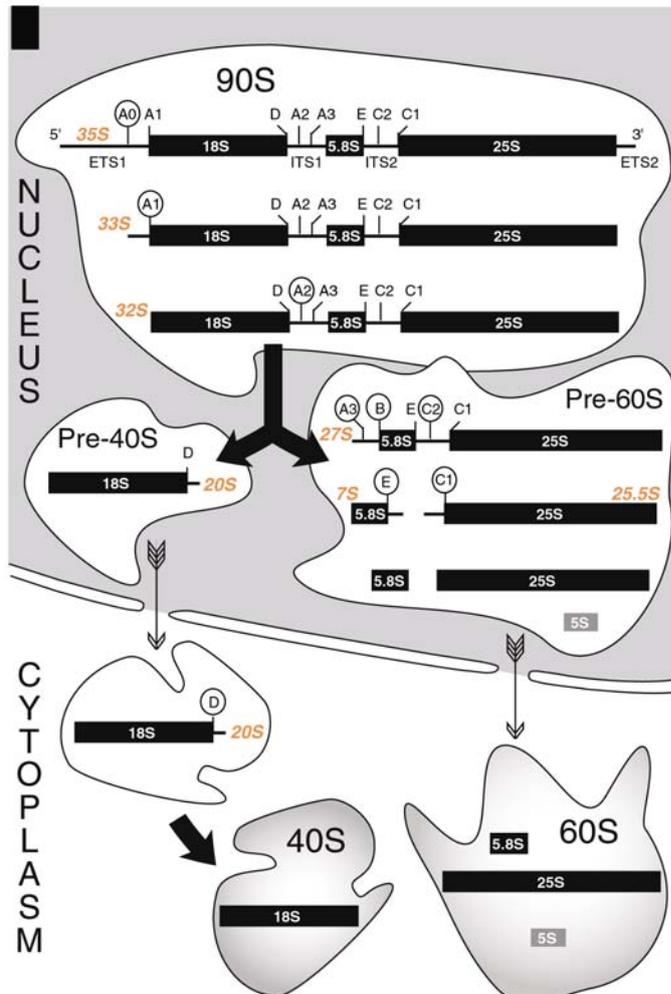


Abb. 1.4: Ribosomenreifung und Export

Darstellung der Ribosomenreifung nach (Leger-Silvestre et al., 2004). Im Nucleolus wird das prä-90S Ribosom assembliert, welches die prä-35S rRNA enthält. Die prä-35S rRNA wird prozessiert und es entsteht die 32S rRNA. Das prä-90S Ribosom bzw. die prä-rRNA wird gespalten und es entstehen prä-40S und prä-60S Ribosomen. In Prä-60S Ribosomen entstehen durch die Spaltung der prä-32S rRNA, nacheinander die Vorläufer rRNAs 27S, 25,5S und 7S. Die weitere Reifung der prä-60S Ribosomen findet im Nucleoplasma statt, bevor die reifen 60S ins Zytoplasma exportiert werden. Sie enthalten dann die reife 25S und 5,8S und 5S rRNA. Das Prä-40S Ribosom, das nach Spaltung der 35S rRNA die prä-20S rRNA enthält, wird ins Zytoplasma exportiert. Der letzte Reifungsprozess, der eine Dimethylierung und Spaltung der 20S rRNA in 18S rRNA beinhaltet, findet im Zytoplasma statt.

Im Nucleolus wird das prä-90S Ribosom assembliert welches die prä-35S und die 5S rRNA enthält. Das prä-90S Ribosom bzw. die prä-35S rRNA wird gespalten und es entstehen prä-40S und prä-60S Ribosomen. In 60S Prä-Ribosomen entstehen durch die Spaltung der prä-35S rRNA, nacheinander die prä-rRNAs 27S, 25,5S und 7S. Die weitere Reifung der prä-60S Ribosomen findet im Nucleoplasma statt, bevor die reifen 60S ins Zytoplasma exportiert werden. Sie enthalten die reife 25S und 5,8S und 5S rRNA. Das Prä-40S Ribosom, dass nach der Spaltung der 35S rRNA die prä-20S rRNA enthält, wird ins Zytoplasma exportiert. Der letzte Reifungsprozess, der

eine Dimethylierung und Spaltung der 20S rRNA in 18S rRNA beinhaltet, findet im Zytoplasma statt. An diesem letzten Reifungsprozess ist mit Hcr1p/eIF3j auch eine Untereinheit von eIF3 beteiligt (Abschnitt 1.9).

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *RLI1* an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). In einem genetischen *Screen* wurde beobachtet, dass Ribosomenexport und FeS *Cluster* Biogenese genetisch verknüpft sind und somit die Zellen bei Manipulation beider Prozesse letal sind. Da der Export von Ribosomen aus dem Zellkern ein essentieller Prozess ist, lag es nahe das ein essentielles FeS *Cluster* Protein, an dem Prozess beteiligt sein muss. Die Autoren zeigten auf, dass eine Reduktion von Rli1p in Hefezellen zur Akkumulierung von GFP-fusionierten 40S-(Rps2-GFP) und 60S-(Rpl25-GFP) Ribosomen in Zellkernen führt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein genereller Defekt in der prä-rRNA Reifung der prä-40S und prä-60S Ribosomen vorliegt, und somit Rli1p eine wichtige Funktion bei der Ribosomenreifung und dem Export der ribosomalen Untereinheiten aus dem Zellkern spielt (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005).

1.6 Translationsinitiation

Der letzte Schritt der Genexpression ist die Proteinbiosynthese, bei der neben den reifen Ribosomen auch zahlreiche Translationsfaktoren benötigt werden, die notwendig sind um eine mRNA zu translatieren. Generell wird die Translation in drei Schritte unterteilt. Erstens in die Initiationsphase, die alle Prozesse beinhaltet, die stattfinden, um Ribosomen zusammen mit der Initiator-Methionyl-transfer-RNA (Met-tRNA_i^{Met}) auf dem Start Codon einer mRNA zu assemblieren. Die zweite Phase ist die Elongation, in der die Polypeptidsynthese stattfindet und als letztes erfolgt die Termination, die das Freisetzen der fertigen Polypeptidkette umfasst sowie die Dissoziation der Ribosomen von der mRNA.

Im folgenden Abschnitt wird nur auf die 7-Methyl-guanosinium-Kappe (*cap*)-abhängige Translationsinitiation näher eingegangen, obwohl auch alternative Initiationswege eine wichtige Rolle spielen. Hierbei handelt es sich z.B. um die durch interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES)-vermittelte Translationsinitiation (Pisarev et al., 2005). IRES-vermittelte Translationsinitiation wurde ursprünglich bei der Translation viraler mRNAs entdeckt (Kean, 2003). Später konnte jedoch auch gezeigt

werden, dass manche zelluläre mRNAs diesen alternativen Translationsinitiationsweg verwenden (Kozak, 2005).

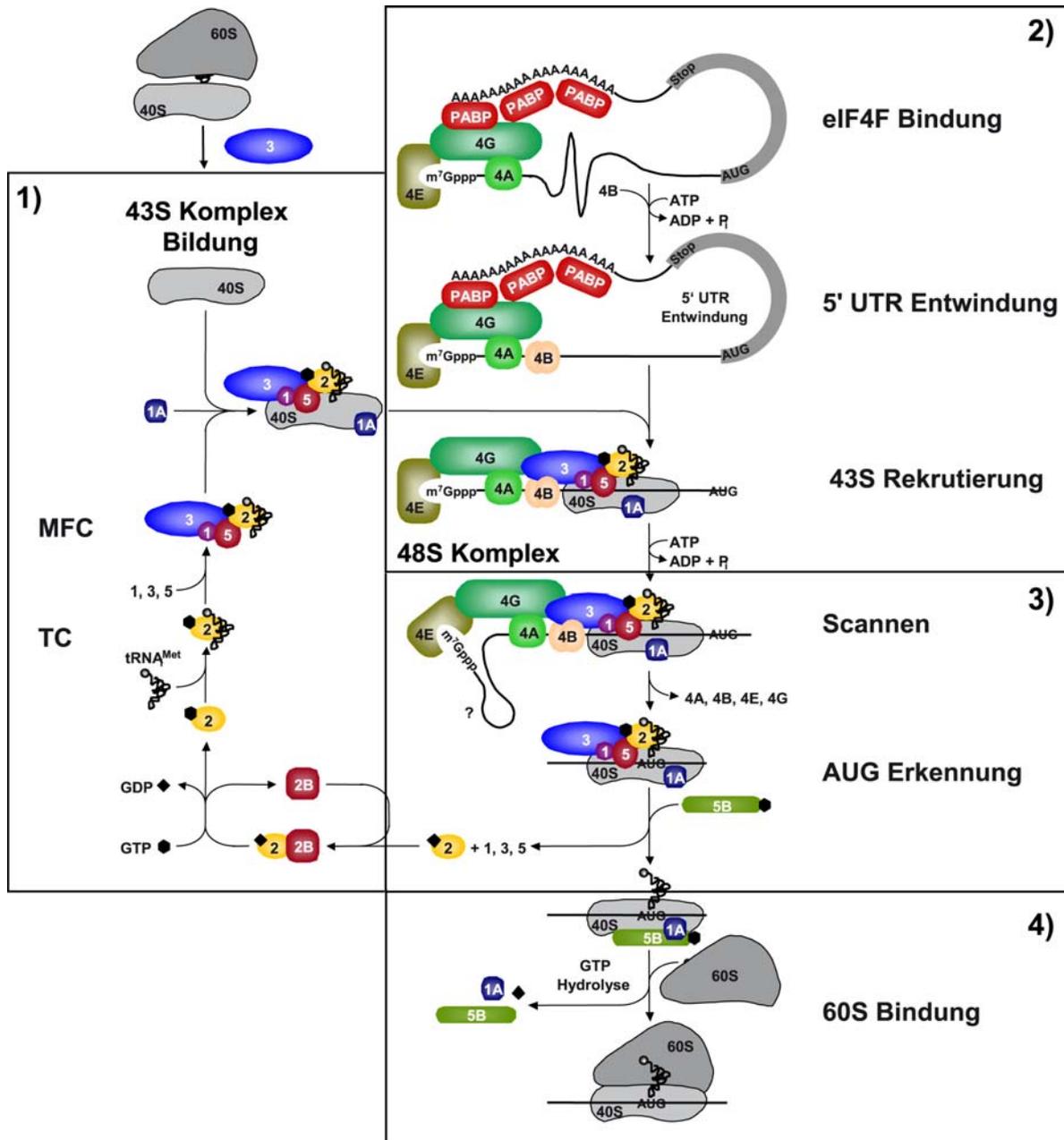


Abb.1.5: Cap-abhängige Translationsinitiation

Die *cap*-abhängige Translationsinitiation zusammengefasst nach (Preiss, 2003).

1) Assemblierung des 43S Prä-Initiationskomplexes (PIC) bestehend aus der 40S ribosomalen Untereinheit, Translationsinitiationsfaktoren (eIF1, 2, 3, 1A, 5) und der Initiator-tRNA (Met-tRNA^{Met}). 2) Rekrutierung des 43S PIC an das *gecappte* 5'-Ende der mRNA (eIF4A, 4B, 4G, 4E und poly-A Bindeprotein PABP). 3) Scannen der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) und Erkennung des Startcodons (AUG) und 4) Bindung der 60S Untereinheit und Assemblierung des 80S Ribosoms. Erklärungen der übrigen Schritte erfolgt im Haupttext.

Die *cap*-abhängige Translationsinitiation erfolgt in vier aufeinander folgenden Schritten (Abb. 1.6): 1) Assemblierung des 43S Prä-Initiationskomplexes (PIC), bestehend aus der kleinen 40S ribosomalen Untereinheit, Translationsinitiationsfaktoren und der Initiator-tRNA Met-tRNA_i^{Met}; 2) Rekrutierung des 43S PIC an das 5'-Ende der mRNA; 3) *Scanning* der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) sowie die Erkennung des Startcodons; 4) Bindung der 60S Untereinheit und Assemblierung des 80S Ribosoms. In Abb. 1.5 sind die wichtigsten Schritte der *cap*-abhängige Translationsinitiation zusammengefasst (Preiss, 2003). Für die *cap*-abhängige Translationsinitiation werden Initiationsfaktoren benötigt, die für die oben beschriebenen vier Schritte des Initiationszyklus essentiell sind. Diese Faktoren sind in Hefe eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4F, eIF5 und eIF5B, sowie das poly-A Bindeprotein PABP (Hinnebusch, 2006; Preiss, 2003). Die Aufgaben dieser Translationsinitiationsfaktoren werden in den folgenden Abschnitten näher erklärt.

1.6.1 Bildung des 43S Prä-Initiationskomplexes

1.6.1.1 Ternärer Komplex (TC)

Physiologische Bedingungen favorisieren die Assoziation der ribosomalen 40S und 60S Untereinheiten zu kompletten 80S Ribosomen. Aus diesem Grund ist die erste Voraussetzung für eine erfolgreiche Initiation, die Dissoziation der 80S Ribosomen in ihre Untereinheiten (Preiss, 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass die 80S Dissoziation mit Hilfe der Initiationsfaktoren eIF1A und eIF3 erreicht wird (Hinnebusch, 2006; Kolupaeva et al., 2005; Preiss, 2003). Die dissoziierte 40S Untereinheit kann dann von verschiedenen Initiationsfaktoren sowie der Initiator tRNA (Met-tRNA_i^{Met}) gebunden werden.

Der Translationsinitiationsfaktor eIF2, die Met-tRNA_i^{Met} und GTP binden an die 40S Untereinheit als ternärer Komplex (TC). Da die GDP gebundene Form von eIF2, die in jedem Initiationszyklus gebildet wird, die Met-tRNA_i^{Met} nicht binden kann, wird zusätzlich eIF2B benötigt, ein Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF). eIF2 ist ein heterotrimerer Komplex bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Während die γ -Untereinheit für die Bindung von GTP und Met-tRNA_i^{Met} zuständig ist, stimuliert die β -Untereinheit die GTPase-Aktivität. Die α -Untereinheit besitzt hauptsächlich regulatorische Funktionen. So führt eine Phosphorylierung der α -Untereinheit unter

Stressbedingungen wie z.B. Aminosäuremangel zu einer Hemmung des GDP-Austauschs und somit zu einer generellen Inhibition der Translationsinitiation (Hinnebusch, 2005).

Die Bindung des TC an die 40S Untereinheit erfolgt zusammen mit den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und dem Multi-Proteinkomplex eIF3. eIF3 in Hefe besteht aus 5 essentiellen Untereinheiten (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3i und eIF3g) während eIF3 in höheren eukaryontischen Zellen bis zu 13 Untereinheiten (eIF3a-eIF3m) enthält (Abschnitt 1.6.1.2).

1.6.1.2 Der Translationsinitiationsfaktor 3 (eIF3)

Der Translationsinitiationsfaktor 3 (eIF3) ist der komplexeste der oben bereits erwähnten Initiationsfaktoren. Die meisten Reaktionen im Initiationsweg werden von eIF3 stimuliert: Dies beinhaltet die Dissoziation der 80S Ribosomen, die Assemblierung des TC bestehend aus eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}, Bindung des TC und den anderen Komponenten des 43S PIC an die 40S Untereinheit, die mRNA Rekrutierung an den 43S PIC Komplex und den *Scanning*-Prozess für die AUG Erkennung (Hinnebusch, 2006). Der humane eIF3 besteht aus 13 nicht-identischen Untereinheiten eIF3a-eIF3m. In Hefe ist der eIF3 aus fünf stöchiometrisch vertretenen Untereinheiten zusammengesetzt, eIF3a/Tif32, eIF3b/Prt1, eIF3c/Nip1, eIF3g/Tif35 und eIF3i/Tif34. Eine weitere Komponente ist die nicht-essentielle substöchiometrisch vertretene Untereinheit eIF3j/Hcr1 (Hinnebusch, 2006).

Tab. 1.1: Nomenklatur der eIF3 Untereinheiten. Übersicht der Nomenklatur der eIF3 Untereinheiten aus *S. cerevisiae* im Vergleich zu humanem eIF3a-eIF3j nach (Browning et al., 2001).

eIF3	Humaner eIF3	Hefe eIF3
a	p170	Tif32/Rpg1
b	p116	Prt1
c	p110	Nip1
d	p66	
e	p48	
g	p44	Tif35
i	p36	Tif34
j	p35	Hcr1

Es wurde lange geglaubt, dass humaner eIF3 die 40S Untereinheit ohne Hilfe anderer eIFs binden kann und auch die Assoziation der 60S Untereinheit von eIF3 alleine verhindert wird. Neueste Studien zeigten jedoch, dass diese Funktion abhängig von dem TC (Kolupaeva et al., 2005) (Chaudhuri et al., 1999) und einer

Kombination aus eIF1 und eIF1A (Majumdar et al., 2003) und RNA-Oligonukleotiden ist. Alle diese Faktoren verstärken die Bindung von eIF3 an die 40S Untereinheit und könnten damit die Anti-Assoziationsaktivität von eIF3 stimulieren.

Interessanterweise existieren stabile eIF3 Subkomplexe, die teilweise die Funktion des gesamten eIF3-Komplexes übernehmen können (Phan et al., 2001). Durch Affinitätsreinigungen von His-markiertem Prt1p konnte so z.B. ein stabiler eIF3 Subkomplex bestehend aus Prt1p, Nip1p und Tif32p/Rpg1p co-gereinigt werden. Mit diesem Subkomplex konnten eIF5, eIF1 und Hcr1p interagieren. Ein weiterer stabiler Subkomplex besteht aus Prt1p, Tif34p und Tif35p, der jedoch keine Interaktion mit Hcr1p oder anderen eIFs aufweist. Diese Subkomplexe zeigen unterschiedliche Aktivitäten in Translationsextrakten, die aus einem temperatursensitiven *prt1-1* Stamm gewonnen wurden. In den *prt1-1* Translationsextrakten findet keine Bindung von Met-tRNA^{Met} an die 40S Untereinheiten statt, und es erfolgt auch keine Bindung der 40S an die eIFs 1, 5 und 3 und die mRNA. Diese Bindungsdefekte konnten mit dem Subkomplex aus Prt1p/Nip1p/Tif32p (Rpg1p) ebenso effektiv komplementiert werden, wie mit dem gesamten eIF3 Komplex, wohingegen der Subkomplex aus Prt1p/Tif34p/Tif35p nahezu inaktiv ist. Dies bedeutet, dass viele Schlüsselfunktionen von eIF3 von dem Subkomplex, bestehend aus Prt1p/Nip1p/Tif32p (Rpg1p), übernommen werden können (Phan et al., 2001).

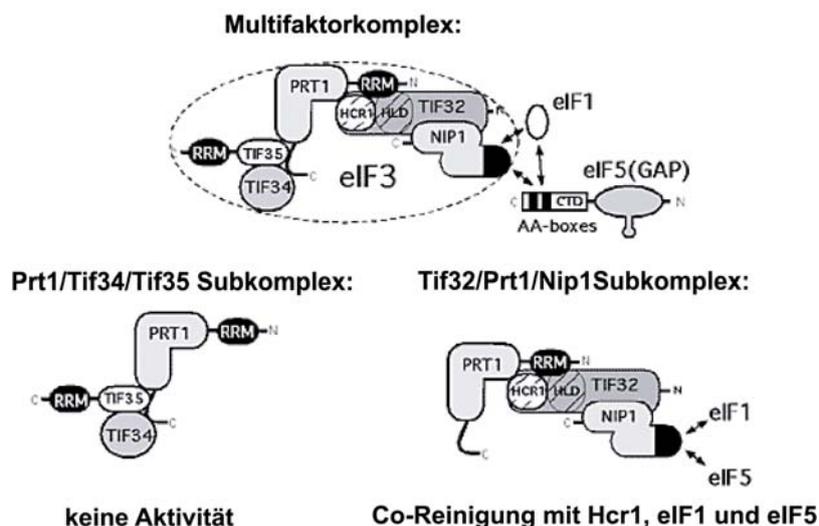


Abb. 1.6: Subkomplexe von eIF3.

Oben: Multifaktorkomplex aus eIF3, eIF1 und eIF5. Unten: Subkomplexe des Translations-Initiationsfaktors eIF3 nach (Hinnebusch, 2006; Phan et al., 2001; Spahn et al., 2001). Mit einem His-markiertem Prt1p konnten zwei verschiedene eIF3 Subkomplexe gereinigt werden. Der eine Komplex bestehend aus Prt1p/Tif34p/Tif35p zeigt keine Bindung zu anderen eIFs und auch keine Rekonstitution von eIF3 depletierten Translationsextrakten. Der andere Komplex bestehend aus Prt1p/Nip1p/Tif32p interagiert mit eIF1, eIF5 und Hcr1p und zeigt eine Komplementation der eIF3 depletierten Translationsextrakte.

1.6.1.3 Der Multifaktorkomplex (MFC)

In Hefe kann sich unabhängig vom Ribosom ein Multifaktorkomplex (MFC) ausbilden. Der MFC besteht aus den Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF2, eIF3, eIF5 und Met-tRNA^{Met} und ist eine wichtige funktionelle Einheit während vieler Phasen der Initiation. Interaktionen innerhalb des MFC wurden ausführlich untersucht und eine Zusammenfassung dieser gefundenen Interaktionen ist in Abb. 1.7 dargestellt.

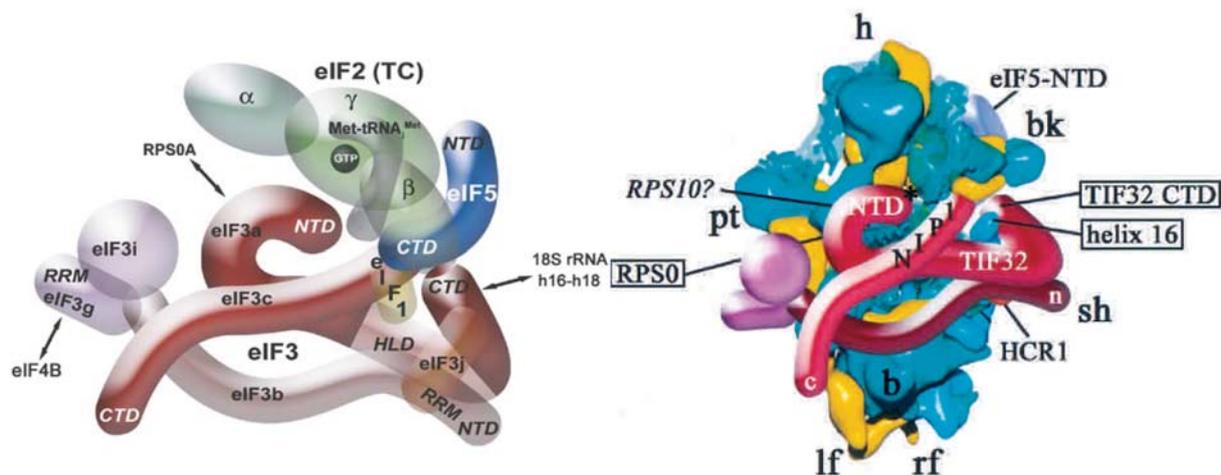


Abb.1.7: Interaktionen innerhalb des MFC und Modell der eIF3-40S Interaktion

Links: Interaktionen innerhalb des MFC in *S. cerevisiae*. TC = ternärer Komplex; CTD = C-terminale Domäne, NTD = N-terminale Domäne, HLD = Hcr1-ähnliche Domäne, RRM = RNA Erkennungsmotiv. Nach (Hinnebusch, 2006). Rechts: Modell der Interaktion von eIF3 mit der 40S ribosomalen Untereinheit nach (Valasek et al., 2001b). Gezeigt ist die dem Zytosol zugewandte Seite des Ribosoms. h = Kopf; bk = Schnabel; sh = Schulter; rf = rechter Fuß; lf= linker Fuß; pt = Plattform; b = Körper.

Diese Interaktionsstudien mit dem MFC zeigten, dass jede der drei großen eIF3 Untereinheiten (eIF3a-eIF3c) eine Bindungsstelle für die jeweils anderen zwei Untereinheiten besitzt. Zusätzlich bindet die C-terminale Domäne (CTD) von eIF3b/Prt1, die kleinen Untereinheiten eIF3i/Tif34 und eIF3g/Tif35. Die eIF3 Untereinheit eIF3j/Hcr1, welche in Hefe als substöchiometrische Komponente beschrieben ist, bindet simultan sowohl die N-terminale Domäne (NTD) von eIF3b/Prt1 als auch die CTD von eIF3a/Rpg1 (Hinnebusch, 2006; Valasek et al., 2003). Der Translationsinitiationsfaktor eIF1 wird über Interaktionen mit eIF3a/Rpg1-CTD und eIF3c/Nip1-NTD an den MFC rekrutiert. Die eIF3c/Nip1-NTD bindet zudem auch die CTD von eIF5. Die β -Untereinheit von eIF2 hat zwei kritische Kontaktpunkte mit eIF3, eine direkte Bindung mit der CTD von eIF3a/Rpg1 und eine indirekte

Assoziation *via* eIF5-CTD, die über eIF3c/Nip1-NTD vermittelt wird (Preiss, 2003). Weitere Studien zeigten, dass die NTD von eIF3a/Rpg1 und eIF3c/Nip1 mit dem ribosomalen Protein RPS0A interagieren können. RPS0A ist auf der dem Zytosol zugewandten Seite der 40S ribosomalen Untereinheit lokalisiert. Des Weiteren kann die eIF3a/Rpg1-CTD spezifisch ein Segment der ersten Domäne in der 18S rRNA (Helix 16-18) binden. Zusammengefasst führten diese Interaktionsstudien dazu, ein so genanntes *wrap-around* Modell zu postulieren, dies bedeutet, das eIF3 an die dem Zytosol zugewandten Seite des 40S Ribosoms bindet aber auch Zugang zu der 60S/40S Kontaktstelle hat (Abb. 1.7) (Valasek et al., 2001b). Diese Bindung wird über die CTD von eIF3a/Rpg1 an die 18S rRNA vermittelt, somit sollte sich eIF3a/Rpg1 an der Aminoacyl-Stelle des Ribosoms befinden (Hinnebusch, 2006). eIF2, eIF5 und eIF1 sind an der 60S/40S Kontaktstelle positioniert (Abb.1.7). Dieses Modell wird zum Teil durch die kryoelektronenmikroskopische (Cryo-EM) Rekonstruktion von eIF3 und dem Modell der Interaktion von eIF3 mit der 40S Untereinheit bestätigt (Siridechadilok et al., 2005). Das in Abb. 1.8 gezeigte Modell schlägt ebenfalls vor, dass eIF3 auf der dem Zytosol zugewandte Seite des 40S Ribosoms bindet und ein Fuß von eIF3 in die 60S/40S Kontaktstelle hineinragt. Dieser Fuß ist jedoch nicht wie im Modell von Valasek *et. al* an der Aminoacyl-Stelle positioniert, sondern in der Nähe der Exit-Stelle des Ribosoms. Es wird vermutet dass diese Extension (Fuß) von eIF3 den Kontakt der Untereinheiten verhindert bis eine mRNA Bindung stattfindet.

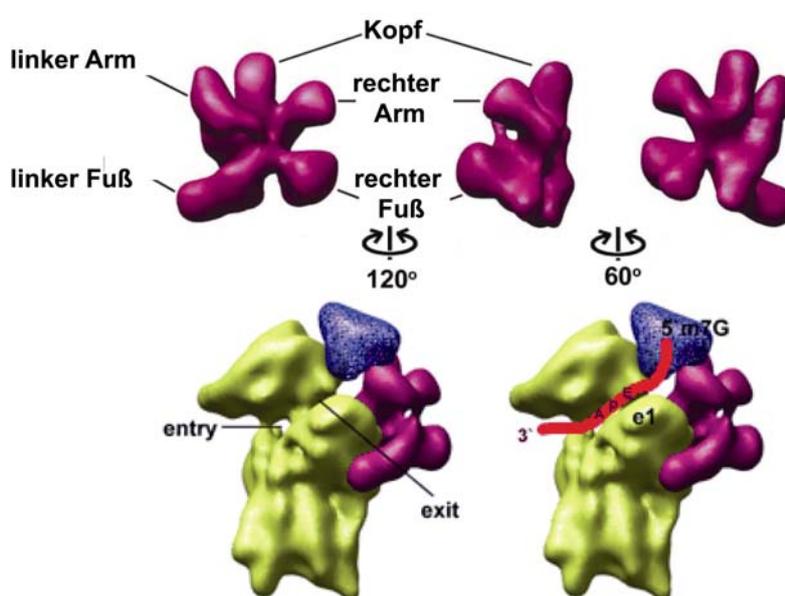


Abb.1.8: Cryo-EM Rekonstruktion des eIF3

Oben: Modell des eIF3 aus verschiedenen Blickwinkeln. Unten: Modell des eIF3 (Magenta) gebunden an eIF4G (dunkelblau) und die 40S ribosomale Untereinheit (gelb). Basierend auf Cryo-EM Rekonstruktionen des humanen eIF4G-eIF3, eIF3-HCV-IRES und HCV-IRES-40S Komplexes. Die mRNA von 5' nach 3' (rot) und die Positionen der A-,P- und E-Stellen des Ribosoms sowie die eIF1 Bindestelle (e1) sind in dem 40S Komplex dargestellt (Siridechadilok et al., 2005).

1.6.2 Bildung des 48S Prä-Initiationskomplexes

Der Translationsinitiationsfaktor eIF3 ist auch für die Bindung des 43S Prä-Initiationskomplexes (PIC) an die mRNA notwendig. Humaner eIF3 interagiert direkt mit der zentralen Domäne von eIF4G, ob dies für die mRNA Bindung von Bedeutung ist, ist unklar. In Hefe ist nicht bekannt welche eIF3-Untereinheit die Interaktion mit eIF4G vermittelt, da keine direkte Interaktion nachgewiesen werden konnte (Preiss, 2003). Vor kurzem wurde jedoch gezeigt, dass in Hefe die mRNA Bindung an 40S Ribosomen unabhängig von eIF4G erfolgen kann (Jivotovskaya et al., 2006). Vor allem eIF3 und eIF2 waren für eine stabile 48S Assemblierung kritisch und nicht eIF4G, der eine kritische Rolle bei späteren Schritten wie dem *Scanning* und der AUG Erkennung spielt (Jivotovskaya et al., 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass möglicherweise eIF3 selbst für die mRNA Rekrutierung zuständig sein könnte, da viele Untereinheiten RNA Bindungsaktivität aufweisen (Hinnebusch, 2006).

eIF4G ist eine Untereinheit des heterotrimeren eIF4F-Komplexes, der an die *cap*-Struktur am 5'-Ende der mRNA bindet (Abb. 1.5). Weitere Untereinheiten von eIF4F sind das *cap*-Bindeprotein eIF4E und die ATP-abhängige RNA-Helikase eIF4A. Die primäre Funktion des *cap*-Bindeproteins eIF4E ist die Bindung des eIF4F-Komplexes an das 5'-Ende der mRNA. eIF4A ist eine DEAD-Box Helikase, die sekundäre RNA Strukturen in der Nähe der *cap*-Struktur entwinden kann. Die Helikase-Aktivität von eIF4A wird verstärkt, wenn eIF4A im Komplex mit eIF4F vorliegt. Eine Verstärkung der Helikase-Aktivität erfolgt auch in Anwesenheit von eIF4B, obwohl keine direkte Interaktion von eIF4B mit eIF4A stattfindet. eIF4B ist ein Homodimer, das durch ein N-terminales RNA-Erkennungsmotiv (RRM) und ein C-terminales Arginin-reiches Motiv RNA binden kann. Das Kernstück von eIF4F ist das Adaptormolekül eIF4G. Die N-terminale Region von eIF4G interagiert mit eIF4E und dem poly-A Bindeprotein PABP. PABPs binden an beiden Enden der mRNA und führen somit zu einer Pseudozirkularisierung der mRNA. In humanen Zellen bindet die zentrale Domäne von eIF4G sowohl an eIF4A, als auch an die mRNA und an eIF3 und trägt somit wesentlich zur Ribosomen-Rekrutierung bei. Die Assemblierung des 43S Komplexes an die 5'-*cap*-Struktur der mRNA wird prinzipiell über das *cap*-Bindeprotein eIF4E vermittelt und mit Hilfe des eIF3 und eIF4G koordiniert, die zahlreiche Kontaktstellen für andere Initiationsfaktoren, die 40S ribosomale Untereinheit und die mRNA besitzen (Preiss, 2003).

1.6.3 Scanning und 80S Komplex Bildung

Nach der Assemblierung des 43S Komplexes in der Nähe des 5'-Endes der mRNA muss der so gebildete 48S PIC das geeignete Startcodon erkennen. Eine lineare Bewegung des 48S PIC entlang der 5' nicht-translatierten Region (5'-UTR) erfolgt bis zu dem ersten AUG Triplett. Dieser Prozess, auch *Scanning* genannt, wurde erstmals von Kozak vorgeschlagen (Kozak, 1978). Das *Scanning* erklärt die Abhängigkeit der meisten mRNAs von der Regel, dass vorwiegend das erste AUG als Startcodon dient, dass benachbart zum 5'-Ende lokalisiert ist.

Experimente mit gereinigten Initiationsfaktoren und Ribosomen, um Zwischenstufen der Initiation zu rekonstituieren, führten zu einer teilweisen Aufklärung des Scanning Mechanismus (Pestova et al., 1998; Pestova and Kolupaeva, 2002). Ein minimaler Komplex aus 40S, eIF3 und dem eIF2-TC kann an ein 5'-Ende einer artifiziellen, unstrukturierten mRNA binden und in Gegenwart von eIF1 das Initiationscodon erreichen und erkennen. Die Bindung des 43S Komplexes an eine strukturierte mRNA erfordert zusätzlich die Präsenz von eIF4B und eIF4F (eIF4A, eIF4G, eIF4E). eIF4F wird nicht nur für die Ribosomen-Rekrutierung benötigt, sondern auch für den *Scanning* Prozess. eIF1 wurde als kritischer Faktor für die Startcodon-Erkennung identifiziert. Biochemische Rekonstitutionsexperimente definierten eine minimale Ausstattung an Faktoren, die notwendig sind, um einen 43S Komplex auf dem Initiationscodon einer typischen mRNA zu assemblieren (Pestova and Kolupaeva, 2002).

Nach der Erkennung des Startcodons durch den 48S PIC und erfolgreicher Basenpaarung zwischen dem AUG und der Anti-Codon Schleife der Initiator tRNA, finden mehrere Ereignisse statt, die dann zur Bindung der 60S ribosomalen Untereinheit führen bzw. zur Ausbildung des 80S Ribosoms, der aktiven Synthesemaschine. Dieser Prozess, die Ausbildung eines Elongationskompetenten 80S Ribosoms erfordert zwei distinkte GTP-Hydrolyse Schritte, die als Kontrollpunkte für die richtige AUG Codonerkennung, sowie als Kontrolle einer korrekten 80S Assemblierung dienen. Dies ist zum einen die GTP-Hydrolyse durch eIF2, die wahrscheinlich durch die Codon-Anticodon Interaktion des AUG mit der Initiator tRNA *getriggert* wird. Diese GTP-Spaltung führt zum Ablösen von eIF2 und wahrscheinlich auch anderen eIFs und dient als Kontrollpunkt für die korrekte AUG-Erkennung. Die zweite GTPase-Aktivität ist zum anderen die GTP-Hydrolyse durch eIF5B, diese wird durch die hinzukommende 60S Untereinheit *getriggert*. Die GTP-

gebundene Form stimuliert diesen Prozess, die GTP-Spaltung erfolgt dann nach einer erfolgreichen 80S Assemblierung, was auch zu einem Ablösen von eIF5B führt. Dies ist der finale Kontrollpunkt, um eine korrekte 80S Assemblierung zu gewährleisten und die Elongationsphase einzuleiten (Preiss, 2003).

1.7 Elongation und Termination

Bei der Elongation findet die geordnete Verknüpfung der Aminosäuren im vorgegebenen Triplet-Takt statt. Im Ribosom gibt es dafür zwei Bindestellen für die beladenen tRNAs, die Aminoacyl-Stelle (A-Stelle) und die Peptidyl-Stelle (P-Stelle). Für die erfolgreiche Erkennung der tRNA in der A-Stelle ist der Elongationsfaktor eEF1a und GTP notwendig. Nach der Dekodierung wird GTP gespalten, eEF1A dissoziiert und anschließend erfolgt die Verknüpfung der Peptidbindung. Zur darauf folgenden Translokation des Ribosoms werden eEF2 und GTP benötigt. Die Translokationsreaktion verschiebt die mRNA und die tRNAs um ein Codon. Die entladene tRNA wird dann an der Ribosomen-Austrittsstelle (E-Stelle) entlassen. Eine mRNA wird meistens von mehreren Ribosomen gleichzeitig besetzt und abgelesen, es handelt sich hierbei um so genannte Polyribosomen. Nach erfolgreicher Peptidsynthese erfolgt die Termination. Dafür werden *Release* Faktoren (eRF1, eRF3; Terminationsfaktoren) benötigt. eRF1 erkennt das Stoppcodon der mRNA und *triggert* so eine Konformationsänderung im Ribosom. Dann erfolgt das Freisetzen der Polypeptidkette. Die Ribosomen müssen nach Erreichen des Stoppcodons von der mRNA abgelöst werden, und vor einer Re-Initiation in ihre Untereinheiten dissoziiert werden (Ribosomenrecycling).

1.8 Die eIF3-Untereinheit eIF3j/Hcr1p

Die einzige nicht-essentielle Untereinheit von eIF3 ist eIF3j/Hcr1p. Für diese Untereinheit ist bekannt, dass sie eine duale Funktion in der Ribosomenbiogenese und der Translationsinitiation spielt. Für das humane eIF3j wurde gezeigt, dass es nur unter bestimmten Bedingungen mit den restlichen eIF3 Untereinheiten assoziiert vorliegt und dann die eIF3-40S Bindung verstärkt (Fraser et al., 2004). Darüber hinaus konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass eIF3j an die Aminoacyl-Stelle und den Eingang des mRNA Bindungskanals der 40S Untereinheit bindet (Fraser et al., 2007). Zusätzlich findet eine Interaktion mit eIF1A statt und führt

zur Reduktion der Affinität der 40S Untereinheit zu mRNA, die wiederhergestellt wird nachdem eine Bindung der Initiator-tRNA erfolgt. Die Autoren vermuten eine regulatorische Funktion von eIF3j auf die Zugänglichkeit des mRNA Bindungskanal (Fraser et al., 2007). In *S. cerevisiae* führte eine $\Delta hcr1$ Deletion zu einem instabilen 43S PIC, sowie zu einer Akkumulation der prä-20S rRNA. Dies weist auf einen prä-40S Ribosomen Prozessierungsdefekt hin (Valasek et al., 2001a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Hcr1p wichtig für die 40S Assoziation des eIF3 ist. Trotz der Beteiligung an solchen essentiellen Schritten führt erstaunlicherweise ein $\Delta hcr1$ Knockout zu keinem letalen Phänotyp. Vor kurzem wurde gezeigt, dass das *Drosophila* Homolog zu eIF3j/Hcr1p, ADAM, sich im Laufverhalten in Saccharose-Gradienten ähnlich wie Rli1p verhält und nicht wie die anderen Untereinheiten von eIF3 (Andersen and Leever, 2007).

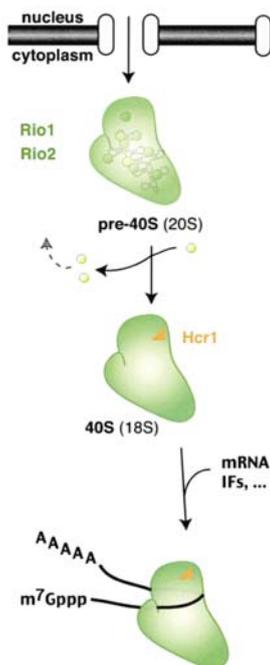


Abb. 1.9: Prä-40S Ribosomenreifung.

Prä-40S Ribosomenreifung und Beteiligung von Hcr1p nach (Fromont-Racine et al., 2003). Das prä-40S Ribosom, das die prä-20S rRNA enthält wird aus dem Nucleus in das Zytoplasma exportiert. Die weitere Reifung findet dort statt. Dies beinhaltet eine Dimethylierungsreaktion sowie die 20S rRNA Prozessierung in die reife 18S rRNA. An diesem rRNA Prozessierungsschritt sind hauptsächlich Rio1 und Rio2 beteiligt. Für Hcr1p wurde jedoch eine wichtige Rolle an diesem letzten Schritt der prä-40S Ribosomenreifung gezeigt (Valasek et al., 2001a; Yarunin et al., 2005). Ein *hcr1* Knockout führt zur Akkumulation der prä-20S rRNA und somit zu einem Prozessierungsdefekt.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war neben der Struktur von *PfuRli1* nur wenig über die zelluläre Aufgabe des Proteins bekannt. Außer der beschriebenen RNase L Inhibition des humanen Rli1 und der Rolle als HIV-1 Capsid-Assemblierungsfaktor war keine weitere Funktion bekannt. Da es sich zudem um ein hoch konserviertes, essentielles Protein handelte, sollte die Funktion von Rli1p in Hefe aufgeklärt werden, da diese kein Homolog zu RNase L besitzen. Das Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe genetischer und biochemischer Methoden die Aufgabe von *Rli1* in *S. cerevisiae*

aufzuklären. Der genetische Teil umfasst die Identifizierung essentieller Domänen in *Rli1*. Des Weiteren sollte versucht werden eine temperatursensitive Mutante herzustellen, die eine Voraussetzung für genetische *Screens* essentieller Gene ist. So könnten dann mit Hilfe eines synthetisch-letalen (SL) *Screens* oder eines *high copy Suppressor* (HCS) *Screens* genetische Interaktoren identifiziert werden, die zur Aufklärung der Funktion des Rli1p beitragen würden. Der biochemische Teil umfasst die Untersuchung der zellulären Lokalisierung und der Interaktionen von Rli1p mit anderen Proteinen, sowie verschiedene Depletionsmethoden um den Funktionsmechanismus von Rli1p aufzuklären. Es wurde zudem untersucht, welche Bedingungen für die Interaktion mit Bindungspartner wichtig sind bzw. welches Protein der direkte Bindepartner ist.

Nachdem die Arbeit bereits begonnen war, konnten Dong *et al.* eine Funktion für Rli1p in der Translation zeigen. Mit Hilfe einer *in vivo* Depletion von Rli1p wurden Defekte in der PIC Assemblierung sowie eine Reduktion der Translationsaktivität gezeigt (Dong *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen standen jedoch im Widerspruch zu der von Kispal *et al.* und Yarunin *et al.* gezeigten Funktion von Rli1p in der Ribosomenbiogenese. Durch eine *in vivo* Depletion von Rli1p konnten die Autoren eine Akkumulation von GFP-fusionierten 60S und 40S ribosomaler Untereinheiten im Zellkern beobachten. Des Weiteren wurden mit diesem System rRNA Prozessierungs-Defekte für beide ribosomalen Untereinheiten aufgezeigt (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Da es sich bei der Translation und der Ribosomenbiogenese um streng regulierte Prozesse handelt, die sich gegenseitig beeinflussen, war nicht klar, welches der primäre Prozess ist für den Rli1p verantwortlich ist. In Zellextrakten mit reduzierter Anzahl an Ribosomen würde man den von Dong *et al.* beschriebenen Effekt ebenfalls beobachten. Umgekehrt kann man einen Effekt auf die Ribosomenbiogenese, wie von Kispal *et al.* und Yarunin *et al.* beschrieben, beobachten, wenn die Translation inhibiert ist. Auch durch eine Translationsinhibition wird mit einem Rückkopplungsmechanismus die Ribosomenbiogenese negativ beeinflusst. Ein modifiziertes Ziel dieser Arbeit war es deshalb, diesen Widerspruch aufzuklären und die primäre Funktion von Rli1p demonstrieren zu können. Dies sollte durch die Entwicklung eines *in vitro* Systems erreicht werden, bei dem die oben beschriebenen sekundären Effekte ausgeschlossen werden können.

2 Ergebnisse

Um die essentielle Rolle von *RLI1* in Hefezellen aufklären zu können, wurden zum einen genetische und zum anderen biochemische Ansätze gewählt. In *S. cerevisiae* als gut untersuchten Modellorganismus sind genetische Methoden etabliert und mit Hilfe der Untersuchung genetischer Interaktionen wurden schon oft erfolgreich Funktionen essentieller Gene aufgeklärt. Kombiniert mit biochemischen Ansätzen sollten Interaktionspartner identifiziert werden und der Funktionsmechanismus des Rli1p untersucht werden.

2.1 Identifizierung essentieller Domänen in RLI1

Eine Möglichkeit, die Funktion eines Proteins aufzuklären, ist eine Mutationsanalyse funktionaler Domänen. Darüber hinaus war die Struktur des homologen *P. furiosus* (*Pfu*) RLI1 bekannt (Karcher et al., 2005), und somit konnte gezielt anhand konservierter Bereiche und Vorhersagen über die Funktion der betreffenden Domänen eine Mutationsanalyse durchgeführt werden. Da es sich bei *RLI1* um ein essentielles Gen handelt, musste vor der Durchführung der Mutationsanalyse ein so genannter *shuffle* Stamm hergestellt werden was in folgendem Abschnitt 2.1.1 näher beschrieben wird.

2.1.1 Herstellung eines *RLI1 shuffle* Stamms

Um essentielle Domänen in *RLI1* identifizieren zu können, wurde zuerst ein *shuffle* Stamm hergestellt. Dies bedeutet, dass man einen $\Delta rli1$ *Knockout* mit einem Plasmid komplementiert, welches das Wildtyp (WT)-*RLI1* trägt. Dieses WT-Plasmid kann dann durch eine Behandlung mit 5'-Fluororot-säure (5'-FOA) eliminiert werden und gegen ein genetisch modifiziertes *rli1*-Plasmid ausgetauscht werden. Dieses Vorgehen ist notwendig um essentielle Gene wie z.B. *RLI1* zu untersuchen, da ein *Knockout* letal ist und nur auf diesem Wege die Auswirkung eines gezielt mutierten *rli1* untersucht werden kann.

Durch homologe Rekombination wurde in einem diploiden WT-Stamm (*RLI1/RLI1*) ein Allel von *RLI1* durch den Marker *HIS3* ersetzt, was zu einem heterozygoten *RLI1/Δrli1-Knockout* führte. Mittels PCR-Analyse und Southern Blot Analyse konnte

dieser heterozygote *Knockout* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde dieser diploide, heterozygote *RLI1/rli1* Stamm mit einem *URA3*-Plasmid transformiert, welches ein WT-*RLI1* Gen trägt (RJP807). Um möglichst physiologische Bedingungen für die Expression von *RLI1* zu erhalten, wurde der endogene Promotor beibehalten, sowie auch die 3'-flankierende Bereiche, die wesentlich zu einer korrekten Expression des Gens führen. Durch Sporulation des heterozygoten *RLI1/Δrli1* Stammes und anschließender Tetradenanalyse wurde der gesuchte *shuffle* Stamm identifiziert, der sowohl den *Δrli1 Knockout (HIS3+)* als auch das komplementierende *URA3-RLI1*-Plasmid trägt. Dieses *URA3-RLI1*-Plasmid kann durch Selektion der Zellen auf 5'-FOA eliminiert werden. Unter diesen Bedingungen müssen die Zellen das WT-Plasmid (*URA3-RLI1*) verlieren, da 5'-FOA toxisch für *URA+* Zellen ist. Mit Hilfe dieses *shuffle* Stamms konnten nun die Auswirkung von Mutationen in *RLI1* analysiert werden.

2.1.2 Ortsspezifische Mutagenese und Wachstumstest auf 5'-FOA

Um für die Proteinfunktion essentielle Domänen zu identifizieren, wurden Punktmutationen an verschiedenen Stellen in *RLI1* eingeführt. Die ausgetauschten Aminosäuren wurden anhand der bekannten Struktur des *Pfu* *RLI1* in Zusammenarbeit mit K.P. Hopfner und A. Karcher ausgewählt. Die Mutationsanalyse umfasst neben den zwei hoch konservierten ABC-ATPase Domänen und den zwei FeS *Cluster* Bindungsdomänen auch die konservierten *Hinge* I- und *Hinge* II-Domänen (Abb. 1.3). Die *Hinge*-Domänen stellen *RLI1* spezifische Domänen dar, die nicht in anderen ABC-ATPasen gefunden wurden. Darüber hinaus wurden auch Aminosäuren untersucht die im *helix-loop-helix* (HLH)-Motiv lokalisiert sind, da dieser Bereich zwar hoch konserviert ist, in anderen ATPasen jedoch nicht gefunden wird und als potentielle Substratbindungsstelle dienen könnte. Ein anderes Kriterium für die Auswahl der zu untersuchenden Domänen, war die Untersuchung des Arginin-*Clusters*, welches die Interaktion der zwei *Hinge* Domänen untereinander vermittelt. Des Weiteren wurde anhand der Struktur versucht eine konditionale Mutante vorherzusagen (K.P. Hopfner, persönliche Mitteilung). Die Einführung von Mutationen in nicht-konservierten, aber essentiellen Strukturelementen sollten die Vorhersagen bestätigen (Tab. 2.1 in blau markierte Aminosäurepositionen). Das Ergebnis der Mutationsanalyse von *RLI1* in den oben beschriebenen wichtigen

Struktur-Domänen sowie das Wachstumsverhalten dieser Mutanten auf 5'-FOA ist in Tab. 2.1 zusammengefasst.

Die Mutationsanalyse in den betreffenden Domänen wurde wie folgt erreicht. Ein *LEU2*-Plasmid (RJP810), das den selben codierenden Bereich für *RLI1* enthält wie das bereits oben beschriebene *URA3-RLI1*-Plasmid (RJP807), wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR so verändert, dass die eingeführte Punktmutationen zu den in Tab. 2.1 dargestellten Aminosäuresubstitutionen führten. Die korrekte Positionierung der Punktmutationen wurde mittels Sequenzierung überprüft. Nach Transformation in den *shuffle* Stamm konnten nur die Stämme das *URA3-RLI1*-Plasmid (RJP807) verlieren, deren *LEU2*-Plasmid eine nicht essentielle Mutation in *RLI1* aufwies. Dies wurde dann durch Wachstum der Zellen auf 5'-FOA Selektionsplatten sichtbar gemacht. Sterben die Hefen unter diesen Bedingungen, können sie das *URA3-RLI1*-Plasmid nicht verlieren und somit hat die Aminosäuresubstitution die Proteinfunktion zerstört. Wachsen die Zellen, hat der Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Proteinfunktion.

Tab. 2.1: Zusammenfassung der untersuchten Aminosäuresubstitutionen.

Aminosäurepositionen und entsprechende Substitutionen in *RLI1* und Wachstumsverhalten auf 5'-FOA. Die Mutanten wurden durch Selektion auf 5'-FOA auf ihre Funktionalität überprüft. + kennzeichnet Mutanten, die auf 5'-FOA-Medium wachsen können und demzufolge nicht-letale Aminosäuresubstitutionen aufweisen. – kennzeichnet Mutanten, die auf 5'-FOA-Medium nicht wachsen können und demzufolge letale Aminosäuresubstitutionen aufweisen (rot). Blau markiert sind die Aminosäuresubstitutionen, die als potentielle konditionale Mutante vorhergesagt wurden (K.P. Hopfner, persönliche Mitteilung).

Aminosäureposition/ Substitution	5'- FOA	Aminosäureposition/ Substitution	5'- FOA	Aminosäureposition /Substitution	5'- FOA
C29A	+	R328E	+	R580A	+
C65A	-	Q346R	+	P581A	+
C29A, C65A	-	T389A	+	R582A	+
K35A	+	K391A	-	I583A	+
K63A	+	Q420A	-	N584A	+
K65A	+	I422V	+	K585A	+
K116A	-	T429E	+	L586A	+
K116W	-	R431A	+	D587A	+
P129S	+	L433A	+	S588E	-
R148A	+	K453Q	+	Q589A	+
L152A	+	K453A	-	D591A	+
Q171A	-	D462A	+	K592A	+
L190A	+	E464Q	+	E593Q	+
E196Q	+	V465A	+	Q594E	+
Q210I	+	S469R	-	K595A	+
S223R	-	E493Q	-	S596A	+
E247Q	-	P494N	+	S597A	+
R265E	+	R573E	-	G598A	+
R311E	-	P576S	+	N599A	+

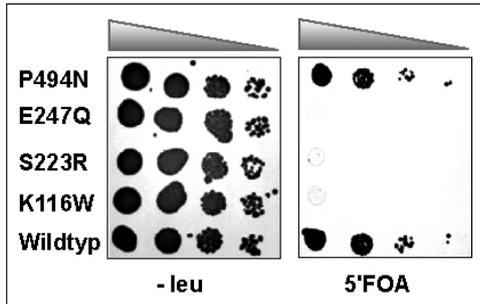


Abb. 2.1: Wachstumstest auf 5'-FOA.

Auf -leu Medium werden die Zellen auf das mutagenisierten *LEU2*-Plasmiden selektioniert. Auf 5'-FOA Selektionsplatten zeigte sich dann die Letalität des betreffenden Aminosäureaustauschs. Hier sind als Beispiel die Mutationen in der ersten NBD (E247Q; S223R, K116W) gezeigt, die zu einem nicht funktionalen *Rli1* führten. Als Beispiel für eine nicht-letale Aminosäuresubstitution wurde *rli1pP494N* gewählt. Als Kontrolle für den Einfluss von 5'-FOA auf nicht-modifizierte Zellen wurde ein Wildtyp-Stamm verwendet.

In Tab. 2.1 sind die verschiedenen Punktmutationen bzw. Aminosäuresubstitutionen und deren Wachstumsverhalten auf 5'-FOA zusammengestellt. Abb. 2.1 zeigt ein Beispiel für das Wachstumsverhalten der Hefen auf -leu und 5'-FOA Selektionsplatten. Wie erwartet, ist das hoch konservierte 4Fe-4S-*Cluster* essentiell für die Proteinfunktion. Der Austausch einer Bindungsstelle (C65A) für das zweite 4Fe-4S-*Cluster* führte zu einem nicht-funktionalen Rli1p, wohingegen der Austausch von C29→A noch zur richtigen Koordination des ersten 4Fe-4S-*Clusters* führte, und somit zu einer Komplementation des $\Delta rli1$ *Knockouts*. Es konnte auch gezeigt werden, dass wie vorhergesagt, beide NBDs essentiell für die Proteinfunktion sind. Alle Mutationen im konservierten Walker A-, *Signature*- und Walker B-Motiv in der NBD1 (K116A; S223R; E247Q) führten zu einem nicht-funktionalen Rli1p. Dies konnte auch für die NBD2 gezeigt (K453A; S469R; E493Q) werden. Des Weiteren wurden in der *Hinge I* (R311E) und *Hinge II* (R573E; S588E) Domäne essentielle Aminosäuren identifiziert, die wichtig für die Funktion sind (Tab. 2.1). Das Ergebnis, der ortsspezifischen Mutagenese ist auch in Abb. 2.2 anhand der bekannten *PabRli1* Vollängen-Struktur zusammengefasst. Die oben beschriebenen letalen Mutationen wurden dann, wie unter Abschnitt 2.8 beschrieben, näher untersucht. Neben den letalen Mutationen, konnte keine Mutation identifiziert werden, die einen konditionalen, temperatursensitiven Phänotyp etablierte. Dies wurde anhand verschiedener Aminosäuresubstitutionen untersucht, die in nicht-konservierten Bereichen lokalisiert waren, jedoch als wichtige Strukturelemente voraus gesagt wurden (K.P. Hopfner, A. Karcher, persönliche Mitteilung). Hierbei handelte es sich vorwiegend um Aminosäuresubstitutionen im Bereich zwischen den Walker A und *Signature* Motiven (Tab. 2.1 blau markierte Aminosäurepositionen). Anhand von Tropftests und Inkubation der Hefen bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C

und 37°C) wurde dies für alle nicht-essentiellen Mutationen (Tab. 2.1) überprüft (Daten nicht gezeigt).

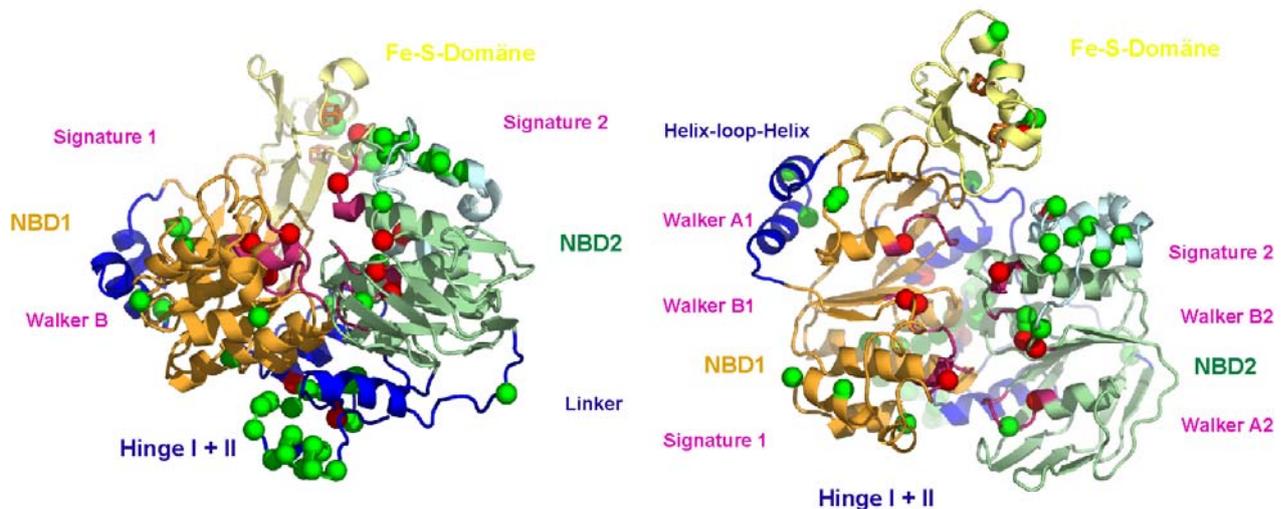


Abb. 2.2 : Übersicht der Mutationsanalyse

Mutationsanalyse von *RLI1* anhand der Struktur dargestellt (A. Karcher, Dissertation LMU München). Links: Seitenansicht; rechts: Draufsicht. In der Struktur in rot markierte Aminosäuren zeigen letale Aminosäuresubstitutionen an; grün markierte Aminosäure zeigen nicht letale Aminosäuresubstitutionen. NBD = Nukleotid Bindedomäne.

2.2 Konditionaler RLI1 Knockout

Da es sich bei *RLI1* um ein essentielles Gen handelt, sollte zur Untersuchung von zellphysiologischen Prozessen, sowie zur Durchführung eines genetischen Screens eine konditionale Mutante hergestellt werden. Zum einen wurde dies versucht durch Herstellung einer temperatursensitiven (ts) Mutante. Diese ist Voraussetzung für einen genetischen Screen mit essentiellen Genen, da deren *Knockout* letal ist. Aus diesem Grund wurde eine Genbank an zufällig eingeführten *rli1* Mutationen generiert. Diese Genbank wurde dann in Hinsicht auf ein verändertes Wachstumsverhalten der Hefezellen bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Zum anderen wurde versucht, einen *RLI1* *Knockdown* zu erreichen. Dies bedeutet, dass auf Proteinebene nach Repression der Genexpression oder Fusion mit einer Destruktions-Markierung, Rli1p *in vivo* depletiert wird, um anschließend pathologische Effekte untersuchen zu können. Beide Ansätze sind in den folgenden Abschnitten näher erklärt.

2.2.1 Herstellung einer temperatursensitiven *rli1* Mutante

Durch ortsspezifische Mutagenese konnte keine ts-Mutante identifiziert werden (Abschnitt 2.1.2), deshalb wurde versucht eine ts-Mutante mittels PCR- oder

chemischer Mutagenese zufällig zu generieren. Die auf diesem Wege zufällig eingeführten Mutationen in *RLI1* generierten eine Genbank an mutanten *rli1* Plasmiden. Diese mutanten *rli1* Plasmide, die ein oder auch mehrere Basen-Substitutionen tragen können, wurden dann in den schon unter 2.1.1 beschriebenen *shuffle* Stamm transformiert. Durch eine 5'-FOA Selektion wurde dann das WT-*RLI1*-Plasmid eliminiert und die Genbank der *rli1* Mutanten hinsichtlich eines veränderten Wachstums bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Dieser *Screen* wurde mehrmals wiederholt, ohne dass eine genetisch stabile ts-Mutante hergestellt werden konnte.

2.2.1.1 Chemische Mutagenese

Abb. 2.3 zeigt ein Beispiel für die gefundenen ts-Kandidaten des ersten ts-Screens, der mit Hydroxylamin als Mutagen durchgeführt wurde. Aus ungefähr 11.000 untersuchten Kolonien wurden die Kandidaten 3, 7 und 11 näher untersucht, die wie in Abb. 2.3 gezeigt schlechteres bzw. kein Wachstum bei 37°C zeigten. Die für diesen hitzesensitiven Phänotyp verantwortlichen Punktmutationen wurden mittels Sequenzierung ermittelt. Dazu wurden die Plasmide aus den Kandidaten isoliert. Es wurde ein Aminosäureaustausch an Position 479 (Kandidat 3), 454 (Kandidat 7) und 462 (Kandidat 11) gefunden (Abb. 2.3).

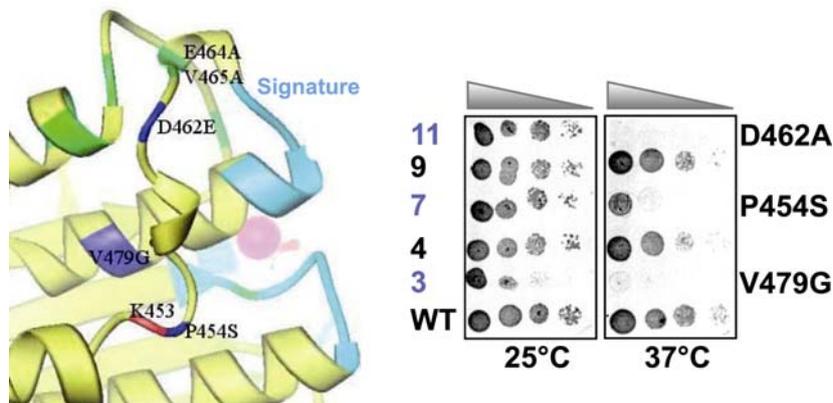


Abb. 2.3: Kandidaten des ts-Screens.

Für die Kandidaten des ts-Screens identifizierte Aminosäuresubstitutionen an Position V479→G (Kandidat 3), P454→S (Kandidat 11) und D462→E (Kandidat 7). Links: identifizierte Aminosäuresubstitutionen (blau) dargestellt anhand eines Ausschnittes des ersten *Signature* Motivs der NBD1 modifiziert nach (Karcher et al., 2005). Rechts: Tropftest der identifizierten Kandidaten bei 25°C und 37°C.

Alle Punktmutationen wurden in der räumlichen Nähe des ersten *Signature* Motivs gefunden. Dies ist ein ungewöhnliches Ergebnis, da normalerweise bei einer

zufälligen Mutagenese die betreffenden Aminosäuresubstitutionen über das ganze Protein verteilt gefunden werden. Die Re-Transformation dieser mutierten Plasmide in den $\Delta rli1$ *Knockout* führte jedoch nicht zu einer Bestätigung des ts-Phänotyps. Erst die Integration in das chromosomale *RLI1* Allel führte zum gewünschten ts-Phänotyp (Abb. 2.4), jedoch stellte sich später heraus (vgl. Abschnitt 2.4.1), dass diese so generierten ts-Stämme genetisch nicht stabil waren und revertierten.

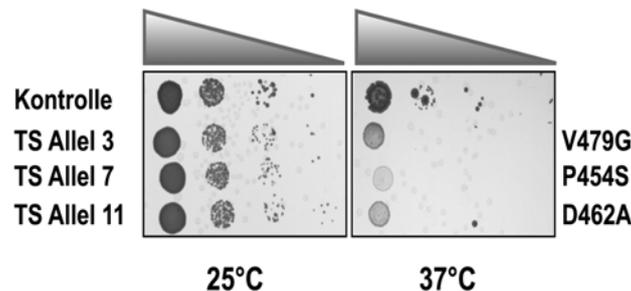


Abb. 2.4: Integration des ts-Allels.

Aus den im ts-Screen identifizierten Kandidaten wurden die Plasmide isoliert und die betreffenden Basensubstitutionen durch Sequenzierung nachgewiesen. Das betreffende ts-Allel wurde dann in ein integratives Plasmid kloniert und über homologe Rekombination chromosomal in das *RLI1* Allel integriert. Der Tropftest zeigt das Wachstum der so manipulierten Stämme bei 25°C und 37°C.

2.2.1.2 PCR-Mutagenese

Mit Hilfe der PCR-Mutagenese und einem anderen Stammhintergrund (RS453), der schon in vielen Fällen zu einer erfolgreichen Herstellung eines ts-Stamms verwendet worden war (K. Sträßer, persönliche Mitteilung), wurde dann ein zweiter *Screen* durchgeführt. Die PCR-Mutagenese wurde so durchgeführt, dass 2-3 Mutationen pro 1000 bp entstehen, was zu einer höheren Mutationsfrequenz führt, als mit einer chemischen Mutagenese (1 Mutation pro 3000 bp) erreicht werden kann. Das mutagenisierte PCR-Produkt wurde dann zusammen mit dem linearisierten Plasmid pRS316 transformiert und mittels Rekombinations-Klonierung in der Hefe zusammengesetzt. Ungefähr 12000 Kolonien wurden hierbei untersucht. Aufgrund der Methode der Rekombinations-Klonierung waren ungefähr 50 % der Zellen tot auf 5'-FOA. Diese hohe Sterberate kommt entweder durch Re-Ligation des leeren Vektors zustande (keine Rekombination) oder dadurch, dass die eingeführten zufälligen Mutationen letal sind. Bei diesem *Screen* wurde zusätzlich nach einem kältesensitiven (cs) Phänotyp gesucht, der einen Wachstumsdefekt bei 20°C aufweist. Dazu wurden 60 Kandidaten näher untersucht. Weiterhin wurden 15

Kandidaten mit einem hitzesensitiven (ts) Phänotyp näher untersucht. Aus allen potentiellen Kandidaten wurden die Plasmide isoliert und in den *shuffle* Stamm re-transformiert. Erstaunlicherweise waren bei der Re-Transformation einige der Kandidaten schon bei der 5'-FOA Selektion tot, bei den Überlebenden konnte nur ein schwach ausgeprägter ts- (Daten nicht gezeigt) bzw. cs-Phänotyp (Abb. 2.5) beobachtet werden.

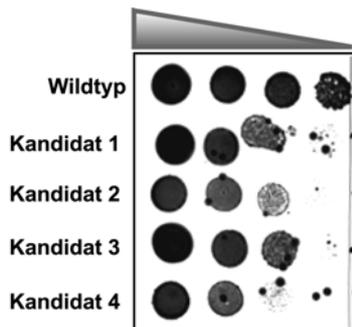


Abb. 2.5: Re-Transformation der Kandidaten Plasmide

Wachstumstest zur Verifizierung von kältesensitiven (cs) Phänotypen. Dazu wurden die Plasmide aus den gefundenen cs-Kandidaten-Stämmen isoliert und in den *shuffle* Stamm zurücktransformiert. Nach der Selektion mit 5'-FOA wurden die betreffenden Stämme auf YEPD-Medium aufgetragen und bei 20°C und 30°C inkubiert. Die Abbildung zeigt den schwach ausgeprägter cs-Phänotyp einiger Kandidaten bei 20°C im Vergleich zu Wildtypzellen.

Trotz mehrfacher Versuche eine ts-Mutante herzustellen, gelang es nicht durch eine Re-Transformation der gefundenen potentiellen ts/cs-Plasmide aus den Kandidaten einen ts-Stamm mit stark ausgeprägten Phänotyp zu generieren (Abb. 2.5). Mit Hilfe der Integration einiger ts-Allele in das *RLI1* Allel konnte ein starker ts-Phänotyp generiert werden, der sich jedoch in späteren Versuchen als genetisch instabil herausstellte (Abb. 2.4).

2.3 Regulierbare Promotoren

Um zellphysiologische Prozesse untersuchen zu können ist es notwendig *RLI1* konditional depletieren zu können. Um diesen konditionalen Abbau von Rli1p *in vivo* zu ermöglichen, sollte die Expression von *RLI1* reprimiert werden. Um dies zu erreichen wurde *RLI1* unter die Kontrolle eines reprimierbaren Promotors kloniert. Nach Repression des Promotors findet keine Expression mehr statt, so dass kein Protein mehr neu gebildet wird. Das in der Zelle bereits vorhandene Protein wird abgebaut. Die Geschwindigkeit dieses Abbaus ist abhängig von der Sensitivität gegenüber zellulären Proteasen. Da sich Promotoren in ihrer Expressionsstärke und Reprimierbarkeit unterscheiden, wurden verschieden starke Galaktose (Gal)-Promotoren (Gal1-10; Gal-S; Gal-L) und ein Tetrazyclin (Tet)-Promotor getestet. Die

Gal-Promotoren werden durch Glukose (Glc) gehemmt und der Tet^{off}-Promotor wird durch Zugabe von Doxycyclin reprimiert.

2.3.1 Galaktose-Promotoren

Die für *RLI1* codierende Sequenz wurde hierzu unter die Kontrolle eines Gal1-10, Gal-L oder Gal-S Promotors kloniert. Die verwendeten Gal-Promotoren unterscheiden sich in ihrer Expressionstärke und Reprimierbarkeit (Janke et al., 2004). Die Plasmide wurden anschließend in den *RLI1 shuffle* Stamm transformiert, und durch Selektion mit 5'-FOA wurde das WT-Plasmid entfernt. Die Zellen konnten nun nur noch in Gal-Medium kultiviert werden, was durch einen Wachstumstest gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Abschalten des Promotors erfolgte dann durch Kultivierung der Zellen in Vollmedium, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot der Kultur entnommen wurde und mittels Western Blot Analyse auf den Rli1p-Gehalt untersucht wurde. Als Kontrolle für einen gleichmäßigen Proteingehalt in den jeweiligen Proben wurde Aktin verwendet. Die schnellste Depletion wurde bei Verwendung des Gal-S Promotors erzielt (Abb. 2.6).



Abb. 2.6: Glukose-Repression

Western Blot verschiedener Zeitpunkte nach einer Glukose Repression des Promotors. *RLI1* wurde unter die Kontrolle eines Gal-Promotors kloniert und in den *rli1* Knockout transformiert. Der so hergestellte Stamm wurde über Nacht in Gal-Medium kultiviert und dann in Vollmedium überführt. Nach 1-6 h, 8 h und 24 h wurde je ein Aliquot der Kultur entnommen, Zellextrakte hergestellt und mit einem Western Blot analysiert. Der Rli1p Gehalt wurde mit einem α -RLI1-Antikörper, der Gesamt-Proteingehalt wurde mit Hilfe von Aktin bestimmt.

Erst 6 h nach Zugabe des Repressors wurde eine Reduktion des Rli1p Signals auf ungefähr 50 % beobachtet, jedoch war auch noch nach 24 h ein deutliches Signal auf dem Western Blot detektierbar. Die Aktin-Ladekontrolle ist nicht so gleichmäßig wie erwartet, sie zeigt aus experimentellen Gründen auch eine Abnahme bei den Zeitpunkten 8 h und 24 h, was dafür spricht dass das Rli1p-Signal eigentlich noch stärker ist als in Abb. 2.6 gezeigt. Aufgrund dieses langsamen Abbaus von Rli1p war

dieses System in Hinsicht auf die Generationszeit von *S. cerevisiae* (ca. 2 h) zur weiteren Untersuchung ungeeignet.

2.3.2 Tet^{off}-Promotor

Um einen schnelleren Abbau von Rli1p zu erreichen, wurde ein Tet^{off}-Promotor verwendet. Dies ist ein Promotor, der besser reprimierbar ist und zudem abhängig von der Konzentration des zugegebenen Hemmstoffes stufenweise reguliert werden kann. Dazu wurde die für *RLI1* codierende Sequenz unter die Kontrolle eines Tet^{off}-Promotors kloniert und in den *rli1 Knockout*, mit Hilfe des *shuffle* Stamms, transformiert. Die Expression wurde durch Zugabe von Doxycyclin reprimiert. Der Abbau von Rli1p wurde anhand eines Western Blots nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Promotor-Repression analysiert (Abb. 2.7).

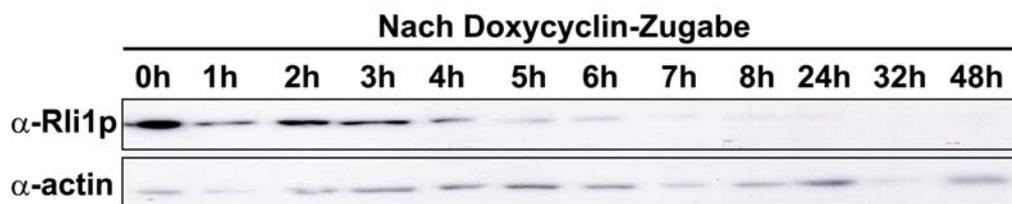


Abb. 2.7: Doxycyclin-Repression

Western Blot verschiedener Zeitpunkte nach einer Doxycyclin-Repression des Tet^{off}-Promotors. *RLI1* wurde unter die Kontrolle eines Tet^{off}-Promotors kloniert und in den *rli1 Knockout* transformiert. Der so hergestellte Stamm wurde in Medium mit 2 μ g/ μ l Doxycyclin überführt. Nach 0-8 h, 24 h, 32 h und 48 h wurde je ein Aliquot der Kultur entnommen, Zellextrakte hergestellt und mit einem Western Blot analysiert. Der Rli1p Gehalt wurde mit einem α -RLI1-Antikörper, der Gesamt-Proteingehalt wurde mit Hilfe von Aktin bestimmt.

Abb. 2.7 demonstriert, dass der Abbau von Rli1p wesentlich schneller erfolgte als mit den in Abschnitt 2.3.1 verwendeten Gal-Promotoren. Nach ca. 5 bis 6 h beobachtete man eine deutliche Abnahme der Rli1p Konzentration, der vollständige Abbau des Proteins wird nach 7 bis 8 h erreicht. Verglichen mit der Generationszeit von Hefe (ca. 2 h), ist dies immer noch ein zu langer Zeitraum und somit ist keines der Systeme geeignet, um pathologische Prozesse bei Rli1p-Verlust zu untersuchen.

2.3.3 Degradation mit einer UBI-R Destruktions-Markierung

Eine Alternative zu einer einfachen Promotor-Repression ist der schnellere Abbau eines Proteins, der mit Hilfe einer so genannten Destruktions-Markierung erreicht

werden kann (Varshavsky, 1996). Abb. 2.8 zeigt die dafür notwendige Aminosäuresequenz, die N-terminal an das Zielprotein fusioniert wird und damit durch das Ubiquitin/Proteasom-System erkannt und abgebaut wird. Diese UBI-R Markierung besteht aus einem abspaltbarem Ubiquitin (UBI), einem N-terminalen, destabilisierenden Arginin und zwei Lysinen, die an den Aminosäure-Positionen 15 und 17 lokalisiert sein müssen. Zudem ist deren Abstand zum Zielprotein wichtig, ein *Linker* von ungefähr 30 Aminosäuren führt zur optimalen Erkennung durch das Ubiquitin/Proteasom-System. Die in Abb. 2.8 dargestellte Aminosäuresequenz wurde N-terminal an Rli1p fusioniert und durch Kombination mit einem reprimierbaren Gal-Promotor soll erreicht werden, dass kein neues Protein mehr gebildet wird. Das in den Zellen bereits vorhandene markierte Zielprotein wird von dem Ubiquitin/Proteasom-System erkannt und abgebaut. Abb. 2.8 zeigt das Ergebnis für den Abbau des Rli1p-Fusionsproteins anhand eines Western Blots nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Hemmung des Promotors.

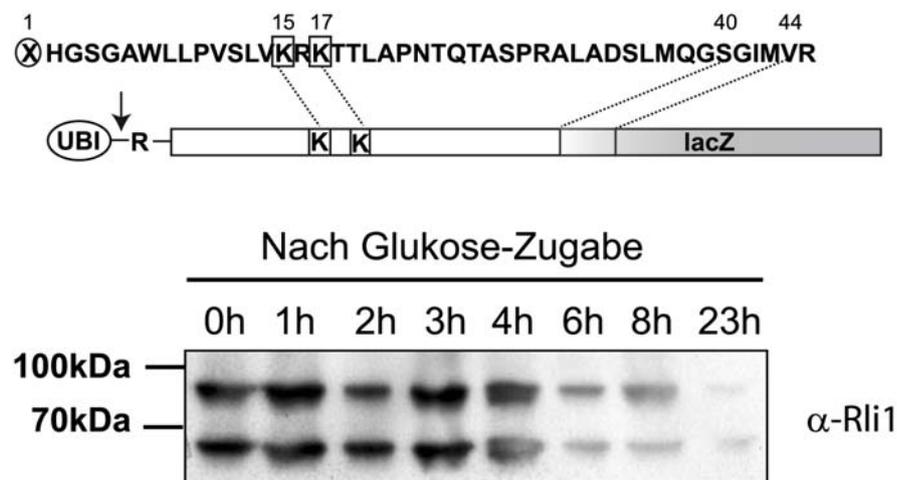


Abb. 2.8: Abbau von Rli1p mit Hilfe der UBI-R Destruktions-Markierung

Die oben dargestellte Aminosäuresequenz wurde N-terminal an Rli1p fusioniert, in einen mit Glc-reprimierbaren Vektor kloniert und anschliessend in den *rli1 Knockout* transformiert. Der so hergestellte Stamm wurde über Nacht in Gal-Medium kultiviert und dann in Glc-Medium überführt. Nach 0-4 h, 6 h, 8 h und 23 h wurde je ein Aliquot der Kultur entnommen, Zellextrakte hergestellt und mit einem Western Blot analysiert. Der Rli1p Gehalt wurde mit einem α-RLI1-Antikörper bestimmt.

Auch mit diesem System konnte kein schnellerer Abbau von Rli1p erreicht werden (Abb. 2.8). Auf dem Western Blot sind zwei Signale zu erkennen, eines bei ca. 90 kDa, das dem UBI-R-Rli1p Fusionsprotein entspricht. Das zweite Signal bei 68 kDa, entspricht Rli1p nach Abspaltung des ca. 30 kDa großen UBI, welches nach der *N-end* Regel (Varshavsky, 1996) abgebaut werden soll (Abb. 2.8). Erst nach 6 h und 8 h nach Zugabe des Repressors wurde eine deutliche Abnahme des Rli1p-Signals

beobachtet. Die Geschwindigkeit des Abbaus eines UBI-R-Rli1p Fusionsproteins unterscheidet sich deshalb nicht wesentlich von der Degradation, die mit einem Tet^{off}-Promotor erreicht wurde (vgl. Abb. 2.7).

2.4 High copy suppressor Screen

Da der Rli1p Abbau mit allen untersuchten Systemen zu langsam erfolgte, und deshalb ungeeignet war, um pathologische Prozesse bei Rli1p-Verlust zu untersuchen, wurde auch versucht die Funktion von *RLI1* auf genetischer Ebene aufzuklären. Eine Methode hierfür ist der *high copy suppressor* (HCS) *Screen*. Das Prinzip beruht darauf, dass durch Überexpression von Proteinen, die von einer Genbank codiert werden, ein letaler oder konditionaler Phänotyp gerettet werden kann bzw. die für den Phänotyp verantwortliche Mutation supprimiert wird. Die Überexpression wird dadurch erreicht, dass die Plasmide in hoher Kopienzahl in einer Zelle vorliegen. Somit kann z.B. ein ts-Stamm überleben, der normalerweise bei 37°C tot ist, falls das entsprechende überexprimierte Plasmid ein Gen trägt welches genetisch mit dem ts-Allel verknüpft ist. Die betreffenden Plasmide der Kandidaten-Suppressoren werden dann aus den überlebenden Zellen isoliert und die darauf liegenden Gene identifiziert. Dieser *Screen* wurde für *RLI1*, einem essentiellen Gen, mit der oben beschriebenen potentiellen ts-Mutante durchgeführt (Abschnitt 2.2.1). Es wurde zudem versucht, den *Screen* mit dem *Rli1 shuffle* Stamm durchzuführen. Dabei wurde nach überlebenden Zellen auf 5'-FOA gesucht.

2.4.1 HCS Screen mit der *rli1^{ts}*-Mutante

Nach der Integration des jeweiligen ts-Allels in das Genom konnten drei Stämme identifiziert werden die einen ts-Phänotyp zeigten (Abb. 2.4). Für einen dieser Stämme (RJP2302) wurde der HCS *Screen* durchgeführt. In diesen wurde die Genbank transformiert, die aus *high copy* Plasmiden besteht, mit einer durchschnittlichen Länge des Inserts von 2000-3000 bp. Das Problem bei dieser Art von *Screen* ist, dass es auch zu spontaner Suppression unter Stressbedingungen kommen kann, die hier durch die Temperatur entsteht. Als Kontrolle für die Häufigkeit solcher spontanen Suppressoren wurde deshalb eine Transformation mit „leeren“ Plasmiden durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollten alle Zellen tot sein. Nach der Transformation mit der Genbank bzw. dem „leeren“ Plasmid wurden die

Transformationsplatten bei 37°C inkubiert, so dass nur diejenigen Zellen wachsen können, die durch Überexpression eines bestimmten Gens gerettet wurden. Trotz des Hintergrundwachstums auf den Kontrollplatten, die spontane Suppressoren repräsentieren, wurden Plasmide aus 312 Kandidaten isoliert und per Restriktionsanalyse untersucht. Anhand der Restriktionsanalyse wurden die Kandidaten in Gruppen eingeteilt, die ein gleiches Restriktionsmuster zeigten. Mittels Sequenzierung wurden dann die Sequenzabschnitte einiger Plasmide der potentiellen Kandidaten-Gruppen identifiziert (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Kandidaten des *high copy suppressor Screen*.

Durch Sequenzierung identifizierte Sequenzabschnitte, die als Suppressoren mit der *rli1^{ts}*-Mutante gefunden wurden.

Koordinaten	ORFs	Funktion
38868-43021	<i>GBP2</i> <i>PEX22</i>	Poly-A Bindeprotein, Export von mRNA Import von peroxisomalen Proteinen
97428-101520	<i>PAU5</i> YFL019C YFLwdelta1	anaerober Stoffwechsel unbekannt unbekannt
290565-294517	YER067W YER066C-A YER067C-A	unbekannt unbekannt unbekannt
455402-458078	<i>DDI1</i>	Durch DNA-Schäden induziertes v-snare Bindeprotein
915577-920084	<i>ADK1</i>	Adenylat Kinase
698313-702453	<i>VMA21</i> <i>YGR106C</i>	Assemblierung V-ATPase unbekannt
268004-273204	<i>MSS2</i> <i>PHO2</i>	Export von <i>cox2</i> mRNA Phosphat Metabolismus
927229-933196	<i>SNC2</i>	Transport von sekretorischen Proteinen

Eine Kontrolle für einen erfolgreichen *Screen* ist auf der einen Seite eine geringe Häufigkeit spontaner Suppressoren, sowie die Identifizierung einiger Kandidaten die das Zielgen, in diesem Fall *RLI1*, tragen. Die Frequenz der spontanen Suppressoren war gering, jedoch konnte *RLI1* nicht als Kandidat identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Durch Klonierung von *RLI1* auf ein *high copy* Plasmid konnte gezeigt werden, dass *RLI1* in hoher Kopienzahl den *ts*-Phänotyp nicht kompensieren kann, dies gelang jedoch mit einer Expression von einem *single copy* Plasmid. Daraus kann man schließen, dass der *Screen* prinzipiell funktionierte, aber eine Überexpression von *RLI1* toxisch sein könnte. Der endgültige Beweis für die Identifizierung eines positiven *high copy* Suppressors ist die Subklonierung der gefundenen Gene in den jeweiligen Sequenzabschnitten (Tab. 2.2) und Re-Transformation in den *ts*-Stamm. Dies konnte jedoch nicht gezeigt

werden, da sich der *ts*-Stamm als genetisch instabil herausstellte und bei 37°C wieder wachsen konnte. Aus diesem Grund kann nur spekuliert werden, dass eventuell die gefundenen Gene *GBP2*, *MSS2* oder die noch unbekanntenen Gene als Suppressoren in Frage kommen. Diese potentiellen Kandidaten sind am mRNA Stoffwechsel beteiligt und könnten so zur später nachgewiesenen Funktion von Rli1p in der Translation passen.

2.4.2 HCS Screen mit dem *rli1 shuffle* Stamm

Da sich der *ts*-Stamm aufgrund der genetischen Instabilität zur Durchführung eines HCS Screens als ungeeignet herausstellte, wurde der Screen mit dem *rli1 shuffle* Stamm durchgeführt. Hierbei wurde nach überlebenden Zellen auf 5'-FOA gesucht. Als Kontrolle für das Auftreten von 5'-FOA resistenten Zellklonen wurden leere Plasmide transformiert. Auf der Kontrollplatte zeigte sich kein Wachstum. Aus den entsprechenden Kandidaten wurden die Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalyse untersucht. Von einigen Plasmiden wurde die Sequenz ermittelt. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Überexpression von *SDT1* den Zellen 5'-FOA Resistenz vermittelte und der *shuffle* Stamm nur aus diesem Grund wieder auf 5'-FOA wachsen konnte. Um diese falsch positiven Kandidaten zu vermeiden, kann dieser Screen nur mit einer Genbank, die dieses Gen nicht enthält durchgeführt werden. Diese Genbank stand jedoch nicht zur Verfügung stand.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der genetische Ansatz nicht erfolgreich war, da weder mit ortsspezifischer noch mit zufälliger Mutagenese eine stabile *rli1^{ts}*-Mutante gefunden werden konnte. Die identifizierten Kandidaten des HCS Screens konnten dadurch auch nicht endgültig als Suppressoren bestätigt werden. Der gezielte oder zufällige Abbau von Rli1p nach der Repression der der Genexpression erfolgte zu langsam, so dass dies auch kein geeignetes System zur weiteren Untersuchung darstellte. Aus diesen Gründen wurde versucht die Funktion von *RLI1*, mit Hilfe biochemischer Methoden aufzuklären.

2.5 Lokalisierung von Rli1p

Für die Aufklärung der Funktion eines Proteins ist es wichtig, dessen Lokalisierung in der Zelle zu kennen und Interaktionen mit anderen Proteinen zu untersuchen. So kann eine Erkenntnis gewonnen werden, in welchem Kompartiment dieses Protein seine Hauptfunktion ausübt. Durch die Identifizierung von Interaktionspartnern

können Rückschlüsse auf die Beteiligung an bestimmten zellulären Prozessen gezogen werden. Um die Lokalisierung von Rli1p in der Zelle zu untersuchen, wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewendet und ein Rli1p-GFP-Fusionsprotein generiert. Diese Rli1p-GFP Fusion ermöglichte es, eine Lokalisierung von Rli1p in lebenden Zellen zu untersuchen. Dazu wurde mit Hilfe der Epitop-Markierung (Wach et al., 1997) eine 3xHA-Markierung oder ein GFP an Rli1p fusioniert (Abb. 2.9).

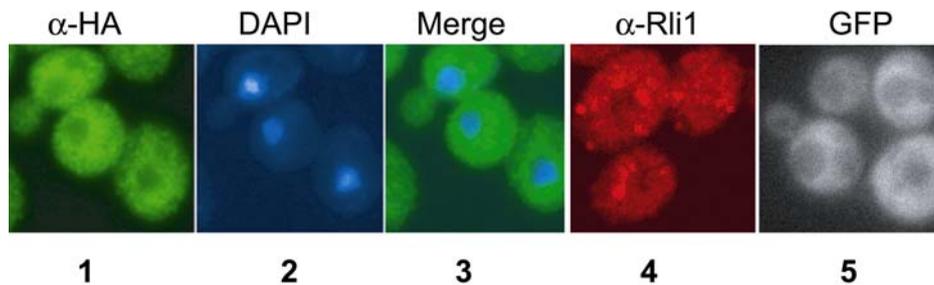


Abb. 2.9: Lokalisierung von Rli1p.

Mikroskopische Aufnahmen von Hefen. Bild 1-3: Stamm mit Rli1p-HA Markierung. Rli1p-HA durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen mit α -HA-Antikörper (Bild 1), Kern-Färbung mit DAPI (Bild 2), Überlagerung des Rli1p-HA und DAPI-Signals (Bild 3).

Bild 4: Wildtypzellen. Rli1p durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen mit einem α -RLI1-Antikörper. Bild 5: Lebendaufnahmen von Zellen, die ein Rli1p-GFP Fusionsprotein exprimieren.

Das Bild 1 in Abb. 2.9 zeigt, die durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem α -HA-Antikörper nachgewiesene Lokalisierung von Rli1p-HA. Gleichzeitige DAPI-Färbung wies die Zellkerne durch Färbung der DNA nach (Bild 2). Um einen Effekt der HA-Markierung auf die Lokalisierung auszuschließen, wurde Rli1p auch in Wildtyp-Zellen mit Hilfe eines α -RLI1-Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Bild 4). Bild 5 zeigt eine Lebendaufnahme von Zellen, die ein Rli1p-GFP Fusionsprotein exprimieren. Mit allen verwendeten Nachweismethoden wurde Rli1p hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle gefunden. Der Zellkern erschien ausgespart, wie in Bild 3 durch eine Überlagerung des Rli1p-HA Signals und des DAPI-Signals gezeigt werden konnte.

2.6 Subzelluläre Fraktionierung

2.6.1 Differentielle Zentrifugation

Um erste Hinweise auf die Interaktionspartner des Rli1p zu erhalten, wurde die Größe eines Rli1p-Komplexes analysiert. Die Co-Migration von

Zellorganellen/Kompartimenten mit Rli1p, wurde mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation untersucht und das Sedimentationsverhalten von Rli1p und einiger Markerproteine der subzellulären Fraktionen (ER, Ribosomen, Mitochondrien und Zytoplasma) ermittelt. Hierfür wurden Zellextrakte eines Rli1p-ProteinA (ProtA) markierten Stamm (RPY1945) hergestellt, durch Zentrifugation bei 1000xg bis 200000xg sedimentiert und die Verteilung des Rli1p-ProtA in den jeweiligen Überständen (S) und Pellets (P) analysiert.



Abb. 2.10: Sedimentationsverhalten von Rli1p-ProtA.

Zellextrakte wurden bei 1000xg, 7000xg, 20000xg und 200000xg zentrifugiert und der Rli1p Gehalt in den jeweiligen Überständen (S) und Pellets (P) mittels Western Blot analysiert. Durch Vergleich der Überstände und Pellets einer Geschwindigkeit sieht man Rli1p-ProtA im P200 angereichert, im dazugehörigen Überstand S200 ist kaum noch Rli1p detektierbar.

Der größte Teil von Rli1p-ProtA sedimentierte bei 200000xg (P200), im dazugehörigen Überstand (S200) war kaum noch Protein zu sehen (Abb. 2.10). In einem weiteren Experiment wurde noch ein zusätzlicher Zentrifugations-Schritt bei 100000xg eingeführt und mit dem Sedimentationsverhalten von Markerproteinen verglichen (Abb. 2.11).

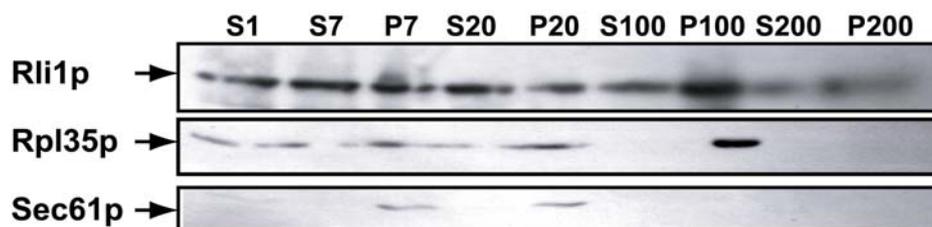


Abb. 2.11: Sedimentationsverhalten von Rli1p-ProtA und Markerproteinen

Sedimentationsverhalten von Rli1p-ProtA. Zellextrakte wurden bei 1000xg, 7000xg, 20000xg, 100000xg und 200000xg zentrifugiert. Anschließend wurden die jeweiligen Überstände (S) und Pellets (P) nach Angleichung des Volumens mittels Western Blot analysiert. Rli1p-ProtA ist vorallem im P100 angereichert, im korrespondierenden Überstand S100 ist kein Rli1p Signal detektierbar. Rpl35p diente als Marker für Ribosomen und Sec61p als ER-Markerprotein.

Es stellte sich heraus, dass Rli1p schon bei einer Zentrifugations-Geschwindigkeit von 100000xg pelletierte (P100), was darauf hindeutet das Rli1 mit einem größeren Komplex assoziiert vorliegt. Die Ribosomen, anhand des Markerproteins Rpl35

gezeigt, pelletierten ebenfalls bei dieser Geschwindigkeit. Größere Strukturen, wie das ER pelletierten schon bei 7000xg bis 20000xg (P7, P20) wie anhand des Sec61 Markerproteins überprüft wurde (Abb. 2.11). Um die Größe des Rli1p-Komplexes näher zu untersuchen, wurden die Zellextrakte über Glycerol-Gradienten und Saccharose-Gradienten aufgetrennt.

2.6.2 Glycerol-Gradient

Die Auftrennung von Zellextrakten über einen 20-40 % Glycerol-Gradient erfolgte durch Zentrifugation für 24 h bei 230000xg (36000 rpm). Die Verteilung von Rli1p in diesem Gradient wurde in den Fraktionen mittels Western Blot nachgewiesen. Anhand der Auftrennung von Markerproteinen (Gelfiltrationsstandard: Thyroglobulin 670 kDa, Rinder Gamma-Globulin 158 kDa, Hühner Ovalbumin 44 kDa) bekannten Molekulargewichts, konnte so die ungefähre Größe des Rli1p enthaltenden Komplexes abgeschätzt werden. Abb. 2.12 zeigte die Verteilung des Rli1p-Komplexes in diesem Gradient.

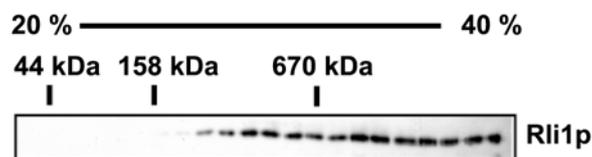


Abb. 2.12: Glycerol-Gradient.

Western Blot eines Glycerol-Gradient. Die Zellextrakte wurden über einen linearen 20 % bis 40 % Glycerol-Gradienten aufgetrennt. Fraktionen wurden gesammelt, gefällt und anschließend mit einem Western Blot analysiert. Die eingezeichneten Molekulargewichte markieren das Laufverhalten der Markerproteine (Gelfiltrationsstandard: Thyroglobulin 670 kDa, Rinder Gamma-Globulin 158 kDa, Hühner Ovalbumin 44 kDa). Eine Anreicherung von Rli1p wurde in den Fraktionen schwerer als 1 MDa nachgewiesen.

Man sieht eine Anreicherung von Rli1p in den Fraktionen höherer Dichte (30-40 % Glycerol), die Größe des Rli1p enthaltenden Komplexes wurde anhand der Markerproteine auf 400 kDa-1 MDa geschätzt. Ungebundenes Rli1p (68 kDa) konnte nicht nachgewiesen werden, was darauf hinweist dass Rli1p mit einem größeren Komplex assoziiert ist. Um die Größe genauer bestimmen zu können, sollte man größere Markerproteine verwenden, diese standen jedoch nicht zur Verfügung.

2.6.3 Saccharose-Gradient

Wie schon bei der differentiellen Zentrifugation beobachtet co-fractionierte Rli1p mit dem ribosomalen Markerprotein Rpl35 (Abb.2.11). Um dies näher zu untersuchen wurden Zellextrakte im 5-45 % Saccharose-Gradient aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 257000xg (38000 rpm) nach Stabilisierung der Polyribosomen durch Cycloheximid-Behandlung. Bei kontinuierlicher Messung der OD₂₅₄ während der Probenentnahme erhält man ein UV-Profil (Abb. 2.13). Bei dieser Wellenlänge wird hauptsächlich der rRNA Gehalt der Probe gemessen. Prominente *Peaks* für Polyribosomen, 80S Ribosomen, 60S und 40S ribosomalen Untereinheiten sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Abb. 2.13 A).

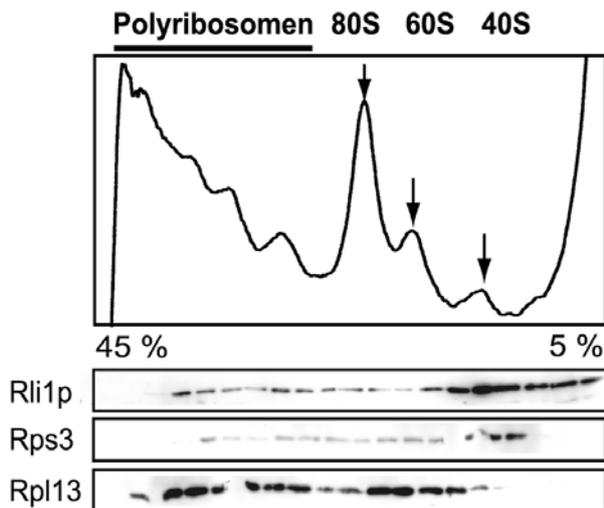


Abb. 2.13: Polyribosomenprofil und Co-Fraktionierung von Rli1p.

Wildtyp-Zellen wurden mit 100 µg/ml Cycloheximid behandelt und anschliessend Zellextrakte hergestellt. Die Auftrennung erfolgte mit einem linearen 5 % bis 45 % Saccharose-Gradienten. Die Gradienten wurden gesammelt während kontinuierlich bei 254 nm gescannt wurde. Positionen der Polyribosomen (Strich), 80S, 60S und 40S Positionen (Pfeil). Western Blot Analyse der Fraktionen. Laufverhalten von Rli1p und den Markerproteinen Rps3 (40S ribosomale Untereinheit) und Rpl13 (60S ribosomale Untereinheit).

Rli1p wurde unter anderem in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert, die sich ganz oben im Gradienten bei 5 % Saccharose befindet (Abb. 2.13). Dieser Anteil entspricht wahrscheinlich dem Rli1p-enthaltenden Komplex, der auch in dem Glycerol-Gradient schon identifiziert wurde (Abb. 2.12). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rli1p hauptsächlich mit 40S ribosomalen Untereinheiten co-fractioniert was anhand des Markerproteins Rps3 nachgewiesen wurde. Ein kleinerer Anteil des Rli1p co-fractioniert mit 80S Ribosomen und Polyribosomen, wohingegen eine Co-Fraktionierung mit 60S ribosomalen Untereinheiten bzw. des Rpl13 Markerproteins, nicht gefunden werden konnte (Abb. 2.13).

2.7 Identifizierung der Interaktionspartner von Rli1p

Um herauszufinden welche Proteine mit Rli1p interagieren, wurde die *Tandem Affinity Purification* (TAP) Methode verwendet (Rigaut et al., 1999). Dazu wurden zwei Protein A-IgG Bindedomänen (ProtA) und ein Calmodulin-Bindepeptid (CBP), die durch eine TEV-Protease Schnittstelle getrennt sind, C-terminal an Rli1p fusioniert. Nach dem ersten Affinitätsschritt an IgG-Sepharose und anschließender spezifischer Elution mit Hilfe der TEV-Protease (TEV-Eluat), erfolgte der zweite Affinitätsschritt durch Bindung an eine Calmodulin Affinitätsmatrix. Die gebundenen Proteine wurden dann mit EGTA eluiert (EGTA-Eluat). Die betreffenden Banden der mit Rli1p co-reinigenden Proteine, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Abb. 2.14).

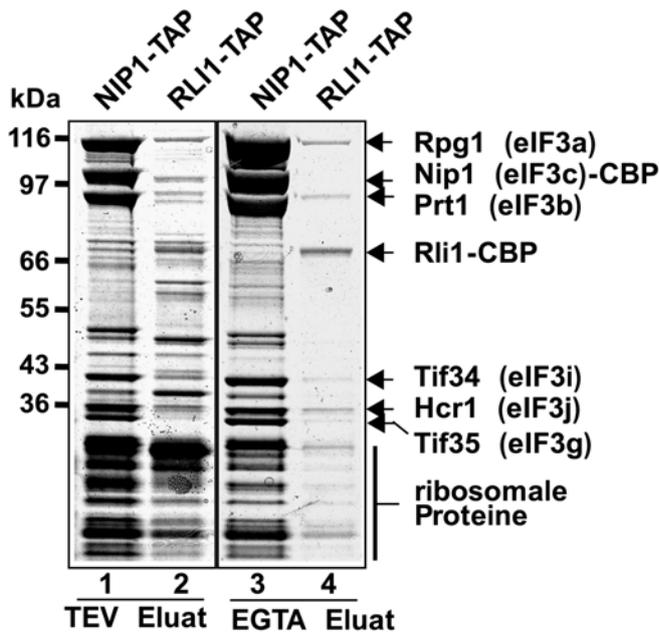


Abb. 2.14: Reinigung des Rli1p Komplex

SDS-PAGE Analyse. In Spur 1 und Spur 2 dargestellt sind die TEV-Eluate einer Rli1p-TAP und Nip1p-TAP Reinigung. In Spur 3 und Spur 4 die dazugehörigen EGTA-Eluate des zweiten Affinitätsschritts. Die co-reinigenden Proteine im Rli1p-TAP Eluat wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie als Untereinheiten des Translations-Initiationsfaktor eIF3 und als ribosomale Proteine identifiziert.

Im EGTA-Eluat der Rli1p-TAP Reinigung (Spur 4) konnten neben ribosomalen Proteinen auch Untereinheiten des Translationsinitiationsfaktor eIF3 identifiziert werden (Abschnitt 1.8). Interessanterweise, wurde nicht der gesamte eIF3 mitgereinigt, obwohl dieser als stabiler Komplex beschrieben ist. Während im TEV-Eluat (Spur 2) alle Untereinheiten von eIF3 zu finden sind, gehen Interaktionen beim zweiten Affinitätsschritt verloren. Hauptsächlich interagierten eIF3a/Rpg1p, eIF3b/Prt1p und eIF3j/Hcr1p mit Rli1p. eIF3c/Nip1p war im EGTA-Eluat nicht zu sehen, wohingegen eIF3i/Tif34p und eIF3g/Tif35p als sehr schwache Banden sichtbar waren.

Um auszuschließen, dass der Bindungsverlust von eIF3 Untereinheiten durch die TAP-Reinigung selbst bzw. den zweiten Affinitätsschritt herbeigeführt wird, wurde zum Vergleich die Reinigung des eIF3-Komplexes am Beispiel von TAP-markierten Nip1p durchgeführt. Das Ergebnis der NIP1-TAP Reinigung ist in Spur 1 und 3 dargestellt. Neben allen co-gereinigten eIF3-Untereinheiten (Rpg1p, Prt1p, Tif34p, Tif35p und Hcr1p) waren noch weitere prominente Banden auf dem Gel zu sehen, die wahrscheinlich andere Initiationsfaktoren, wie eIF2 und eIF5 repräsentieren. Diese Banden wurden jedoch nicht sequenziert. Es zeigte sich, dass unter den verwendeten Bedingungen eIF3 sowie weitere Komponenten des Multifaktor Komplexes stabil gereinigt werden konnten. Somit ist der Bindungsverlust von Nip1p, Tif34p und Tif35p in einer RLI1-TAP Reinigung nicht durch die Methode zu erklären. Zudem konnte anhand der Bandenintensität demonstriert werden, dass nur ein geringer Anteil von eIF3 mit Rli1p assoziiert vorliegt. Ein Western Blot des NIP1-TAP EGTA-Eluats zeigte, dass Rli1p co-gereinigt werden kann (Daten nicht gezeigt), jedoch nicht als stöchiometrische Untereinheit, da keine zu den eIF3 Untereinheiten vergleichbar starke Proteinbande auf dem Coomassie-Gel sichtbar ist. Die gefundenen Interaktionen von Rli1p wurden auch mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation mit markierten eIF3-Untereinheiten (Prt1p-HA, Nip1p-HA, Hcr1p-HA und Tif34p-HA) bestätigt. In allen Fällen konnte eine Interaktion mit Rli1p nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2.7.1 Bedingungen für die Bindung an eIF3 und Ribosomen

Da Rli1p eine ATPase ist, sollte anschließend untersucht werden, ob die Bindung an den Translationsinitiationsfaktor eIF3 und an ribosomale Proteine ATP-abhängig erfolgt. Da die gefundenen Interaktionspartner von Rli1p, eIF3 und Ribosomen, große RNA-Protein Komplexe bilden, wurde auch der Einfluss von RNA auf die Bindung untersucht. Um eine ATP-Abhängigkeit zu zeigen, wurden nach der Bindung an IgG-Sepharose die gebundenen Komplexe entweder mit ortho-Vanadat oder mit Apyrase behandelt. Ortho-Vanadat ist ein Analog des anorganischen Phosphates und arretiert einen Enzymzustand während der ATP Hydrolyse. Die ATPase verbleibt in einer ADP-gebundenen Form. Wohingegen Apyrase ATP in ADP und AMP spaltet. Für die RNA-Abhängigkeit wurde der gebundene Komplex mit RNase A, einer Endonuklease, behandelt. Um nicht mehr gebundene Interaktionspartner zu entfernen, wurde ein Waschschriff eingeführt, bevor Rli1p-TAP mit TEV-Protease

eluiert wurde. Die Proteine, die nach der jeweiligen Behandlung immer noch mit Rli1p-TAP assoziiert vorliegen sind in Abb. 2.15 dargestellt.

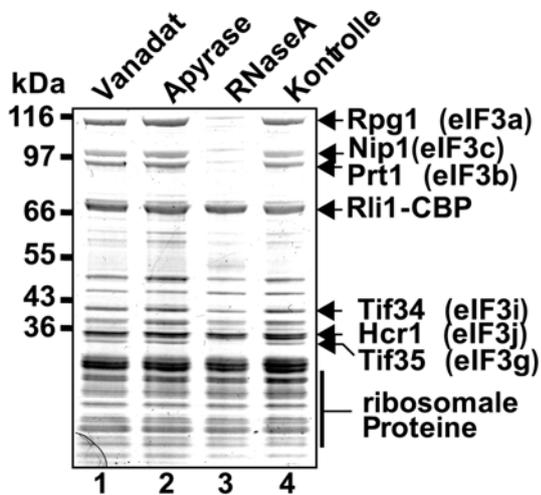


Abb. 2.15: Bindung von Rli1p an eIF3 ist RNA abhängig.

SDS-PAGE Analyse einer Rli1p-TAP Reinigung unter ATP- und RNA-limitierenden Bedingungen. Dargestellt sind die TEV-Eluate nach dem ersten Affinitätsschritt. Nach der Bindung an das Säulenmaterial wurden die gebundenen Rli1p-Komplexe mit ortho-Vanadat (Spur 1), Apyrase (Spur 2) und RNaseA (Spur 3) behandelt. Spur 4 zeigt die Kontrollreinigung ohne Behandlung.

Abb. 2.15 zeigt, dass die Bindung von Rli1p an Ribosomen und eIF3 unter diesen Bedingungen ATP-unabhängig erfolgte. Weder die mit ortho-Vanadat (Spur 1) noch mit Apyrase behandelten (Spur 2) Rli1p-Komplexe zeigten einen Unterschied zur Kontrollreinigung (Spur 4). Eine RNA-Abhängigkeit der Interaktion konnte für die Reinigung mit RNase A behandelten Komplexe nachgewiesen werden (Spur 3). Im Vergleich zur Kontrollreinigung war deutlich weniger Rpg1p, Nip1p und Prt1p gebunden. Auch die Assoziation mit Tif34p wurde beeinflusst, die Menge an co-gereinigtem Protein nahm ebenfalls ab. Die Bindung zu Tif35p konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde die Bindung von Rli1p an Hcr1p und an die ribosomale Proteine durch die RNaseA-Behandlung nicht beeinflusst. Um diesen Bindungsverlust der Interaktionspartner näher untersuchen zu können, wurde das Laufverhalten des Rli1p-Komplexes in einem 20-40 % Glycerol-Gradienten aufgezeigt. Die Zellextrakte wurden mit Apyrase und RNase A behandelt, aufgetrennt und die Verteilung von Rli1 in diesem Gradienten mit einem Western Blot sichtbar gemacht.

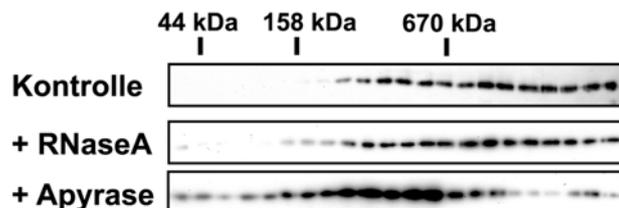


Abb. 2.16: Glycerol-Gradienten mit RNA- und ATP-limitierenden Bedingungen.

Western Blot Analyse der Glycerol-Gradienten der unbehandelten (Kontrolle), der mit RNase A und mit Apyrase behandelten Zellextrakte. Die Auftrennung erfolgte mit einem linearen 20 % bis 40 % Glycerol-Gradienten. Die eingezeichneten Molekulargewichte markieren das Laufverhalten von Markerproteinen.

Wie in Abb. 2.15 gezeigt wurde, führte eine RNaseA-Behandlung zu einem Verlust der Interaktionspartner Rpg1p, Nip1p, Prt1p und Tif35p (351 kDa). Aus diesem Grund wurde auch nach einer RNaseA-Behandlung im Gradient ein leichter Rli1p enthaltender Komplex erwartet. Es konnte jedoch nur eine minimale Verschiebung des Rli1p-enthaltenden Komplexes in die leichteren Fraktionen beobachtet werden (Abb. 2.16). Ein Grund hierfür könnte sein, dass für die Gradienten Zellextrakte verwendet wurden, die eine höhere RNA-Konzentration aufwiesen als die gereinigten Komplexe (Abb. 2.15). Bei gleicher Menge an eingesetzter RNaseA kann so wahrscheinlich kein vollständiger Verlust der Bindungen zu den Interaktionspartnern erreicht werden.

Durch die Apyrase-Behandlung zeigte sich eine deutliche Veränderung des Laufverhaltens der Rli1p enthaltenden Komplexe in die leichteren Fraktionen. Eine Anreicherung von Rli1p, wurde vor allem in einem Bereich von 200-600 kDa beobachtet. Aufgrund der Ergebnisse der Reinigung (Abb. 2.15) wurde dies nicht erwartet, da die Apyrase-Behandlung nicht zu einem Bindungsverlust von Interaktionspartnern führte. Für die Glycerol-Gradienten (Abb. 2.16) wurden jedoch Zellextrakte verwendet und keine gereinigten Komplexe, auf die möglicherweise die Apyrase keinen Effekt hat. Dieses Experiment demonstrierte, dass eine ATP-Depletion durch Apyrase in Zellextrakten zu einem kleineren Rli1p enthaltenden Komplex führte.

2.7.2 Bindung von rRNA an Rli1p

Die Behandlung mit RNaseA zeigte, dass die Bindung von Rli1p zu eIF3 teilweise über RNA vermittelt wird (Abb. 2.15). Zur Identifizierung der RNA im Rli1p-Komplex wurde eine TAP-Reinigung durchgeführt, die RNA aus dem EGTA-Eluat isoliert und mit einem Northern Blot analysiert (Abb. 2.17). Als Positiv-Kontrolle wurde RNA von Zellextrakten und aus dem Eluat einer Nip1p-TAP Reinigung isoliert. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Reinigung mit einem Wildtyp-Stamm durchgeführt, um unspezifische Bindung von RNA an die IgG-Sepharose auszuschließen. Da Rli1p mit Ribosomen interagiert (Abb. 2.14), lag es nahe dass es sich bei der RNA um ribosomale RNA handelte. Es wurden Sonden gegen die 20S und 18S rRNA der 40S ribosomalen Untereinheit gewählt, wobei die 20S rRNA ein Vorläufer der 18S rRNA ist.

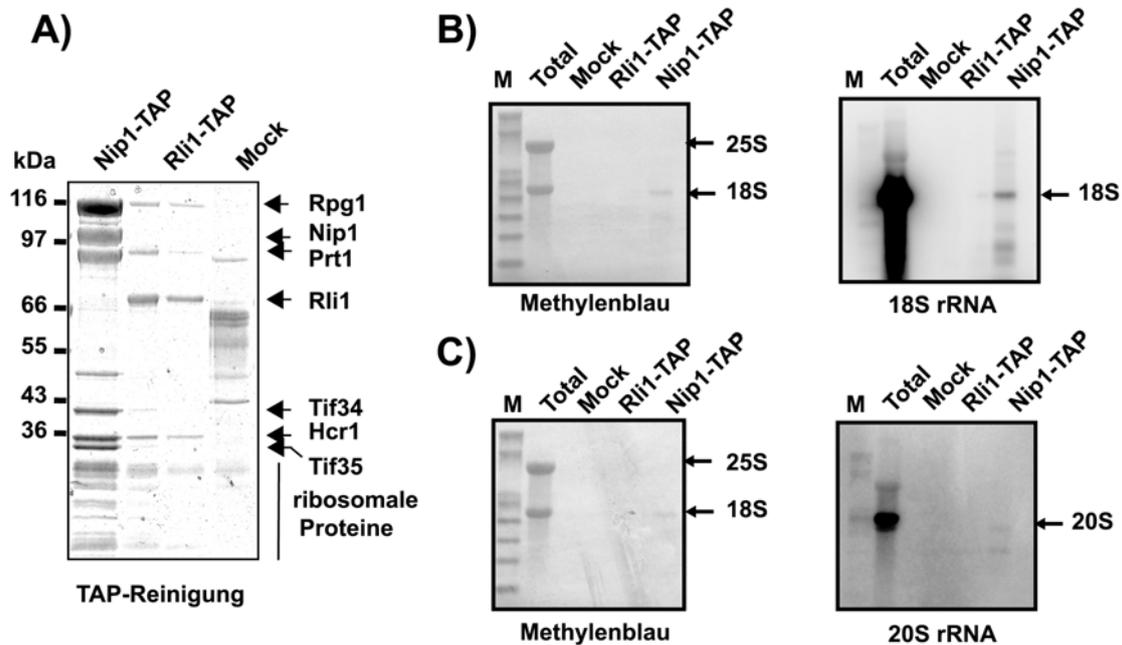


Abb. 2.17: rRNA Assoziation mit dem Rli1p Komplex.

A) Proteingel der EGTA-Eluat von Nip1p-TAP, Rli1p-TAP und der Mock Reinigung. B) Links: Methylenblaufärbung der transferierten RNA. Die Pfeile markieren die Positionen der 25S und 18S rRNA. Rechts: Autoradiographie der Membran inkubiert mit einer Sonde gegen 18S rRNA. C) Links: Methylenblaufärbung der transferierten RNA. Die Pfeile markieren die Positionen der 25S und 18S rRNA. Rechts: Autoradiographie der Membran inkubiert mit einer Sonde gegen 20S rRNA.

Die TAP-Reinigungen von Nip1p, Rli1p und des Wildtyp-Stamms sind anhand eines Proteingels in Abb. 2.17 A gezeigt. Damit konnte demonstriert werden, dass die Komplexe in ausreichenden Mengen und ohne zusätzliche unspezifische Proteine gereinigt werden konnten. Die aus den Eluaten isolierte RNA wurde dann über ein Formaldehyd-Gel aufgetrennt, und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Methylenblaufärbung wies den erfolgreichen Transfer der RNA nach, bevor mit den radioaktiv markierten 18S-(Abb. 2.17 B) und 20S-(Abb. 2.17 C) Oligo-Sonden hybridisiert wurde. Überraschenderweise sah man bereits mit der relativ unsensitiven Methylenblaufärbung ein deutliches 18S Signal für die RNA, die aus dem Nip1p-TAP Eluat isoliert wurde. Nach der radioaktiven Markierung konnte für die eIF3-Reinigung mit beiden verwendeten Sonden ein Signal nachgewiesen werden. Für das Eluat der Rli1p-Reinigung konnte nur ein sehr schwaches Signal für die 18S rRNA detektiert werden, was mit der Menge an co-reinigenden Ribosomen übereinstimmt. Das Ergebnis demonstrierte, dass Rli1p mit 18S rRNA interagiert, ob es sich dabei um eine direkte Interaktion oder über eine eIF3/ribosomale Proteine vermittelte Interaktion handelt blieb unklar.

2.8 Untersuchung der letalen *rli1* Mutanten

Die Ergebnisse der Rli1p-TAP Reinigung zeigten, dass eine ATP-unabhängige aber RNA-abhängige Bindung zu manchen Interaktionspartnern gefunden wurde (Abb. 2.15). Im Glycerol-Gradient führte eine Apyrase-Behandlung jedoch zu einem leichteren Rli1p-Komplex (Abb. 2.16). Um dies näher zu untersuchen wurden die in Abschnitt 2.1.2 identifizierten letalen Punktmutanten verwendet. Neben den zwei mutanten ATPase-inaktiven Proteinen (*rli1pK116A*; *rli1pK453A*) und dem mutanten FeS Cluster Protein (*rli1pC65A*), wurden auch das mutante *Hinge I* (*rli1pR311E*) und das mutante *Hinge II* (*rli1pR573E*) *rli1p* untersucht.

2.8.1 Reinigung der mutanten *rli1p*-Proteinvarianten

Um herauszufinden, welchen Effekt die Aminosäuresubstitution in den essentiellen Domänen auf die Proteinfunktion und die Bindung zu den Interaktionspartnern des Rli1p haben, wurde das WT-Rli1p und die ausgewählten letalen Proteinvarianten (2.1.2) mit einem TAP markiert (Abb. 2.18) und durch Expression unter Galaktose-Promotor-Kontrolle (pGal) in einem *NIP1*-HA markierten Stamm hergestellt und gereinigt (Abb. 2.19). Die Expression der mutanten Proteine in dem *NIP1*-HA Stamm führten nicht zu einem Wachstumsdefekt, was anhand eines Tropftests auf Gal- und Glc-Platten überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Der Wachstumstest demonstrierte, dass die Expression von mutantern *rli1p* unter diesen Bedingungen nicht zu einem dominant-negativen Phänotyp führte (vgl. Abschnitt 2.9).

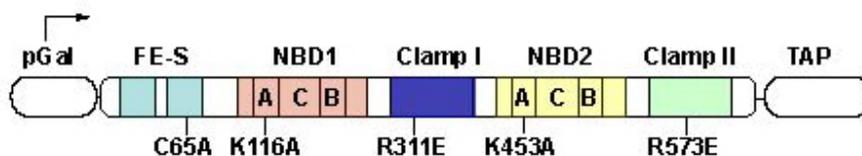


Abb. 2.18: Schematische Darstellung der mutanten *rli1p*-Proteine

Schematische Darstellung der Konstrukte, die für die Reinigung der *rli1p*-Proteinvarianten verwendet wurden. Alle Konstrukte wurden mit einem Gal-Promotor (pGal) exprimiert und sind mit einem TAP markiert.

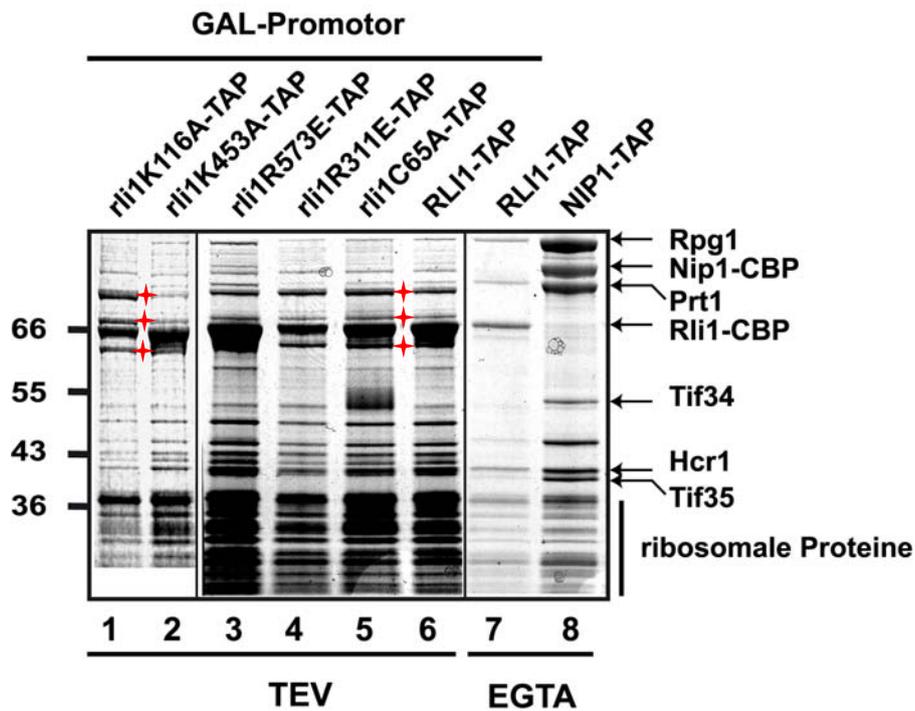


Abb. 2.19: TAP Reinigung der rli1p-Proteinvarianten (aus Abb. 2.18)

Reinigungen der mit Gal-Promotor (pGal) exprimierten Rli1p-TAP und rli1p-TAP Proteinvarianten (Spur 1-6). Kontrollreinigungen mit chromosomal integrierter TAP-Markierung: eIF3 Reinigung mit einer Nip1p-TAP Markierung (Spur 7) und Rli1p-TAP (Spur 8). Expression mit pGal: WT-Rli1p (Spur 6), rli1pC65A (Spur 5), rli1pR311E (Spur 4); rli1pR573E (Spur 3); rli1pK453A (Spur 2) und rli1pK116A (Spur 1). Rechts mit Pfeilen markiert sind die durch Massenspektrometrie identifizierten Interaktionspartner von Rli1p. Die roten Sterne markieren Proteinbanden, die als Hitzeschockproteine der HSP90 Familie und HSP60 (Hsc82, Sti1, Hsp60) identifiziert wurden.

In Abb. 2.19 sind die Reinigungen der überexprimierten Rli1p-TAP und rli1p-TAP Proteinvarianten dargestellt. Diese werden in unterschiedlichen Mengen hergestellt. Die gereinigte Menge des WT-Rli1p (Spur 6), des rli1pC65A (FeS *Cluster* Mutante; Spur 5) und des rli1pR573E (*Hinge II* Mutante; Spur 3) unter der Kontrolle des Gal-Promotor waren deutlich höher als dies für die Expression mit einem endogenen Promotor beobachtet werden konnte (vgl. Spur 8). Die mit rotem Stern gekennzeichneten Banden wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie als Hitzeschockproteine (Hsc82, Sti1, Hsp60) identifiziert, die vermutlich aufgrund des höheren Rli1p-Levels in den Zellen gebildet werden. Sie sind auch im Eluat des überexprimierten WT-Rli1p (Spur 6) vorhanden. Im Vergleich zu einer Nip1p-TAP und Rli1p-TAP Reinigung (Spur 7, 8) zeigte sich, dass schon die höhere Expression des WT-Rli1p unter einem Gal-Promotor (pGal) anstatt des endogenen Promotors zu einer Veränderung des Bandenmusters führte (Spur 6). Die Veränderung des

Bandenmusters könnte auch auf die Inkubation der Hefen in unterschiedlichen Medien (Gal-Medium statt Vollmedium) zurückzuführen sein.

Als schwache, nicht stöchiometrische Banden sind die drei großen eIF3-Untereinheiten Rpg1p, Nip1p und Prt1p zu erkennen, wohingegen die drei kleinen Untereinheiten Tif34p, Tif35p und Hcr1p nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Dieses Ergebnis zeigte, dass auch bei einer höheren Rli1p-Menge in den Zellen nicht mehr eIF3 bindet, also keine stöchiometrische Interaktion vorliegt. Die überexprimierten Proteine zeigten keine eindeutige Veränderung der Bindung zu den eIF3 Untereinheiten, aber es wurden mehr ribosomale Proteine co-eluiert. Auch die zwei mutanten ATPase Proteine (Walker A Mutanten; Spur 1; 2) wiesen eine Interaktion zu den eIF3 Untereinheiten auf, jedoch konnten im Vergleich zu den anderen überexprimierten rli1p-Varianten weniger ribosomale Proteine co-gereinigt werden. Die Proteinbanden wurden nicht sequenziert, sondern nur anhand ihrer Größe mit der Rli1p-TAP Reinigung (Spur 8) verglichen. Aus diesem Grund wurde die Interaktion noch näher untersucht. Da keine Antikörper gegen eIF3-Untereinheiten zur Verfügung standen, konnte die Interaktion nur mit Hilfe Epitop-markierter eIF3 Untereinheiten nachgewiesen werden. Dazu wurden die Plasmide, die die rli1p-Proteinvarianten (Abb. 2.18) exprimieren in Stämme mit markierten eIF3-Untereinheiten transformiert und exprimiert. Die markierte eIF3 Untereinheit konnte so mittels Westen Blot detektiert werden. In dem oben genannten Beispiel wurde ein *NIP1*-HA markierter Stamm verwendet (Abb. 2.20).

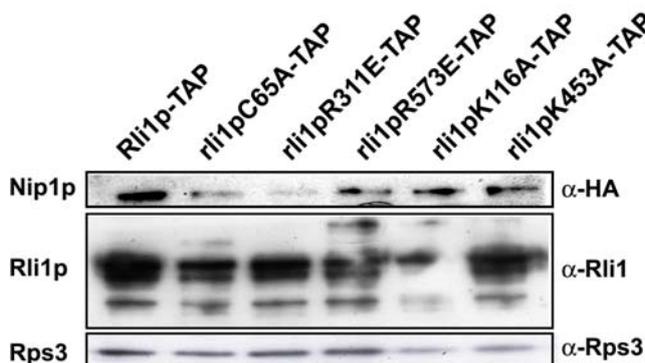


Abb. 2.20: Interaktion der rli1p-Proteinvarianten mit Nip1p-HA

Die TEV-Eluate aus Abb. 2.19 wurden mit einem Western Blot analysiert. Nip1p-HA wurde mit einem α -HA-Antikörper detektiert, Rli1p mit einem α -RLI1-Antikörper und Rps3 mit einem α -Rps3-Antikörper.

Mit dem α -RLI1-Antikörper konnten mehrere Banden detektiert werden, die wahrscheinlich durch Degradation von Rli1p-TAP entstehen (Abb. 2.20). Mit Hilfe der Nip1p-HA Markierung konnte das Vorhandensein von Nip1p mit einem α -HA-Antikörper in den Eluaten der Reinigung (Abb. 2.20) nachgewiesen werden. Das

Ergebnis zeigte, dass das WT-Rli1p das stärkste Nip1p-HA Signal aufzeigt. In den Eluaten des rli1pC65A (mutantes FeS *Cluster* Protein) und des rli1pR311E (*Hinge I*) war ein schwaches Signal zu sehen, wohingegen bei allen anderen Mutanten ein deutliches Nip1p-HA Signal detektiert werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass sowohl das FeS *Cluster* als auch die *Hinge I* Domäne wichtig für eine Nip1p-Rli1p Interaktion sind, wohingegen die ATPase Domäne und die *Hinge II* Domäne keinen Einfluss auf die Bindung von Rli1p mit Nip1p aufwiesen. Zusätzlich zu der untersuchten Nip1p Interaktion wurde auch die Interaktion der rli1p-Proteinvarianten zu dem ribosomalen Protein Rps3 untersucht. Wie in Abb. 2.20 demonstriert, wiesen die zwei mutanten ATPase Proteine (rli1pK116A, rli1pK453A) eine verringerte Interaktion mit dem Markerprotein Rps3 auf, während für die anderen rli1p-Proteinvarianten kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zu beobachtet werden konnte. In nachfolgendem Abschnitt wurden die Interaktionen einiger der rli1p-Proteinvarianten mit weiteren eIF3-Untereinheiten (Prt1p, Hcr1p, Tif35p) näher untersucht. Dies wurde mit einem *Yeast-two-hybrid Screen* sowie mithilfe von Co-Immunopräzipitationen erreicht.

2.8.2 *Yeast-two-hybrid* und Co-Immunopräzipitation

Die Expression des Wildtyp-Rli1p und der letalen rli1p-Proteinvarianten unter der Kontrolle eines Gal-Promotors führten unter anderem zur Co-Reinigung von Hitzeschockproteinen. Aus diesem Grund waren die eIF3 Untereinheiten nur schwer auf einem Coomassie Gel zu identifizieren. Deshalb wurde versucht, die Interaktionen der mutanten rli1p-Proteine mit den eIF3-Untereinheiten auf anderem Wege nachzuweisen. Dazu wurde ein *Yeast-two-hybrid* (Y2H) Test verwendet. Drei eIF3-Untereinheiten (*PRT1*, *HCR1* und *TIF35*) wurden in den pGAD (James et al., 1996) kloniert, dieses Plasmid enthält die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsaktivator, mit der das Zielprotein fusioniert wird. Das WT-*RLI1* sowie die letalen Punktmutanten *rli1C65A*, *rli1K116A*, *rli1S223R*, *rli1R573E* wurden in den pGBDU (James et al., 1996) kloniert, dieses Plasmid enthält die Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsaktivator, mit der das Zielprotein fusioniert wird (Abb. 2.21). Die Interaktionen können dann durch Wachstum des Y2H-Stamms auf –his Medium gezeigt werden (Tab. 2.3).

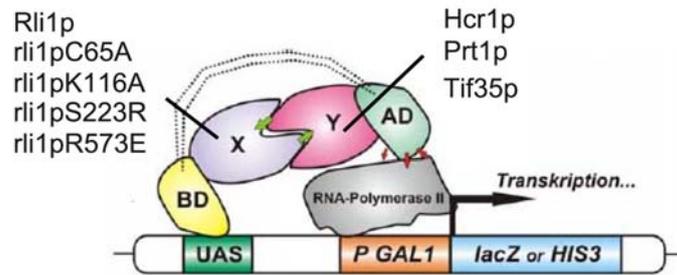


Abb. 2.21: Yeast-two-hybrid System.

An die *Upstream* aktivierende Sequenz (UAS) bindet die Bindedomäne (BD) des Gal4-Transkriptionsaktivator. An die BD wurden das WT-Rli1p und das mutante rli1pC65A, rli1pK116A, rli1pS223R und rli1pR573E fusioniert. Die Expression des *HIS3* Gens erfolgt nur, wenn die an die Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4-Transkriptionsaktivator fusionierten eIF3-Untereinheiten Prt1p, Hcr1p und Tif35p mit dem Rli1p bzw. den rli1p-Varianten interagieren können. Dazu werden beide Plasmide in einen Y2H Stamm transformiert und auf $-his$ Selektionsplatten auf Interaktionen bzw. Wachstum untersucht.

Rli1p	eIF3	-his
Rli1p	Prt1p	+
rli1pC65A	Prt1p	+++
rli1pK116	Prt1p	-
rli1pS223	Prt1p	-
rli1pR573	Prt1p	-
Rli1p	Hcr1p	+
rli1pC65A	Hcr1p	+++
rli1pK116	Hcr1p	+
rli1pS223	Hcr1p	+
rli1pR573	Hcr1p	++
Rli1p	Tif35p	+
rli1pC65A	Tif35p	++
rli1pK116	Tif35p	-
rli1pS223	Tif35p	-
rli1pR573	Tif35p	-

Tab. 2.3: Yeast-two-hybrid Analyse

Die *Yeast-two-hybrid* Interaktionen wurden mit Selektion auf den *HIS3* Marker nachgewiesen. Wird das *HIS3* exprimiert, können die Hefen auf $-his$ Selektionsmedium wachsen.

Getestet wurden die rli1p-Varianten (C65A, K116A, S223R, R573E) und das WT-Rli1p in Kombination mit den eIF3 Untereinheiten Prt1p, Hcr1p und Tif35p. – kein Wachstum + schwaches Wachstum ++/+++ starkes Wachstum.

Eine Interaktion aller untersuchten eIF3-Untereinheiten (Prt1p, Hcr1p und Tif35p) mit WT-Rli1p konnte im Y2H nachgewiesen werden (Tab. 2.3). Diese Interaktion war jedoch nicht sehr stark, was durch langsames Wachstum auf den Selektionsplatten sichtbar wurde (+). Eine Interaktion mit den untersuchten eIF3-Untereinheiten Prt1p und Tif35p und den ATPase Mutanten rli1pK116A-, rli1pS223R- und der *Hinge II* rli1pR573E-Mutante konnte nicht beobachtet werden (-). Während eine schwache Interaktion von Hcr1p mit diesen Mutanten noch zu sehen war (+), interagierten diese Mutanten nicht mehr mit Prt1p und Tif35p (-).

Das rli1pC65A, welches eine Mutation im FeS *Cluster* Bindemotiv trägt, zeigte eine stärkere Interaktion mit allen untersuchten eIF3-Untereinheiten, was durch ein besseres bzw. schnelleres Wachstum auf den Selektionsplatten sichtbar wurde

(++/+++). Dies war für die Interaktion mit Prt1p und Hcr1p besonders deutlich, da große, schnell wachsende Kolonien beobachtet wurden. Auch die Interaktion von rli1pC65A mit Tif35p war wesentlich stärker als die Interaktion, die mit einem WT-Rli1p beobachtet wurde. Diese im Y2H nachgewiesenen stärkeren Interaktionen der FeS *Cluster* Mutante mit eIF3-Untereinheiten sollte dann auch biochemisch nachgewiesen werden. Dazu wurden die TAP-markierten letalen Proteinvarianten (Abb. 2.22) in einem *HCR1*-HA markierten Stamm (RPY 2320) exprimiert und eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Anschließend wurden die Interaktionen mit einem Western Blot analysiert (Abb.2.23).



Abb. 2.22: Schematische Darstellung der verwendeten rli1p-Proteinvarianten

Schematische Darstellung der in diesem Experiment verwendeten Rli1p und rli1p-Proteinvarianten. Das WT-Rli1p sowie alle mutanten rli1p-Proteine wurden mit einem Gal-Promotor (pGal) exprimiert und mit einem TAP markiert. Die Plasmide wurden in einen *HCR1*-HA markierten Stamm transformiert und exprimiert.

Überraschenderweise war die Reinigung, und somit wahrscheinlich die Expression der rli1p-Proteinvarianten, aus einem *HCR1*-HA markierten Stamm schwächer als die Reinigung der mutanten Proteine aus einem *NIP1*-HA markierten Stamm (Abb. 2.18), und die Proteine kaum durch Coomassie Färbung nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Eine Ausnahme hierbei war rli1pR573E, das in ausreichenden Mengen gereinigt werden konnte, und somit wahrscheinlich auch normal exprimiert wurde. Der Western Blot (Abb. 2.23) zeigte für die meisten gereinigten mutanten Proteine ein deutliches Rli1p-Signal, mit Ausnahme des rli1pE247Q und rli1pR311E. Ein eindeutiges Signal von Hcr1p-HA konnte nur für das mutante FeS *Cluster* rli1pC65A nachgewiesen werden (Abb. 2.23 Spur 2). Ein schwaches Hcr1p-HA Signal konnte auch für das rli1pR573E (*Hinge II* Mutation) beobachtet werden, welches jedoch auch am stärksten exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion von Hcr1p-HA mit dem überexprimierten WT-Rli1p konnte nicht gezeigt werden.

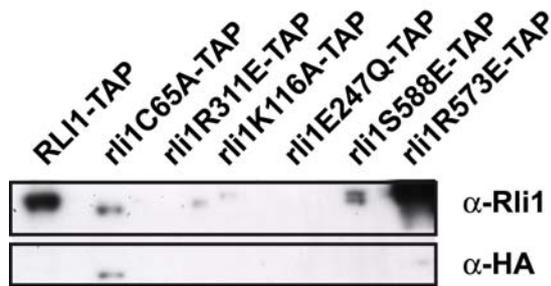


Abb. 2.23: Interaktion der rli1p-Proteinvarianten mit Hcr1p-HA

Western Blot Analyse der TEV-Eluate der TAP-Reinigung von rli1p-Proteinvarianten aus einem *HCR1*-HA markierten Stamm. Detektion von Rli1p mit einem α -RLI1-Antikörper und dem markierten Hcr1p-HA mit einem α -HA-Antikörper.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit (A. Angerer, Bachelorarbeit LMU München) wurde diese Beobachtung dann näher untersucht. In dieser Arbeit wurden die Interaktionen einiger der TAP-markierten rli1p-Proteinvarianten (mutantes FeS *Cluster*, Walker B und *Hinge II*-Protein) in *PRT1*-HA, *TIF34*-HA und *HCR1*-HA Stämmen biochemisch untersucht (Abb. 2.24 B). Die Expression mit einem Gal-Promotor von TAP-markierten mutanten rli1p-Varianten und auch des WT-Rli1p führten nicht zu einem Wachstumsdefekt in Wildtyp-Stämmen (Abb. 2.24 A) bzw. *NIP1*-HA markierten Stämmen (Daten nicht gezeigt). Wohingegen ein synthetisch-letaler Phänotyp für die Expression dieser Konstrukte in *PRT1*-HA und *TIF34*-HA markierten Stämmen nachgewiesen werden konnte. In einem *HCR1*-HA markierten Stamm wurde dies nur für die Expression des TAP-markierten WT-Rli1p beobachtet (Abb. 2.24 A).

Die Bindung von Prt1p-HA und Hcr1p-HA an die untersuchten mutanten Proteine erfolgte unterschiedlich. Während für das mutante FeS *Cluster* Protein (rli1pC65A) und das mutante *Hinge II* Protein (rli1pR573E) ein starkes Hcr1p-HA Signal detektiert werden konnte, wurde für diese beiden Proteinvarianten nur ein schwaches Prt1p-HA Signal beobachtet. Für das WT-Rli1p und das mutante Walker B Protein (rli1pE247Q) konnte kein Hcr1p-HA Signal nachgewiesen werden, wohingegen ein deutliches Prt1p-HA Signal sichtbar wurde (Abb. 2.24 B). Für Tif34p-HA liegen keine Ergebnisse vor, da diese Zellen sehr schlecht wuchsen (vgl. Abb. 2.24 A). Diese Bindungsstudie demonstrierte, dass das WT-Rli1p und das mutante Walker B Protein Prt1p-HA gebunden haben, und dass unabhängig von dieser Bindung ein synthetisch-letaler Phänotyp generiert wurde. Wohingegen das mutante FeS *Cluster* rli1p und das mutante *Hinge II* rli1p deutlich mehr Hcr1p-HA gebunden haben, was jedoch nicht zur Ausprägung eines synthetisch-letalen Phänotyps führt. Ein synthetisch-letaler Phänotyp deutet auf eine genetische Interaktion der zwei untersuchten Gene hin.

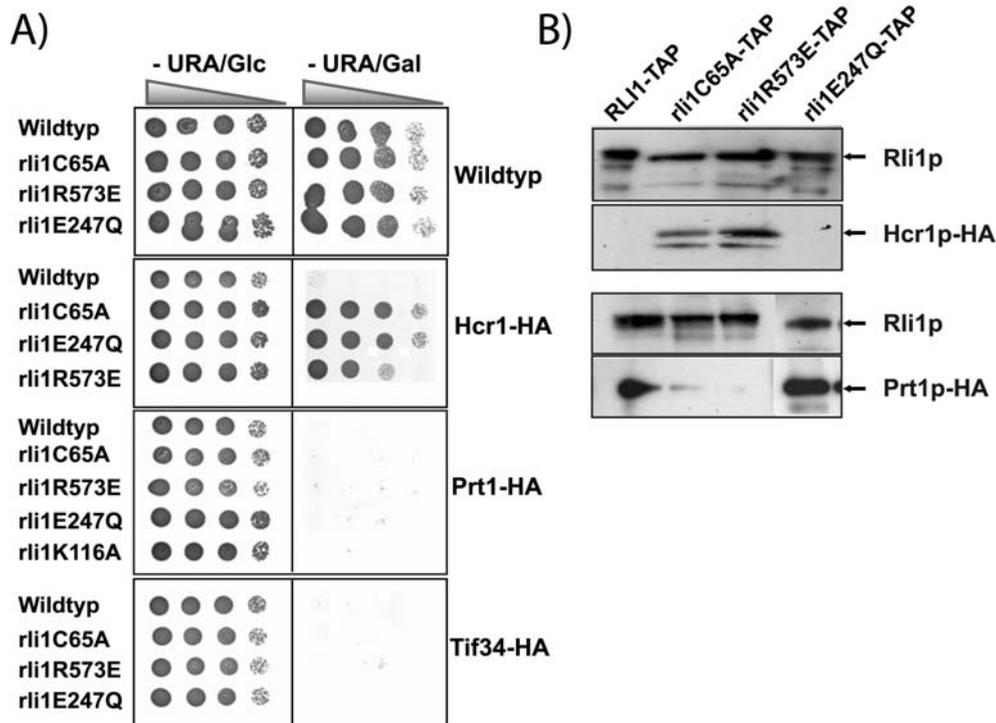


Abb. 2.24: Synthetisch-letaler Phänotyp und Interaktionen der rli1p-Proteinvarianten mit Hcr1p-HA und Prt1p-HA.

A) Wachstumstest der Wildtyp-, *HCR1*-HA-, *PRT1*-HA- und *TIF34*-HA-markierten Stämme (rechts beschriftet). In diesen Stämmen werden TAP-markiertes Rli1p, rli1pC65A, rli1pR573E und rli1pE247Q unter der Kontrolle eines Gal-Promotors exprimiert (links beschriftet). Linke Spalte (-ura/Glc): reprimierter Gal-Promotor; rechte Spalte (-ura/Gal): induzierter Promotor führt zur Expression des TAP markierten Rli1p, rli1pC65A, rli1pR573E und rli1pE247Q. B) Co-Immunopräzipitation. Die exprimierten TAP markierten Rli1p, rli1pC65A, rli1pR573E und rli1pE247Q Proteine wurden mit IgG-Sepharose gereinigt und die Eluate anschliessend mit einem Western Blot analysiert. Oben: Interaktionen mit Hcr1p-HA; Unten: Interaktionen mit Prt1p-HA.

2.9 Dominant-negativer Phänotyp

Da es sich bei den untersuchten *rli1* Mutanten um letale, also nicht-funktionale Proteinvarianten von rli1p handelte, erwartete man, dass durch Überexpression dieser mutanten Proteine ein dominant-negativer Phänotyp entsteht. Das bedeutet, wenn das mutante Protein in einem höheren Level als das endogene vorliegt, konkurriert es um Bindungspartner und titriert diese weg, so dass die Funktion gestört wird, und die Zellen sterben. Die Überexpression der rli1p-Proteinvarianten unter einem Gal-Promotor führte jedoch in Wildtyp-Stämmen, *NIP1*-HA und *HCR1*-HA markierten Stämmen nicht zu einem Wachstumsdefekt (Abb. 2.24 A). Dies konnte nur in *TIF34*-HA und *PRT1*-HA markierten Stämmen beobachtet werden (Abb. 2.24). Um einen dominant-negativen Phänotyp in Wildtyp-Stämmen zeigen zu können, wurde versucht dies durch einen noch höheren Expressionslevel der rli1p-

Proteinvarianten mit dem Vektor pEMBLyex4 zu erreichen (Dente et al., 1983; Dong et al., 2004). Dazu wurden die oben beschriebenen Punktmutanten in pEMBLyex4 kloniert und in einem Wildtyp-Stamm durch Galaktose induziert. Eine höhere Expression wird dadurch erreicht, dass das Plasmid neben einem *URA3*-Marker zusätzlich einen mutierten *LEU2* Marker (*leu2-d*) enthält. Werden die Zellen dann in einem $-leu$ Selektionsmedium kultiviert, können sie nur überleben wenn sie die Kopienzahl des Plasmids hoch regulieren. Somit wurde der höhere Expressionslevel der *rli1p*-Proteinvarianten durch Erhöhung der Kopienzahl des Plasmids zusätzlich zur starken Expression unter einem Gal1-10 Promotor erreicht. In Abb. 2.25 ist der Wachstumstest von WT-Zellen gezeigt, die die mutanten Proteinvarianten mit dem pEMBLyex4 System sehr stark exprimieren.

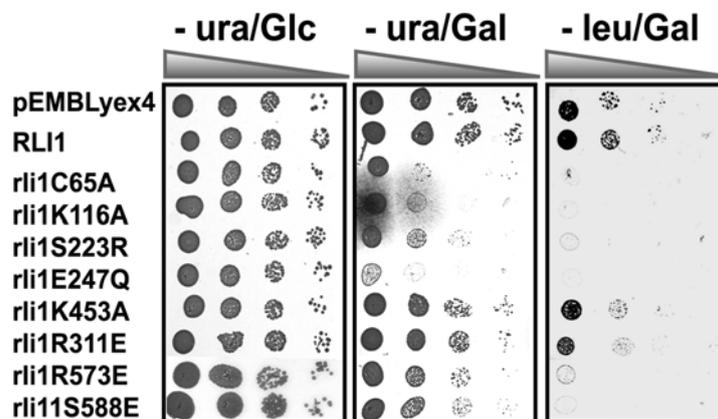


Abb. 2.25: Dominant-negativer Phänotyp.

Wachstumstest der überexprimierten *rli1p*-Proteinvarianten in Wildtyp-Stämmen. Kontrolle mit dem leeren Plasmid (pEMBLyex4) und dem WT-Rli1p (RLI1). Rechts: Auf $-ura/Glc$ Medium ist der Gal-Promotor reprimiert. Mitte: $-ura/Gal$: Expression der mutanten Proteine durch Anschalten des Promotors. Rechts: $-leu/Gal$ Medium führt zum Anschalten des Promotors und Erhöhung der Kopienzahl des Plasmids.

Eine Kultivierung der Zellen auf $-ura/Glc$ Medium führte zu keinem Wachstumsdefekt. Der Promotor ist unter diesen Bedingungen reprimiert, die mutanten Proteine werden somit nicht exprimiert. Auf der $-ura/Gal$ -Platte lag das Plasmid nicht vermehrt in den Zellen vor, die Expression der Mutanten durch Anschalten des Gal-Promotors führt aber vor allem bei der FeS *Cluster* Mutante (*rli1pC65A*) und den ATPase Mutanten (*rli1pK116A*, *rli1pS223R*, *rli1pE247Q*) zu einem dominant-negativen Phänotyp. Diese Mutanten waren dann auf der $-leu/Gal$ Platte tot. Unter diesen Bedingungen, Anschalten des Promotors und Erhöhung der Kopienzahl des Plasmids, zeigten auch die zwei *Hinge II* Mutanten (*rli1pR573E*, *rli1pS588E*) einen dominant-negativen Effekt wohingegen der Effekt der ATPase

Mutante (rli1pK453A), die sich im Walker A Motiv der zweiten NBD befindet, und der *Hinge I* Mutante (rli1pR311E) sehr gering war (Abb. 2.25). Die Expression der Mutanten konnte nicht mit einem Western Blot demonstriert werden, da diese nicht markiert waren und der α -RLI1-Antikörper endogenes Rli1p ebenso erkennt. Da die Überexpression der Mutanten zu einem dominant-negativen Phänotyp führte, kann man jedoch davon ausgehen, dass die Expression wie erwartet stärker ist als in dem oben beschriebenen System (Abb. 2.24).

2.10 Untersuchung der Funktion von Rli1p bei der Translationsinitiation

Da als Interaktionspartner von Rli1p Untereinheiten des Translationsinitiationsfaktor eIF3 sowie ribosomale Proteine identifiziert wurden (Abb. 2.14), lag nahe dass auch Rli1p eine Rolle bei der Translation oder der Ribosomenbiogenese spielt (Dong et al., 2004) (Kispal et al., 2005) (Yarunin et al., 2005). Dong *et al.* zeigten, dass eine vollständige *in vivo* Depletion von Rli1p mit Hilfe einer UBI-R Destruktions-Markierung innerhalb von 2 h nach Repression des Promotors erreicht werden kann. Diese Depletion führte zu einer Abnahme der Translationsaktivität in Translationsextrakten, die nach einer Promotor-Repression für 8 h hergestellt wurden (Dong et al., 2004). Im Gegensatz dazu beobachteten Kispal *et al.* und Yarunin *et al.*, dass eine *in vivo* Depletion von Rli1p durch die Verwendung eines abschaltbaren Tet^{off}-Promotors innerhalb von 8 bis 12 h teilweise erreicht werden kann (vgl. auch Abb. 2.7). Die Reduktion von Rli1p führte zu einer Akkumulation von ribosomalen Proteinen (Rps2-GFP und Rpl25-GFP) im Kern, sowie zu einer Verlangsamung der rRNA Prozessierung der großen und kleinen ribosomalen Untereinheiten (Kispal et al., 2005) (Yarunin et al., 2005). Diese zwei Depletionssysteme können jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Geschwindigkeit des Rli1p Abbaus sehr unterschiedlich erfolgte. Aus diesem Grund blieb es unklar, welches der primäre Effekt ist, der durch eine Reduktion von Rli1p entsteht. Darüber hinaus sind Translation und Ribosomenreifung zwei Prozesse, die gekoppelt sind und sich stark gegenseitig beeinflussen. Da die Versuche eine konditionale Mutante herzustellen scheiterten (Abschnitt 2.2) wurde deshalb versucht diese gegensätzlichen Beobachtungen durch eine *in vitro* Depletion von Rli1p aufzuklären. Mit der *in vitro* Depletion kann so ein möglicher direkter Einfluss von Rli1p auf die Translation untersucht werden, da nur dann ein Effekt in Translationsexperimenten auftritt, wenn

Rli1p an diesem Prozess beteiligt ist. Würde Rli1p ausschließlich die Ribosomenreifung beeinflussen, so würde man mit einem *in vitro* Depletionssystem keinen Effekt auf die Translation beobachten.

2.10.1 *In vitro* Depletion von Translationsextrakten

Die Translationsaktivität von Zellextrakten wurde mit Hilfe einer Reporter-mRNA gemessen. In den folgenden Versuchen wurde eine Reporter-mRNA, die für Luciferase codiert gewählt. Die Aktivität der synthetisierten Menge an Luciferase kann mit Hilfe der Umsetzung von Luciferin gemessen werden, und ist somit ein direktes Maß für die Translationsaktivität. Um einen direkten Einfluss von Rli1p auf die Translation zu zeigen, musste das Protein aus den Translationsextrakten entfernt werden. Dies wurde mit Immundepletionen (Abschnitt 2.10.2), Spaltung durch TEV-Protease (Abschnitt 2.10.3) oder Immunoinhibition (Abschnitt 2.10.4/2.20.5) versucht. Diese verschiedenen Ansätze zur Analyse eines direkten Einfluss von Rli1p auf die Translation werden in folgenden Abschnitten beschrieben.

Als *Template* für die *in vitro* Transkription wurde das mit BsrBI-linearisierte Plasmid pSP64-Luciferase verwendet (Verge et al., 2004). Die mRNA wurde dann zur Kontrolle über ein Gel aufgetrennt (Abb. 2.26). Die Translationsextrakte wurden, wie von Asano *et al.* beschrieben aus den jeweiligen Stämmen hergestellt (Asano et al., 2002). In einem Reaktionsmix wurde dann die mRNA für 20 min bis 30 min bei 26°C translatiert. Die Messung der Aktivität der Translationsansätze erfolgte mit Hilfe der Umsetzung von Luciferin zur Bestimmung der Menge an synthetisierter Luciferase.

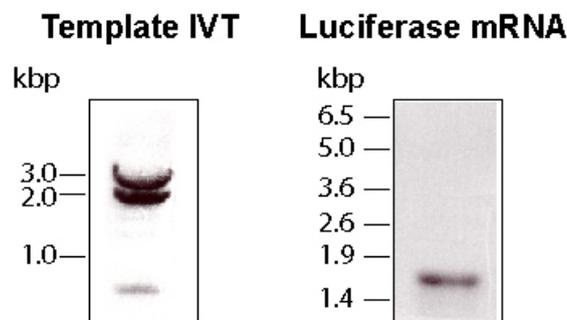


Abb. 2.26: *In vitro* Transkription (IVT) der *luc* mRNA

Links: *Template* für die *in vitro* Transkription (IVT). Das Plasmid pSP64-luc (Verge et al., 2004) wurde mit BsrBI linearisiert und gereinigt. Rechts: gecappte *luc* mRNA nach der *in vitro* Transkriptionsreaktion.

2.10.2 Immundepletionen

2.10.2.1 Depletion mit IgG-Sepharose

Um Rli1p mit IgG-Sepharose aus Translationsextrakten depletieren zu können, wurde ein Stamm verwendet, in dem *RLI1* chromosomal TAP markiert ist. Als Kontrolle für unspezifische Bindung der ProtA-Markierung an die IgG-Sepharose Affinitätsmatrix wurde CL4B-Sepharose verwendet. Der Effekt von CL4B- und IgG-Sepharose auf Translationsextrakte ohne TAP-markiertes Rli1p wurde anhand von Rli1p-HA enthaltenden Extrakten überprüft. Die IgG- bzw. CL4B-Sepharose Matrix wurde in Gelfiltrationspuffer äquilibriert und anschließend mit WT-Zellextrakten blockiert, um unspezifische Bindungen des Zellextrakts mit der Affinitätsmatrix zu verringern. Die Translationsextrakte wurden dann mit der Affinitätsmatrix inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde entfernt, bevor die Translationsaktivität mit Hilfe der Translation der Luciferase (*luc*)-mRNA gemessen wurde und die Effizienz der Rli1p-TAP Depletion mit einem Western Blots überprüft (Abb. 2.27).

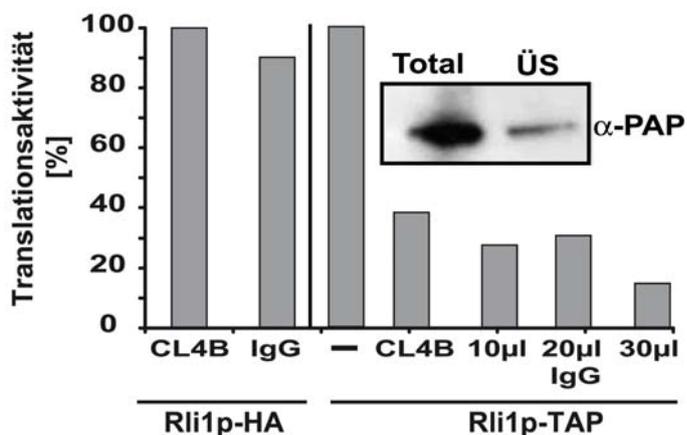


Abb. 2.27: Translationsaktivität nach der Immundepletion

Relative Translationsaktivität durch Messung der *luc* mRNA Translation. Kontrolle mit einem Translations-Extrakt, der HA-markiertes Rli1p enthält (Rli1p-HA). Inkubation mit 10 µl CL4B- bzw. IgG-Sepharose. Translationsextrakt mit TAP-markiertem Rli1p (Rli1p-TAP). Zugabe von 10 µl CL4B-Sepharose und 10 µl, 20 µl und 30 µl IgG-Sepharose vor der *in vitro* Translation. Der Überstand der mit 30 µl IgG-Sepharose depletierten Extrakte (ÜS) wurden dann im Vergleich zu unbehandeltem Extrakt (Total) mit einem Western Blot analysiert.

Das Kontrollexperiment mit Rli1p-HA enthaltenden Translationsextrakten zeigte, dass weder eine Behandlung mit CL4B- noch mit IgG-Sepharose zu einer signifikanten Reduktion der Translationsaktivität führte (10 %). Bei den Extrakten mit TAP-markierten Rli1p war die Translationsaktivität schon bei der Inkubation mit CL4B-Sepharose alleine stark reduziert (40 %). Eine Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an IgG-Sepharose (10 µl, 20 µl) führten nicht zu einem Rückgang der Translationsaktivität. Erst bei der Inkubation mit 30 µl IgG-Sepharose

zeigte sich eine Reduktion der Translationsaktivität um 50 % im Vergleich zur Kontrolle mit CL4B-Sepharose (auf 20 %). Die so behandelten Translationsextrakte wurden dann mit einem Western Blot analysiert (Abb. 2.27). Der Western Blot demonstrierte eine deutlich Abnahme des Rli1p-TAP aus den Translationsextrakten, (ÜS) im Vergleich zu unbehandelten Extrakten (Total). Insofern war es möglich Rli1p-TAP unter diesen Bedingungen zu depletieren. Das Problem bei diesem Experiment war, dass die Aktivität der Rli1p-TAP Extrakte nach Zugabe der CL4B-Sepharose nur noch sehr gering war. Um nachzuweisen, dass dies ein unspezifischer Effekt der Sepharose Matrix auf TAP-markierte Proteine war, wurde das Experiment mit magnetischer IgG-Affinitätsmatrix wiederholt, die im Gegensatz zur Sepharose weniger unspezifische Bindungen zeigen sollten.

2.10.2.2 Depletion mit IgG-gekoppelte Dynal-Affinitätsmatrix

Für dieses Experiment wurde eine tosylaktivierte Dynal-Affinitätsmatrix mit Kaninchen-IgG gekoppelt und wie in Abschnitt 2.10.2.1 für die Depletion von Rli1p-TAP aus Translationsextrakten verwendet (Abb. 2.28). Der Vorteil der magnetischen Affinitätsmatrix ist neben der Vermeidung unspezifischer Bindungen auch das leichtere Entfernen der Affinitätsmatrix durch einen Magneten anstatt durch Zentrifugation. Als Kontrolle wurde ein nicht markierter WT-Translationsextrakt verwendet, der auch nach längerer Inkubation mit der IgG-gekoppelten Dynal-Affinitätsmatrix kaum Veränderungen in seiner Translationsaktivität aufwies (Abb. 2.28). Der Rli1p-TAP enthaltende Translationsextrakt zeigte nach längerer Inkubation mit der Affinitätsmatrix (155 min) eine Verringerung der Translationsaktivität um ungefähr 50 % (Abb. 2.28). Dies bestätigt die 50 %-ige Reduktion der Translation mit IgG-Sepharose (Abb. 2.27). Das Experiment könnte durch Zugabe größerer Mengen an Affinitätsmatrix und längerer Inkubationszeit noch optimiert werden. Dies wurde jedoch aufgrund der positiven Ergebnisse, die in Abschnitt 2.10.5 beschrieben sind nicht mehr durchgeführt.

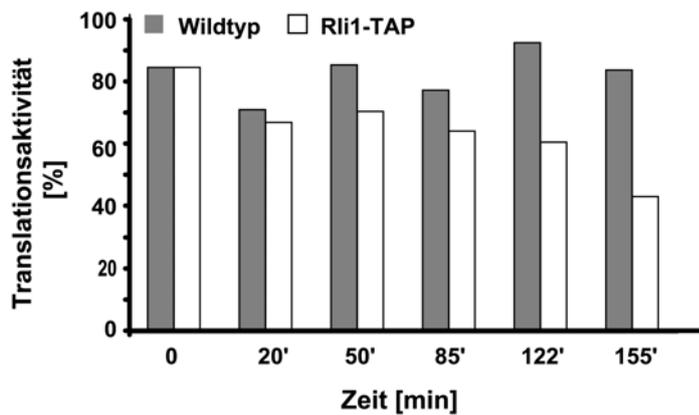


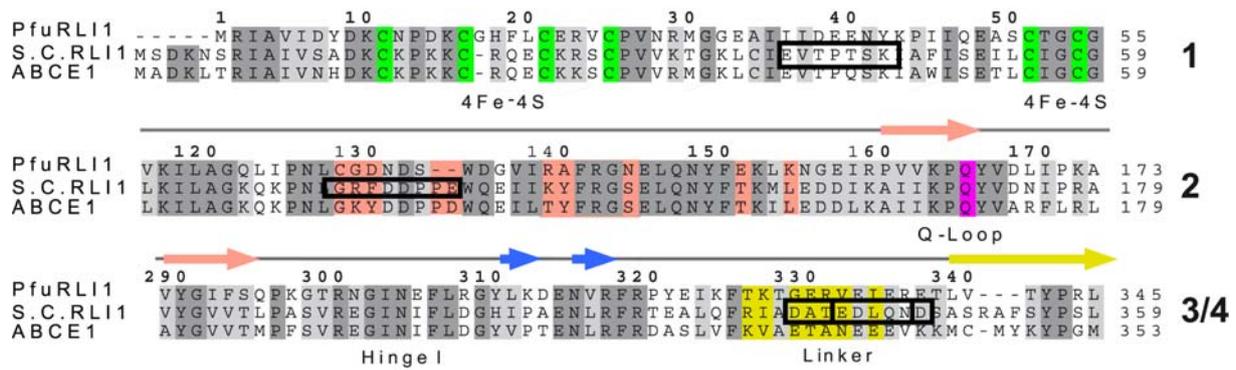
Abb. 2.28: Translationsaktivität nach der Immundepletion mit magnetischer Affinitätsmatrix.

Translationsextrakte aus einem WT-Stamm und einem *RLI1*-TAP markierten Stamm wurden mit 20 μ l IgG-gekoppelter Dynal-Affinitäts-Matrix unterschiedlich lang inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde entfernt bevor die *in vitro* Translation mit der *luc* mRNA durchgeführt wurde.

2.10.3 Inaktivierung mit Hilfe einer TEV-Protease Schnittstelle

Die Vorteile eines Systems mit inaktivierbarem Rli1p gegenüber der in Abschnitt 2.10.2 beschriebenen Immundepletionen, lagen in der Möglichkeit, sowohl Experimente *in vitro* als auch *in vivo* durchzuführen. In Translationsextrakten mit einem TEV-Protease spaltbarem Rli1p (Rli1p^{TEV}) konnte so durch Zugabe von TEV-Protease spezifisch die Funktion des modifizierten Zielproteins beeinflusst werden. Wohingegen bei einer Depletion über eine Markierung immer die Gefahr der Co-Depletion der interagierenden Proteine bestand. Im Fall von Rli1p handelt es sich hierbei um ribosomale Proteine und eIF3, die auch an der Translation beteiligt sind (Abb. 2.14). Neben der Co-Depletion können auch unspezifische Depletionen zu inaktiven Translationsextrakten führen (Abschnitt 2.10.2).

Durch Überexpression der TEV-Protease *in vivo* konnte die Relevanz der *in vitro* Rli1p^{TEV} Spaltung überprüft werden. Anhand der bekannten Struktur von *pfuRLI* (Karcher et al., 2005) wurden vier geeignete Stellen in Hefe-Rli1p ausgesucht (K.P. Hopfner, persönliche Mitteilung) (Abb. 2.29). Die Erkennungssequenz der TEV-Protease wurde eingeführt und anschließend die Komplementationsfähigkeit der Rli1p^{TEV}-Konstrukte im *$\Delta rli1$ Knockout* überprüft. Die genauen Aminosäuresequenzen, in die die TEV-Protease Schnittstelle (ENLYFQG) durch Deletion oder Insertion eingefügt wurde sind in Abb. 2.29 dargestellt, es handelte sich hierbei um weniger konservierte Bereiche von Rli1p.



	ursprünglich	ersetzt
Rli1p ^{TEV1}	EVTPTSK	ENLYFQG
Rli1p ^{TEV2}	G..RFD	G..ENLYFQG..RFD
Rli1p ^{TEV3}	IA..DATE..DLQ	IA..ENLYFQG..DLQ
Rli1p ^{TEV4}	EDLQND	ENLYFQG

Abb. 2.29: Ausschnitt eines Rli1p Alignment von *pfuRli* und humanem ABCE1.

Ausschnitt eines Protein-Alignment von *S. cerevisiae* Rli1p mit *PfuRli* und humanem HP68/ABCE1. Die vier TEV-Protease Schnittstellen wurden durch Deletion oder Insertion in die schwarz umrandeten Regionen mit Hilfe einer PCR eingefügt. Die erste TEV-Protease Erkennungssequenz (ENLYFQ/G) wurde N-Terminal zwischen die zwei 4Fe-4S Bindungsstellen, die zweite vor den Q-loop und die dritte bzw. vierte in den *Linker* von Rli1p eingeführt. In der Tabelle ist die genaue Aminosäuresequenz dargestellt, in die eine TEV-Protease Schnittstelle eingefügt wurde

2.10.3.1 Insertion der vier TEV-Protease Schnittstellen in *RLI1*

Während die Einführung der TEV-Protease Schnittstellen 1 und 4 die Länge von Rli1p nicht beeinflussten, veränderten die Insertion der TEV-Protease Schnittstellen 2 und 3 die Länge des Proteins um drei bzw. sieben Aminosäuren. Die korrekte Einführung der TEV-Protease Erkennungssequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Die modifizierten *RLI1* Sequenz mit endogenem Promotor (*pRLI1*^{TEV1-4}) wurden dann in einen Vektor kloniert und anschließend auf Komplementation des *Δrli1* *Knockouts* überprüft. Es zeigte sich, dass nur die eingefügte TEV-Schnittstelle 1 (*pRLI1*^{TEV1}) und 4 (*pRLI1*^{TEV4}) funktional waren, die TEV-Schnittstellen 2 und 3, die die Länge des Proteins beeinflussten waren letal. Die resultierenden zwei Stämme RPY2768 (*Δrli1* + *pRLI1*^{TEV1}) und RPY2769 (*Δrli1* + *pRLI1*^{TEV4}) wurden dann für die *in vitro* Spaltung verwendet.

2.10.3.2 *In vitro* Spaltung von Rli1p^{TEV1}

Um zu überprüfen, ob das Rli1p^{TEV1} und Rli1p^{TEV4} *in vitro* von TEV-Protease gespalten werden kann, wurden Extrakte aus den zwei Stämmen RPY 2768 und

RPY2769 hergestellt und mit TEV-Protease inkubiert. Die Spaltung wurde dann mit Hilfe einer Western Blot Analyse überprüft und ist in Abb. 2.30 dargestellt.

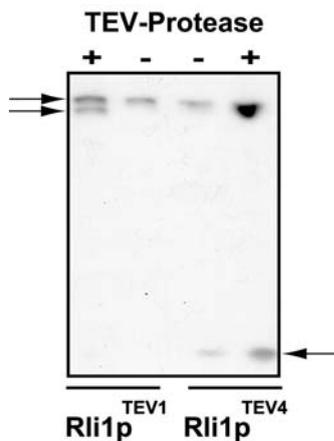


Abb. 2.30: *In vitro* Spaltung des Rli1p^{TEV1} und Rli1p^{TEV4}

Western Blot Analyse der Zellextrakte aus den Stämmen RPY2768 ($\Delta rli1 + pRLI1^{TEV1}$) und RPY2769 ($\Delta rli1 + pRLI1^{TEV4}$). Die Extrakte mit Rli1p^{TEV1} und Rli1p^{TEV4} wurden über Nacht bei 4°C mit TEV-Protease inkubiert (+ TEV-Protease). Als Kontrolle wurden unbehandelte Extrakte aufgetragen (- TEV-Protease). Die Pfeile markieren die resultierenden Spaltprodukte.

Die *in vitro* Spaltung durch TEV-Protease von Rli1p^{TEV1} und Rli1p^{TEV4} in Zellextrakten, die aus dem Stamm RPY2768 ($\Delta rli1 + pRLI1^{TEV1}$) bzw. dem Stamm RPY2769 ($\Delta rli1 + pRLI1^{TEV4}$) hergestellt wurden, konnte mit einem Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 2.30). Für Rli1p^{TEV1} konnte die Abspaltung eines ca. 4 kDa großen N-terminalen Fragments deutlich beobachtet werden. Das resultierende, um 4 kDa kleinere Spaltprodukt von Rli1p^{TEV1} wurde mit einem C-terminalen α -RLI1 Antikörper nachgewiesen und ist in Abb. 2.30 mit Pfeilen gekennzeichnet. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die TEV-Protease Schnittstelle an der Aminosäureposition 40 eingefügt wurde und somit nach der TEV-Protease Behandlung ein um ca. 4 kDa kleineres Spaltprodukt entstehen sollte. Für das Rli1p^{TEV4} konnte keine spezifische Spaltung beobachtet werden. Die eingeführte TEV-Protease Schnittstelle sollte Rli1p in zwei ca. 30 kDa große Fragmente spalten, stattdessen wurde ein kleineres Abbauprodukt bei ca. 10 kDa auf dem Western Blot detektiert, dessen Abspaltung jedoch unabhängig von der TEV-Protease erfolgte.

Für die Messung der Translationsaktivität wurden Translationsextrakte aus diesen Stämmen (RPY2768, RPY2769) hergestellt. Trotz mehrfacher Versuche konnten aus dem Stamm RPY2769 keine aktiven Translationsextrakte gewonnen werden. Dies gelang nur für den Stamm RPY2768, der das modifizierte *RLI1*^{TEV1} enthielt. Aliquots der aktiven Translationsextrakte wurden mit TEV-Protease inkubiert, um das vorhandene Rli1p^{TEV1} zu spalten und damit zu inaktivieren. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten wurde die Translationsaktivität mit Hilfe des Luciferase mRNA-Reporterassays bestimmt werden (Abb. 2.31). Als Kontrolle wurden die

gleichen Extrakte mit dem TEV-Protease Puffer inkubiert. Die Effizienz der Spaltung des in der Translationsreaktion enthaltenen Rli1p^{TEV1} wurde anschließend anhand eines Western Blots überprüft (Abb. 2.32).

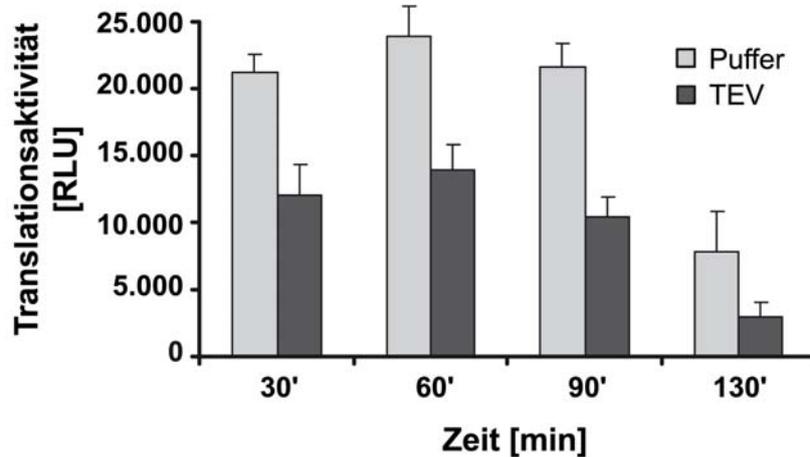


Abb. 2.31: Translationsaktivität nach TEV-Protease Spaltung von Rli1p^{TEV1}

Translationsaktivität nach der Spaltung durch TEV-Protease von Rli1p^{TEV1} enthaltenden Translationsextrakten, die aus dem Stamm RPY2768 ($\Delta rli1 + pRLI1^{TEV1}$) hergestellt wurden. Aliquots der Translationsextrakte wurden bei Raumtemperatur mit 20-25 μ g TEV-Protease bzw. dem entsprechenden Volumen an TEV-Protease Puffer inkubiert. Nach 30 min, 60 min, 90 min und 130 min wurde je ein Aliquot entnommen und für die *in vitro* Translationsreaktion eingesetzt. Das Diagramm zeigt die absolute Translationsaktivität in relativen Lichteinheiten [RLU] im Verlauf der verschieden langen Inkubationszeiten.

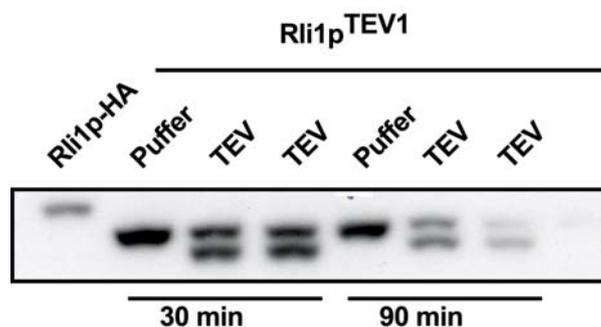


Abb. 2.32: Spaltungseffizienz von Rli1p^{TEV1} in Translationsextrakten

Der Western Blot zeigt die Spaltung von Rli1p^{TEV1} nach 30 min und 90 min Inkubation mit der TEV-Protease. Für die Western Blot Analyse wurden Aliquots direkt aus der Translationsreaktion entnommen und aufgetragen. Als Kontrolle für die spezifische Spaltung der TEV-Protease wurde der mit Puffer behandelte Extrakt verwendet (Puffer). Die zwei Ansätze (TEV) repräsentieren je zwei Parallelansätze unter gleichen Bedingungen zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Das in den Abbildungen 2.31 und 2.32 dargestellte Experiment diente zur Ermittlung der optimalen Bedingungen, die eine hohe Effizienz der TEV-Protease Spaltung und gleichzeitig noch aktive Translationsextrakte in der Pufferkontrolle ergeben. Im Laufe der Inkubationszeit bei Raumtemperatur verlieren die Translationsextrakte

unabhängig von der Rli1p^{TEV1} Spaltung an Aktivität (vgl. Zeitpunkt 130 min in Abb. 2.32). Die Experimente in Abb. 2.31 demonstrierten, dass ein Rückgang der Translationsaktivität um 50 % (Zeitpunkt 30 min, 60 min und 90 min) einer 50 %-igen Spaltung des Rli1p^{TEV1} auf dem Western Blot entsprach (Abb. 2.32). Eine schlechte Durchmischung der empfindlichen Translationsextrakte führte zu einer mangelnden Reproduzierbarkeit der Messungen bei Parallelansätzen. Weitere Experimente zeigten, dass nur durch eine Verlängerung der Inkubationszeit eine effizientere Spaltung durch die TEV-Protease erfolgte und nicht durch Erhöhung der TEV-Protease Konzentration. Die Verlängerung der Inkubationszeit war jedoch nicht anwendbar, weil die Translationsextrakte dabei auch in der Pufferkontrolle ihre Aktivität verloren. Um dieses System für eine *in vitro* Depletion von Rli1p verwenden zu können, müssten sowohl die Stabilität der Translationsextrakte als auch die Bedingungen für eine effizientere Spaltung des Rli1p^{TEV1} noch optimiert werden.

2.10.3.3 Spaltung des Rli1p^{TEV1} *in vivo*

Um die Relevanz der Rli1p^{TEV1} Spaltung *in vivo* zu zeigen, wurde die TEV-Protease in ein *high copy* Plasmid unter Kontrolle des starken Gal1-10-Promotors kloniert, um eine möglichst hohe Expression der TEV-Protease zu erreichen. Die korrekte Expression der TEV-Protease, die mit Myc markiert war, wurde anhand eines Western Blots überprüft (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid pGal-TEV wurde dann in die oben beschriebenen Stämme RPY2768 und RPY2769 transformiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Expression der TEV-Protease nicht ausreichte, um Rli1p^{TEV} *in vivo* zu spalten. Aus diesem Grund wurde *RLI1*^{TEV1} und *RLI1*^{Tev4} in ein Plasmid mit reprimierbaren Tetrazyclin Promotors kloniert. Die Plasmide pTET^{off} *RLI1*^{TEV1} oder pTET^{off} *RLI1*^{TEV4} wurden zusammen mit dem pGal-TEV in den *Δrli1* *Knockout* transformiert. Gleichzeitige Repression der Expression des pTET^{off} *RLI1*^{TEV1} durch geringe Konzentrationen an Doxycyclin und Induktion des pGal-TEV. wiesen dann die *in vivo* Relevanz der Rli1p^{TEV1} Spaltung nach (Abb. 2.33), da für diese Zellen ein Wachstumsdefekt beobachtet wurde.

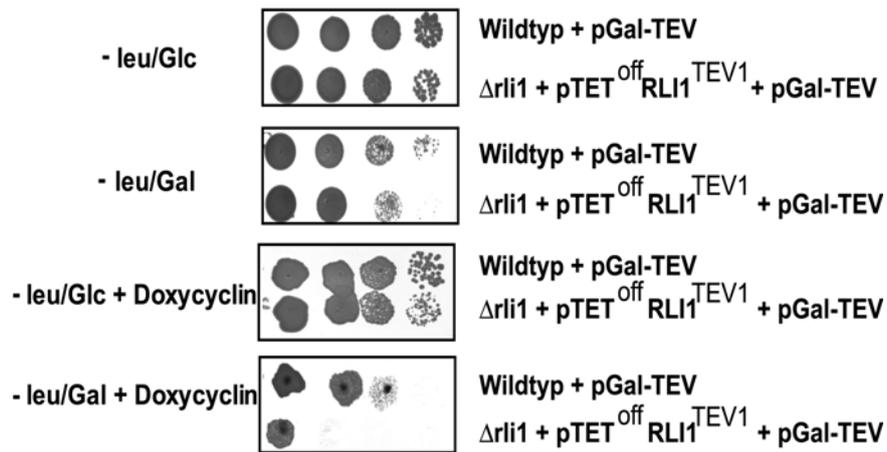


Abb. 2.33: Spaltung von Rli1p^{TEV1} *in vivo*

Die Überexpression der TEV-Protease erfolgte mit pGal-TEV. Das pGal-TEV wurde in einem Wildtyp-Stamm bzw. RJY2839 ($\Delta rli1 + pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV1}}$) exprimiert. Auf den Glukose Platten (-leu/Glc) erfolgte keine Expression der TEV-Protease. Auf den Galaktose Platten (-leu/Gal) wird die TEV-Protease überexprimiert. Die Zugabe von Doxycyclin alleine, das die Expression des $pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV1}}$ reprimiert, zeigt keinen Wachstumsdefekt (-leu/Glc+Doxycyclin). Auf den Galaktose und Doxycyclin Platten (-leu/Gal+Doxycyclin) wird sowohl die TEV-Protease exprimiert und das $pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV1}}$ reprimiert, was zu einem Wachstumsdefekt führte.

Die Überexpression der TEV-Protease *in vivo* mit dem Plasmid pGal-TEV hatte keinen Einfluss auf Wildtyp-Zellen. Die Zugabe geringer Mengen an Doxycyclin beeinflusste das Wachstum der untersuchten Stämme ebenfalls nicht (Abb. 2.33). Auch der Stamm RJY2839, mit dem $pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV1}}$ wies keinen Wachstumsdefekt durch Zugabe von geringen Konzentrationen von Doxycyclin auf, ein leichter Wachstumsdefekt war jedoch auf den Galaktose-Platten zu beobachten, bei der die TEV-Protease überexprimiert wird. Ein deutlicher Wachstumsdefekt war auf den Platten mit Galaktose und Doxycyclin zu sehen. Mit einer Kombination der Repression von $pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV1}}$ und Überexpression der TEV-Protease bestätigte sich *in vivo*, dass die *in vitro* nachgewiesene Rli1p^{TEV1} Spaltung mit einem letalen Phänotyp korreliert. Der Stamm mit $pTET^{\text{off}} RLI1^{\text{TEV4}}$ zeigte unter den gleichen Bedingungen keinen Wachstumsdefekt (Daten nicht gezeigt), was jedoch mit dem Ergebnis der nicht nachweisbaren *in vitro* Spaltung übereinstimmte (vgl. Abb. 2.30). Da ein *in vivo* Effekt für das Rli1p^{TEV1} nachgewiesen werden konnte, müssten nun noch optimale Bedingungen gefunden werden, um die Translationsextrakte mit TEV-Protease effizienter spalten zu können. Der Vorteil dieses Systems besteht in der Möglichkeit Experimente *in vivo* und *in vitro* durchführen zu können. Mit diesem System konnte demonstriert werden, dass eine partielle Inaktivierung von Rli1p^{TEV1} zu einer Reduktion der Translationsaktivität um 50 % führte. Daher erwartet man,

dass eine vollständige Spaltung zur vollständigen Inhibition der *luc* mRNA Synthese führen würde, wenn Rli1p essentiell für die Translation ist.

2.10.4 Immunoinhibition mit α -PAP- und α -HA-Antikörpern

Die Immundepletionen mit Hilfe einer Rli1p-TAP Markierung zeigte, dass die Rli1p-Bindung nicht effizient genug war um eine vollständige Depletion zu bewirken (Abb. 2.28), und je nach verwendeter Affinitätsmatrix auch die Translationsaktivität in Kontrollexperimenten zurückging (Abb. 2.27). Zudem konnte mit Hilfe der TEV-Protease-Spaltung von Rli1p^{TEV1} nur ein Rückgang der Translationsaktivität um 50 % gezeigt werden, da die Spaltung nicht effizient genug erfolgte (Abb. 2.31/2.32). Eine andere Idee war deshalb, dass ein Antikörper, der an Rli1p bindet, die Aktivität des Proteins inhibieren könnte. Die Analyse der *rli1* Mutanten (Tab. 2.1; Abb. 2.2) zeigte, dass auch der C-Terminus von Rli1p wichtig für die Proteinfunktion ist. Deshalb wurden für die Immunoinhibition die C-terminalen Markierungen Rli1p-3xHA und Rli1p-TAP gewählt und Translationsextrakte aus den entsprechenden Stämmen hergestellt. Diese wurden dann im Falle von HA-markiertem Rli1p mit α -HA-Antikörper bzw. im Fall von TAP-markiertem Rli1p mit α -PAP-Antikörper und Kaninchen-IgG inkubiert, ohne anschließende Entfernung des Antikörper-Protein Komplexes. Als Kontrolle diente hierbei jeweils ein WT-Extrakt, der ebenfalls mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert wurde. Die Translationsaktivität wurde mit dem oben beschriebenen Luciferase mRNA-Reporterassay bestimmt. Die Wildtypextrakte und die Extrakte mit markiertem Rli1p wurden, wie in Abb. 2.34 dargestellt, 1 h und 3 h auf Eis mit dem jeweiligen Antikörper oder der entsprechenden Puffermenge inkubiert, bevor die *in vitro* Translation durchgeführt wurde. Die Ansätze mit Zugabe von Puffer unterschieden sich nicht von den Ansätzen mit Zugabe der α -HA- oder der α -PAP-Antikörper, es konnte also kein signifikanter Rückgang der relativen Translationsaktivität beobachtet werden. Auch die Behandlung der Rli1p-TAP enthaltenden Translationsextrakte mit Kaninchen-IgG, das auch an die ProtA-Markierung bindet, zeigte keinen Effekt auf die Translationsaktivität (Daten nicht gezeigt). Eventuell können die Antikörper unter den verwendeten Bedingungen nicht binden, oder die Bindung alleine reicht nicht aus um einen Effekt auf die Translationsaktivität zu erzielen.

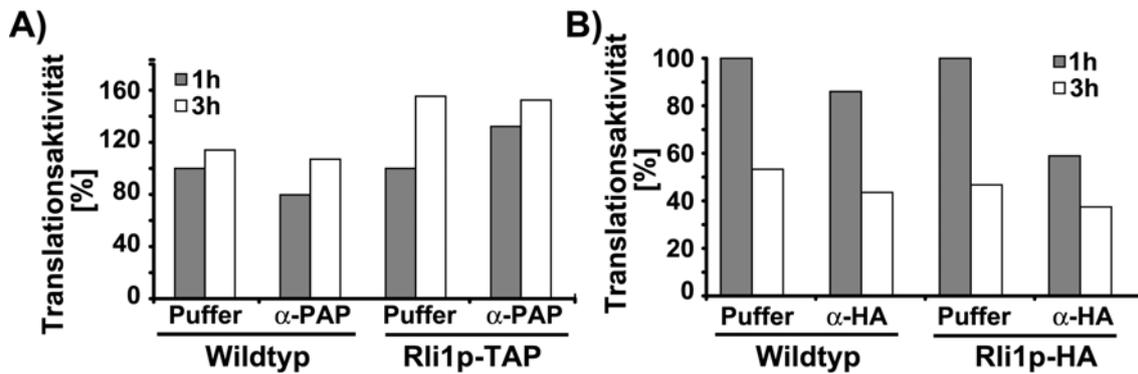


Abb. 2.34: Translationsaktivität nach der Immunoinhibition mit α -PAP- und α -HA-Antikörpern

Für die Immunoinhibition wurden Translationsextrakte mit A) TAP-markiertem (Rli1p-TAP) bzw. B) HA-markiertem Rli1p (Rli1p-HA) hergestellt und mit α -PAP- und α -HA-Antikörpern oder Puffer inkubiert. Als Kontrollen wurden Wildtyp Translationsextrakte (WT) verwendet, die mit dem jeweiligen Antikörper oder Puffer behandelt wurden. Die Translationsaktivität der so behandelten Translationsextrakte wurde mit dem *luc* mRNA-Reporterassay gemessen. Die relative Translationsaktivität der Extrakte ist in % dargestellt.

2.10.5 Immunoinhibition mit einem α -RLI1-Antikörper

Die Inkubation von WT-Extrakten mit dem Serum des α -RLI1-Antikörpers führte im Gegensatz zu den in Abschnitt 2.10.4 verwendeten Antikörpern zu einer deutlichen Reduktion der Translationsaktivität. Das Serum zeigte eine Konzentrationsabhängige Hemmung der Translationsaktivität in Wildtypextrakten, wohingegen ein unspezifischer Antikörper (Kaninchen-IgG) oder Prä-Immunsereum keinen Effekt auf die Translationsaktivität zeigte (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass das verwendete Serum des α -RLI1-Antikörpers für diesen beobachteten Rückgang der Translationsaktivität verantwortlich ist, wurde der α -RLI1-Antikörper mittels Affinitäts-Chromatographie aus dem Serum gereinigt und zur Immunoinhibition eingesetzt.

2.10.5.1 Spezifität des affinitätsgereinigten α -RLI1-Antikörper

Der α -RLI1-Antikörper wurde aus dem Serum über eine Peptid-gekoppelte Säule gereinigt. Um die Spezifität des gereinigten Antikörpers zu zeigen, wurden verschiedene Verdünnungen von Zellextrakten eines WT-Stamms sowie ein Extrakt eines *RLI1*-HA markierten Stammes im Western Blot getestet (Abb. 2.35).

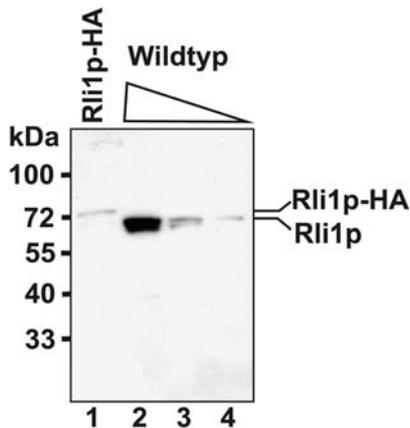


Abb. 2.35: Spezifität des α -RLI1-Antikörpers

Western Blot Analyse von ganzen Zellextrakten in verschiedenen Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000). Das Signal für das HA-markierte Rli1p (Spur 1) lief wie erwartet 3 kDa höher im Vergleich zu unmarkiertem Rli1p (Spur 2-4). Dieses Experiment demonstrierte die Spezifität des α -RLI1-Antikörpers in Zellextrakten.

Der Western Blot in Abb. 2.35 zeigte selbst bei der niedrigsten Verdünnung der Extrakte (Spur 2) nur ein einziges starkes Signal der erwarteten Größe des Rli1p. Das Signal für das 3 kDa größere HA-markierte Rli1p (Spur 1) lief wie erwartet höher im Vergleich zu unmarkiertem Rli1p (Spur 2-4). Dieses Experiment wies die Spezifität des α -RLI1-Antikörpers für Rli1p in Zellextrakten nach. Der gereinigte Antikörper wurde dann für die nachfolgenden Immuninhibitionen verwendet.

2.10.5.2 Immunoinhibition von Translationsextrakten

Für die Immunoinhibition wurde der affinitätsgereinigte α -RLI1-Antikörper in einer Konzentration von 250-500 ng/ μ l eingesetzt. Aliquots der WT-Translationsextrakte wurden mit dem Antikörper vermischt und auf Eis inkubiert. Als Kontrollen wurde entweder der Elutionspuffer der Affinitätsreinigung alleine oder zusätzlich unspezifisches Kaninchen-IgG in gleicher Konzentration zu Translationsextrakten dazugegeben. Die Translationsaktivität wurde über die synthetisierte Luciferase-Menge bestimmt (Abb. 2.36).

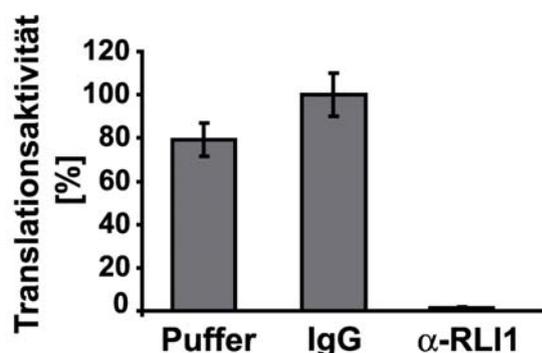


Abb. 2.36: Translationsaktivität nach der Immunoinhibition mit einem α -RLI1-Antikörper.

40 μ l Wildtyp Translationsextrakte wurden 2 h auf Eis mit Puffer, Puffer mit 8 ng/ μ l Kaninchen-IgG oder 8 ng/ μ l α -RLI1-Antikörper inkubiert. Die Translationsaktivität der so behandelten Translationsextrakte wurde mit dem *luc*-mRNA-Reporterassay gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Während die Zugabe des Puffers zu Translationsextrakten lediglich zu einer leichten Reduktion der Translationsaktivität führte (80 %), resultierte die Zugabe des α -Rli1p-Antikörpers in einer vollständigen Inaktivierung der Translationsextrakte. Nach Zugabe des α -Rli1p-Antikörpers konnte keine Translation der Luciferase-mRNA gemessen werden. Um nachzuweisen, dass dieser inhibitorische Effekt des α -Rli1p-Antikörpers tatsächlich auf einer Inaktivierung von Rli1p beruht, wurde das folgende Komplementationsexperiment (*add back*) durchgeführt.

2.10.6 Komplementation immunoinhibierter Translationsextrakte mit gereinigtem Rli1p

2.10.6.1 Reinigung von Rli1p

Da es bisher nicht möglich war, rekombinantes Hefe-Rli1p in aktiver Form aus *E. coli* zu reinigen, wurde Rli1p mit Hilfe der TAP-Methode aus Hefen gereinigt. Zur Verbesserung der Aufreinigung wurde ein stringenter Waschschrift in das Protokoll nach (Rigaut et al., 1999) eingeführt, der verhindert, dass Interaktionspartner des Rli1p und unspezifisch-gebundene Proteine co-eluieren. (vgl. Abb. 2.14). Das finale Eluat wurde anschließend konzentriert und zur Kontrolle der Reinigung mit der SDS-PAGE analysiert (Abb. 2.36). Außer der Rli1p-Bande bei 78 kDa waren keine weiteren Banden sichtbar. Rli1p konnte ohne seine Interaktionspartner und unspezifisch-gebundene Proteine aus Hefe gereinigt werden. Die Proteinkonzentration wurde durch Messen der Absorption bei 280 nm (OD_{280}) auf 100 ng/ μ l bestimmt und dann in verschiedenen Konzentrationen zu den mit Hilfe des α -Rli1p-Antikörper inaktivierten Translationsextrakten gegeben (vgl. Abb. 2.36).

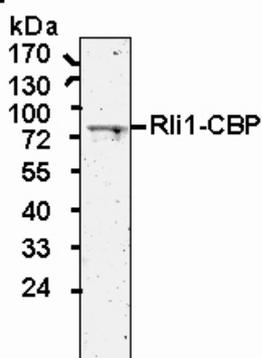


Abb. 2.37: Reinigung des Rli1p-TAP

SDS-PAGE Analyse von TAP gereinigtem Rli1p. Nach der Bindung an die zweite Affinitätsmatrix wurde ein stringenter Waschschrift mit 1 M K-Acetat eingeführt um co-eluierende Proteine zu entfernen. 500 ng des Gesamteluats wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Proteinmenge wurde mit OD_{280} bestimmt und eine finale Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt.

2.10.6.2 Rli1p komplementiert inaktivierte Translationsextrakte

Wie in Abschnitt 2.10.5 beschrieben, wurden die Translationsextrakte mit α -RLI1-Antikörper oder mit Kaninchen-IgG inkubiert. In Gegenwart des inhibierenden α -RLI1-Antikörpers konnte keine Komplementierung durch Zugabe des gereinigten Rli1p erreicht werden. Da das Komplementationsexperiment mit den verfügbaren Proteinkonzentrationen an Rli1p und den in den Ansätzen vorhandenen Überschuss an α -RLI1-Antikörper nicht gelang, wurde eine α -Kaninchen-Schaf-Dynal Affinitätsmatrix zugegeben. So konnte die Antikörper-Konzentration reduziert werden. Die Behandlung der Translationsextrakte mit der Affinitätsmatrix führte weder zu einer Reduktion der Translationsaktivität in der IgG-Kontrolle (Abb. 2.39) noch zu einer Depletion von Rli1p, wie anhand eines Western Blots nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.38).

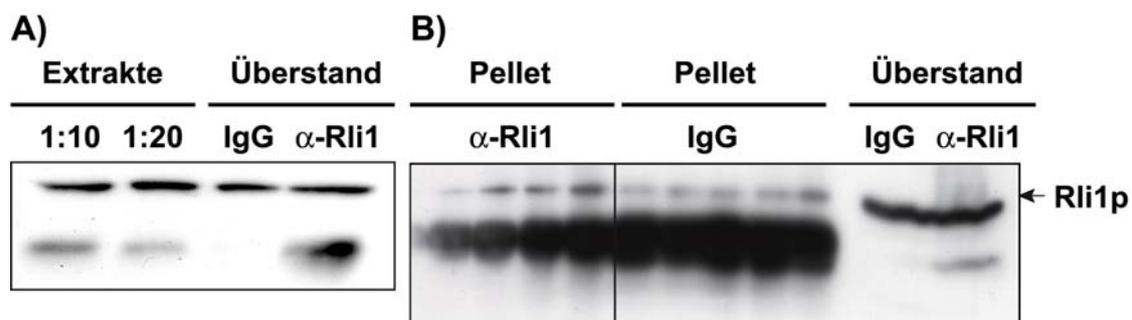


Abb. 2.38: Reduktion des α -RLI1-Antikörpers aus Translationsextrakten führt nicht zur Rli1p-Depletion.

A) Western Blot Analyse vor (Extrakte) und nach (Überstand) der Behandlung mit der Affinitätsmatrix zeigte keine Reduktion von Rli1p aus den gepoolten Überständen der mit Kaninchen-IgG (IgG) bzw. α -RLI1-Antikörper (α -RLI1) behandelten Translations-Extrakte. B) Die Western Blot Analyse der Pellets und des Überstandes aus Parallelansätzen. Der Antikörper wird effizient aus den Extrakten entfernt, die Menge an pelletiertem Rli1p (Pellet) unterscheidet sich nicht bei den Ansätzen mit α -RLI1-Antikörper oder mit IgG. Der Pfeil markiert die Position von Rli1p, die untere Bande entspricht dem Kaninchen-IgG bzw. α -RLI1-Antikörper, der durch den α -Kaninchen-HRP Antikörper auf dem Western Blot erkannt wird.

Im Vergleich zu den Ausgangsextrakten demonstrierte der Western Blot, dass keine Depletion von Rli1p aus den mit Antikörper (IgG bzw. α -RLI1) und mit α -Kaninchen-Schaf-Dynal Affinitätsmatrix behandelten Translationsextrakten erfolgte (Abb. 2.38 A). Nur ein geringer Anteil von Rli1p pelletierte zusammen mit der Affinitätsmatrix, (Abb. 2.38 B). Eine unspezifische Sedimentation einer geringen Menge an Rli1p wurde jedoch auch bei den Ansätzen, die mit IgG inkubiert wurden, beobachtet. Der

Antikörper führte demnach nicht zu einer Depletion des Rli1p Proteins aus den Extrakten, sondern wies einen inhibitorische Effekt auf die Rli1p Funktion auf. Nachdem ein großer Teil des α -RLI1-Antikörpers mit Hilfe der Affinitätsmatrix entfernt wurde eine Test-Translation durchgeführt (Rli1 -), bevor das in Abb. 2.37 dargestellte gereinigte Rli1p in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben wurde.

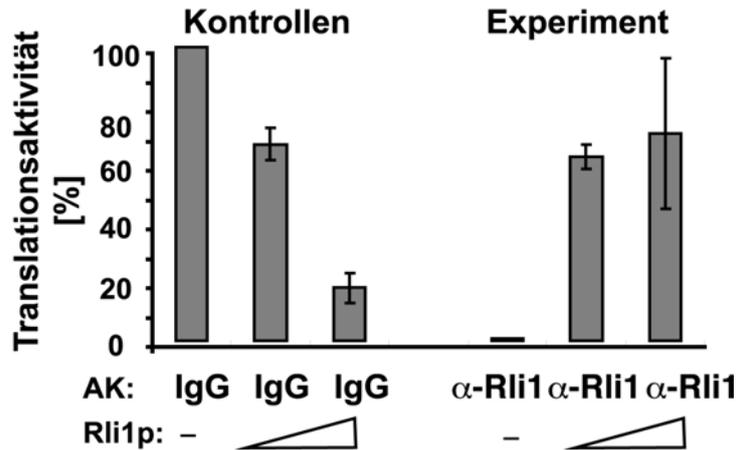


Abb. 2.39: Komplementationsexperiment mit gereinigtem Rli1p.

Immunoinhibition der Translationsextrakte mit dem α -RLI1-Antikörper (AK) (α -RLI1/ Rli1 -) führt zur Hemmung der Translationsaktivität. Die Kontrolle mit Kaninchen- IgG (IgG/Rli1 -) sowie anschließende Behandlung mit der α -Kaninchen-Schaf-Dynal Affinitätsmatrix hatte keinen Einfluss auf die Translationsaktivität. Die steigende Zugabe von gereinigtem Rli1p, die durch das Dreieck dargestellt ist, führt in den Kontrollextrakten (IgG) zu einer Abnahme der Translationsaktivität auf 60 % bzw. 20 %. Die steigende Zugabe des gereinigten Rli1p zu den inaktivierten Extrakten (α -Rli1) führt zu einem Anstieg der Translationsaktivität auf 60 % bzw. 70 %. Die Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Die erfolgreiche Inaktivierung der Translationsextrakte durch den α -RLI1-Antikörper, die bei Behandlung mit einem unspezifischen Antikörper (IgG) jedoch nicht beobachtet wird, ist in Abb. 2.39 gekennzeichnet mit α -RLI1 / Rli1 -, bzw. IgG / Rli1 - (Inaktivierung und 100 % Kontrolle). Auch die zusätzliche Behandlung mit der Affinitätsmatrix, welche zur Abtrennung von überschüssigem α -RLI1-Antikörper zugegeben wurde, hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Translationsextrakte (Abb. 2.39). Die steigende Zugabe von gereinigtem Rli1p (200 ng und 400 ng), die durch das Dreieck in Abb. 2.39 dargestellt ist, führte in den Kontrollextrakten (IgG) zu einer Abnahme der Translationsaktivität auf 60 % bzw. bei Zugabe höherer Rli1p Mengen zu einem Rückgang auf 20 % der ursprünglichen Translationsaktivität. Dieser Effekt ist durch die Veränderung der Pufferbedingungen im Translationsextrakt durch Zugabe der ansteigenden Proteinmengen zu erklären. Die steigende Zugabe des gereinigten Rli1p zu den mit α -RLI1-Antikörper inaktivierten

Extrakten (α -Rli1) führte hingegen zu einem Anstieg der Translationsaktivität auf 60 % bzw. 70 %. Im Vergleich zu den IgG-behandelten Kontrollextrakten bedeutet dies, dass durch die Zugabe von 200 ng gereinigtem Rli1p dieselbe Translationsaktivität in immunoinhibierten Extrakten wie in der Kontrolle erreicht werden kann (60 %). Der durch den α -RLI1-Antikörper hervorgerufene inhibitorische Effekt auf die Translation konnte durch Zugabe von gereinigtem Rli1p spezifisch aufgehoben werden. Um den inhibitorischen Effekt des Antikörpers zu revertieren, wurde noch ein weiteres Experiment durchgeführt. Durch Zugabe des C-terminalen Peptids, das zur Herstellung des Antikörpers verwendet wurde (2.10.5.1), sollte untersucht werden, ob durch eine Kompetition des Peptids mit Rli1p um die Antikörperbindung, der immunoinhibitorische Effekt des α -RLI1-Antikörpers ebenfalls revertiert werden kann. Das Peptid sollte nach Zugabe zu den inhibierten Extrakten den α -RLI1-Antikörper binden und somit Rli1p freisetzen. Dieses Komplementationsexperiment gelang jedoch nicht, weder bei Zugabe des Peptids in die mit α -RLI1-Antikörper inhibierten Extrakte, noch bei Zugabe direkt in die Translationsreaktion (Daten nicht gezeigt). Ein Grund hierfür könnte sein, dass Rli1p in den Extrakten durch den α -RLI1-Antikörper irreversibel inaktiviert wird.

2.10.7 Effekt des α -Rli1-Antikörper

2.10.7.1 Effekt des α -RLI1-Antikörpers in Zellextrakten

Zuerst wurde untersucht, ob eine Inhibition der *luc* mRNA Translation durch den α -RLI1-Antikörper unabhängig von der Verfügbarkeit der Translationskomponenten erfolgte. In den bisher verwendeten Translationsextrakten ist der Translationsapparat (Ribosomen, eIFs, eEFs, tRNAs usw.) mit der endogenen mRNA in Polyribosomen assoziiert. Nur für den Fall, dass die Elongation und die Termination vollendet sind, werden diese Komponenten für eine erneute Translation bzw. Re-Initiation verfügbar. In Translationsextrakten kommt es zur Initiation und zur Translation einer exogen zugefügten Reporter-mRNA nach dem Polyribosomen *run off*. Die endogene mRNA war in den oben beschriebenen Experimenten in den Extrakten enthalten (Abb. 2.36). Um auszuschließen, dass die Inhibition der Translation durch eine Limitierung der Verfügbarkeit der Translationsfaktoren bzw. der Ribosomen zustande kommt,

wurde die endogene mRNA mit Micrococcus S7-Nuclease (MCN) abgebaut und die Immunoinhibition mit dem α -RLI1-Antikörper erneut durchgeführt (Abb. 2.40).

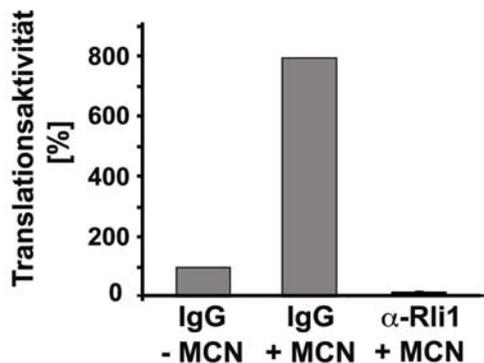


Abb. 2.40: Immunoinhibition ohne endogene mRNA

Immunoinhibition mit dem α -RLI1-Antikörper und unspezifischen Kaninchen-IgG. Der Verdau der endogenen mRNA in den Translationsextrakten durch MCN zeigt einen deutlichen Anstieg der Translationsaktivität in den Kontrolleextrakten mit IgG. Der MCN Verdau beeinflusst nicht die inhibitorische Wirkung des α -RLI1-Antikörpers.

Die Behandlung mit MCN führte zu einer effizienteren Translation der *luc* mRNA (Abb. 2.40), da keine endogene mRNA vorhanden war, die mit der exogen zugefügten mRNA konkurrieren kann. Die Inkubation dieser mit MCN behandelten Extrakte mit einem unspezifischem Antikörper (IgG) hatte keinen negativen Effekt auf die Translationsaktivität, wie bereits in Extrakten ohne Entfernung der endogenen mRNA gezeigt. Im Gegensatz dazu verhinderte der α -RLI1-Antikörper eine Translation der *luc* mRNA in Abwesenheit von endogener mRNA. Da Ribosomen und eIFs in den mit MCN behandelten Extrakten frei zur Verfügung stehen, kann der inhibitorische Effekt des α -RLI1-Antikörpers nicht darauf beruhen, dass die benötigten Translationskomponenten limitierend sind.

Zur Analyse des Effekt des α -RLI1-Antikörper auf die Zellextrakte, wurden diese nach Inkubation mit α -RLI1-Antikörper in einem Saccharose-Gradient aufgetrennt. Die Analyse erfolgte ohne Vorbehandlung der Zellextrakte mit Cycloheximid, so dass die Polyribosomen nicht stabilisiert wurden (vgl. Abb. 2.13). Die Zellextrakte wurden entweder mit Kaninchen-IgG als Kontrolle oder mit verschiedenen Konzentrationen des α -RLI1-Antikörpers (300 ng und 600 ng) 2 h auf Eis inkubiert und mit einem 5-30 % Saccharose-Gradienten aufgetrennt. In Abb. 2.41 ist das UV-Profil der Saccharose-Gradienten dargestellt, die durch die kontinuierliche Messung der OD₂₅₄ während der Probenentnahme aufgezeichnet wurden. Die Proteine in den gesammelten Fraktionen der Gradienten wurden gefällt und die Auftrennung von Rli1p und der Ribosomen durch den Gradient auf einem Western Blot gezeigt.

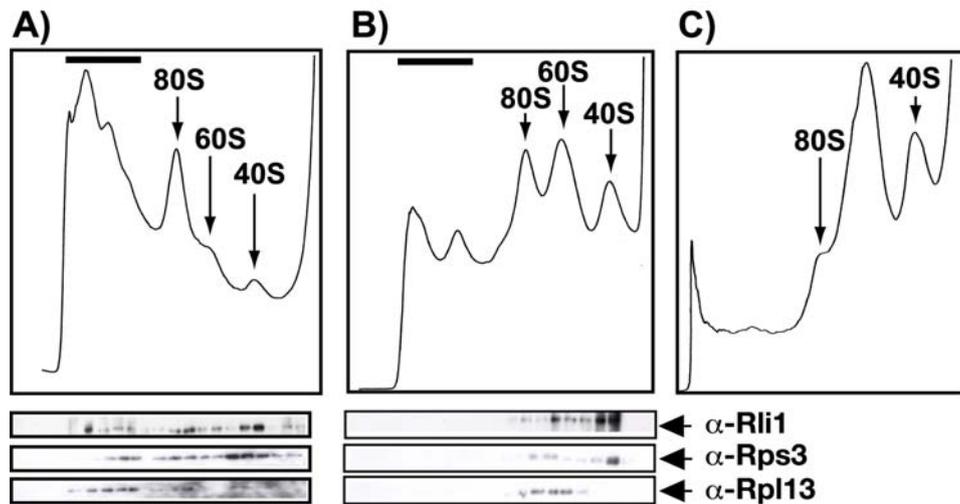


Abb. 2.41: Immunoinhibition von Zellextrakten

Immunoinhibition von Zellextrakten mit dem α -RLI1-Antikörper und unspezifischem Kaninchen-IgG. Auftrennung der Zellextrakte in einem 5-30 % Saccharose-Gradienten. Die Gradientenfraktionen wurden gesammelt während kontinuierlich bei 254 nm die Absorption gemessen wurde. Die Positionen der Polyribosomen sind mit einem Balken gekennzeichnet, 80S, 60S und 40S Positionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **A)** Kontrolle mit 300 ng Kaninchen-IgG **B)** Inkubation mit 300 ng α -RLI1-Antikörper. **C)** 600 ng α -RLI1-Antikörper. Der Western Blot zeigt die Verteilung von Rli1p in dem Gradienten sowie die Verteilung der Markerproteine Rps3 (40S ribosomale Untereinheit) und Rpl13 (60S ribosomale Untereinheit).

Die Behandlung von Zellextrakten mit einem unspezifischen Antikörper (IgG) als Kontrolle hatte keinen Einfluss auf das Polyribosomenprofil (Abb. 2.41 A). Auch die Verteilung des Rli1p in diesem Gradient unterscheidet sich nicht von den Gradienten, die mit Cycloheximid vorbehandelt wurden (vgl. Abb. 2.13). Rli1p co-fraktionierte mit Polyribosomen, 80S Monosomen und hauptsächlich der 40S Untereinheit. Bei einer Inkubation der Translationsextrakte mit 300 ng α -RLI1-Antikörper (Abb. 2.41 B) beobachtet man eine Reduktion der Polyribosomen, sowie eine Abnahme der 80S Ribosomen. Der Rückgang der Polyribosomen und 80S Monosomen wurde noch verstärkt bei einer Zugabe von 600 ng α -RLI1-Antikörper zum Zellextrakt (Abb. 2.41 C). Unter diesen Bedingungen erhält man eine vollständige Reduktion der Polyribosomen und auch die 80S Ribosomen sind nur noch in geringerer Menge im UV-Profil zu erkennen. Die Verteilung von Rli1p im Gradient (Abb. 2.41) verschiebt sich in Richtung der 40S Untereinheit. An den wenigen verbliebenen Polyribosomen ist kein Signal von Rli1p mehr zu detektieren, ein schwaches Signal ist bei dem verbliebenen 80S Monosomen und bei der 60S Untereinheit zu erkennen. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass der α -RLI1-Antikörper in Zellextrakten zu einer Reduktion von Polyribosomen und 80S Ribosomen führt. Diese Beobachtung kann zum einen bedeuten, dass keine neuen 80S Komplexe mehr assembliert werden

können, die vorhandenen Polyribosomen während der Inkubationszeit von der mRNA abdissoziieren und somit ein Initiationsdefekt vorliegt. Zum anderen könnte es auch sein, dass eine Inaktivierung von Rli1p zu einer Dissoziation bereits assemblierter Polyribosomen und 80S Ribosomen führt.

2.10.7.2 Effekt des α -RLI1-Antikörpers auf gereinigte 80S Ribosomen

Da eine Inhibierung des Rli1p mit dem α -RLI1-Antikörper zu einer dramatischen Reduktion des 80S *Peaks* führte wurde nun untersucht, ob es sich bei dieser Aktivität des Antikörpers um eine unspezifische Reaktion auf 80S Ribosomen handelte. Um einen dissoziierenden Effekt des α -RLI1-Antikörpers auf 80S Ribosomen auszuschließen, wurde das Experiment mit gereinigten 80S Ribosomen durchgeführt. Dazu wurde zuerst auf einem Western Blot überprüft, ob Rli1p noch mit diesem assoziiert ist. Es stellte sich heraus, dass auf bei Niedrigsalz (100 mM) gereinigten 80S Ribosomen Rli1p detektiert werden konnte, jedoch Rli1p nach einer Behandlung mit Hochsalz (1 M) nicht mehr vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Die Hochsalz-gereinigten Ribosomen wurden dann mit IgG oder dem α -RLI1-Antikörper inkubiert (Abschnitt 2.10.7.1) und über einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Abb. 2.42).

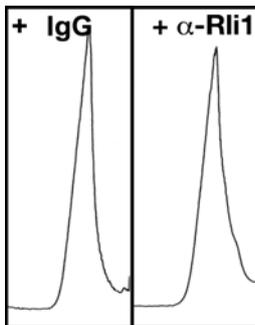


Abb. 2.42: Immunoinhibition gereinigter 80S Ribosomen. Die mit Hochsalz gereinigten 80S Ribosomen wurden mit 300 ng IgG bzw. α -RLI1-Antikörper inkubiert und mit einem 5-30 % Saccharose-Gradient aufgetrennt. Die Gradienten wurden gesammelt während kontinuierlich bei 254 nm gescannt wurde. Die Abbildung zeigt ein Ausschnitt des UV-Profiles an der Position des erhaltenen 80S *Peaks*.

Dieses Experiment zeigte, dass der α -RLI1-Antikörper 80S Ribosomen nicht unspezifisch dissoziieren kann. Außer dem 80S *Peak* waren sowohl bei der IgG Kontrolle als auch bei der Probe mit α -RLI1-Antikörper keine Untereinheiten-*Peaks* im UV-Profil zu detektieren (Abb. 2.42).

2.10.8 Inhibition der Translation durch rli1p-Proteinvarianten

Eine andere Möglichkeit, den Einfluss von Rli1p auf die Translation zu zeigen, stellten die in Abschnitt 2.8 beschriebenen letalen rli1p-Proteinvarianten dar. Es

konnte gezeigt werden, dass diese veränderten Proteine unterschiedlich mit eIF3 Untereinheiten interagieren (Abb. 2.20, Tab. 2.3, Abb. 2.24). Des Weiteren konnte ein dominant-negativer Phänotyp durch starke Überexpression der *rli1* Mutanten unterschiedlicher Ausprägung demonstriert werden (Abb. 2.25): Um zu zeigen, worauf dieser dominant-negative Wachstumsphänotyp beruht, wurde der Einfluss des mutanten Proteins auf die Translation überprüft. Dazu wurden die *rli1p*-Proteinvarianten mit Hilfe der in Abb. 2.19 beschriebenen TAP-Markierung gereinigt (Abb. 2.43). Anschließend wurden die mutanten Proteine im *in vitro* Translations-Reportersystem auf einen dominant-negativen Initiations-Phänotyp untersucht (Abb. 2.44). Dies wurde im Falle eines mutanten Walker B *rli1p* schon analysiert (Dong et al., 2004). Die Autoren beobachteten eine Reduktion der Translationsaktivität in WT-Translationsextrakten durch die Zugabe des mutanten ATPase Proteins. Neben einem mutantern ATPase Protein (*rli1p*K453E) wurden in dieser Arbeit auch ein mutantes FeS Cluster *rli1p* (*rli1p*C65A) und zwei mutante Hinge Proteine (*rli1p*R311E, *rli1p*R573E) untersucht.

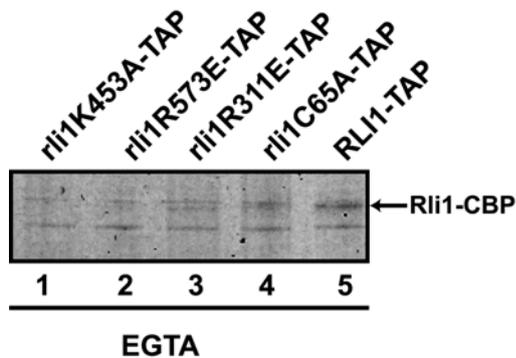


Abb. 2.43: TAP Reinigung der *rli1p*-Proteinvarianten

Reinigung der TAP-markierten *rli1p*-Proteinvarianten (*rli1p*C65A; *rli1p*R311E; *rli1p*R573E und *rli1p*K453E), die mit einem Gal-Promotor exprimiert werden. Als Kontrolle wurde ein WT-RLI1 mit einem Gal-Promotor exprimiert. Nach der Bindung an die zweite Affinitätsmatrix wurde ein stringenter Waschschrift mit 1 M K-Acetat eingeführt um co-reinigende Proteine zu entfernen. 1/10 des Gesamteluats wurden auf die SDS-PAGE geladen und mit Coomassie gefärbt. Die Proteinmenge wurde mit der OD₂₈₀ gemessen und auf eine Konzentration zwischen 30-100 ng/μl bestimmt.

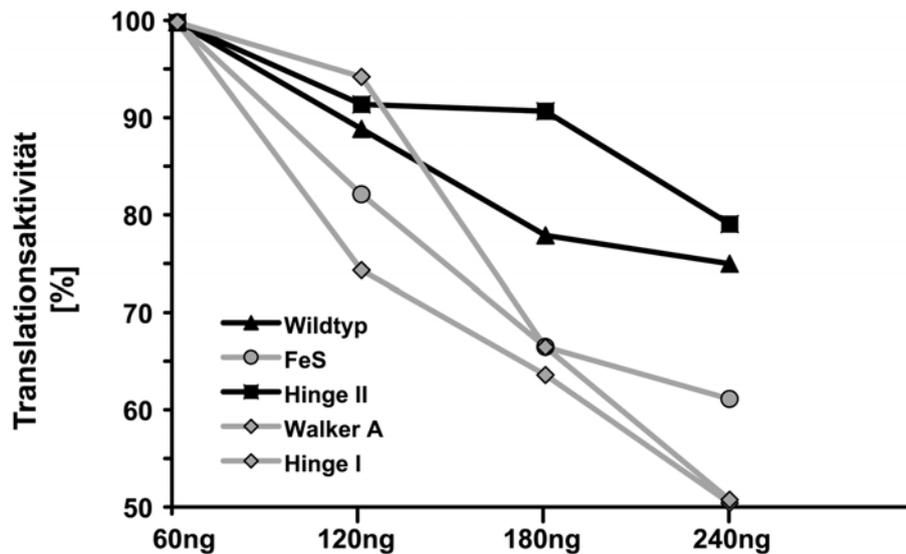


Abb. 2.44: Inhibition der Translation durch mutantes rli1p

In vitro Translation bei gleichzeitiger Zugabe von mutantern rli1p (FeS = rli1pC65A; und; *Clamp* II = rli1pR573E; Walker A = rli1pK453E und *Clamp* I = rli1pR311E) oder WT-Rli1p (WT). Gezeigt ist die relative Translationsaktivität der *luc* mRNA Translation in Abhängigkeit der dazugegebenen Proteinmenge.

In der TAP Reinigung konnten nicht alle Proteinvarianten in gleichen Mengen gereinigt werden, dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Expression der mutanten Proteine zurückzuführen (Abb. 2.43). Die Menge des gereinigten Proteins wurde über die OD₂₈₀ bestimmt und in einem Reporter-mRNA Translationsassay auf Inhibition der Translation in WT-Extrakten untersucht. Dazu wurden verschiedene Mengen des gereinigten WT-Rli1p und der mutanten rli1p-Proteine direkt in die Translationsreaktion gegeben (Abb. 2.44). Der Translationsassay zeigte eine Reduktion der Translationsaktivität auf 65 % durch Zugabe des mutanten FeS *Cluster* Protein (rli1pC65A). Das mutante *Hinge* I Protein (rli1pR311E) sowie das mutante ATPase rli1p (rli1pK453A) führten zu einer Reduktion der relativen Translationsaktivität auf 50 %. Das *Hinge* II mutante rli1pR573E hingegen hatte nur einen geringen Einfluss auf die Translationsaktivität (Rückgang auf 85 %), was vergleichbar zur Zugabe des gereinigten WT-Rli1p ist, dass bei steigender Proteinmengen auch einen Rückgang der Translationsaktivität auf 80 % zeigte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Zugabe des Proteins die Pufferbedingungen der Translationsreaktion verändert werden. Mit diesem Experiment konnte demonstriert werden, dass die Zugabe von inaktivem rli1p zu einer Reduktion der Translation in Wildtypextrakten führt.

2.11 Untersuchungen der Interaktion von *RLI1* mit *HCR1*

Aufgrund der Ergebnisse der Affinitätsreinigung (Abb. 2.14) und der RNaseA Behandlung (Abb. 2.15) wurde eine eIF3-Untereinheit, Hcr1p, als potentieller direkter Interaktionspartner vermutet. Wie in Abb. 2.14 gezeigt wurde, war die Hcr1p Bande im Gegensatz zu den anderen kleinen eIF3-Untereinheiten, Tif34p und Tif35p, gut sichtbar auf dem Coomassie Gel. Zusätzlich dazu wurde die Bindung von Hcr1p und Tif34p nicht durch die RNaseA Behandlung beeinflusst (Abb. 2.15). Auch in einem *Yeast-Two-Hybrid* Test wurde demonstriert, dass Rli1p und Hcr1p interagierten (Ito et al., 2001). Aus diesem Grund sollte nun untersucht werden, was mit dem Rli1p-Komplex passiert, wenn in den Zellen *HCR1* deletiert ist. Wenn es sich bei Hcr1p um den direkten Bindepartner des Rli1p handelt, wird erwartet, dass durch das Fehlen von Hcr1p die Wechselwirkungen des Rli1p zu den anderen Interaktionspartnern verloren gehen.

2.11.1 Synthetisch-temperatursensitiver Phänotyp

Yarunin *et al.* zeigten, dass eine Kombination einer Rli1p-TAP Markierung synthetisch-letal mit einem $\Delta hcr1$ *Knockout* ist (Yarunin et al., 2005). Aus diesem Grund wurde eine kleinere C-terminale Rli1p Markierung gewählt. Um den Stamm herzustellen, wurde ein Stamm mit einer *RLI1*-ProteinA Markierung (RJY1945) mit einem $\Delta hcr1$ Deletionsstamm (RJY2562) gekreuzt. Der entstandene diploide Stamm wurde dann sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Nach zwei Tagen wuchsen nur zwei der Sporen aus, die anderen zwei Sporen zeigten einen Wachstumsdefekt und wurden erst nach einer Woche als sehr kleine Kolonien sichtbar. Die Markeranalyse bestätigte, dass es sich bei den sehr langsam wachsenden Sporen um den gesuchten Stamm (RJY2682) handelt, der sowohl die *RLI1*-ProtA Markierung (His+) als auch den $\Delta hcr1$ *Knockout* (Trp+) trägt. Nach näherer Untersuchung, stellte sich heraus, dass der entstandene Stamm einen Wachstumsdefekt bei höheren Temperaturen (30°C/37°C) aufwies (Abb. 2.45).

Dieser langsam wachsende Stamm ($\Delta hcr1$ *RLI1*-ProtA) mit einem temperatursensitiven-Phänotyp deutete darauf hin, dass eine genetische Interaktion von *RLI1* und *HCR1* besteht. Um auszuschließen, dass die Größe der C-terminalen Rli1p Markierung eine Rolle spielt, wurde die Kreuzung mit einem Stamm mit HA-markierten *RLI1* (RJY1935) wiederholt. Der so hergestellte Stamm $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA

(RJY2776) wurde dann ebenfalls auf einen Wachstumsdefekt bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abb. 2.45).

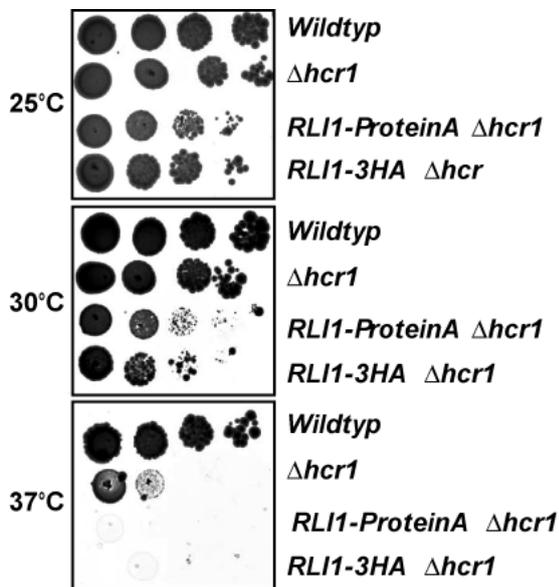


Abb. 2.45: Temperatursensitiver Phänotyp. Der Stamm mit *RLI1*-ProteinA (RPY1945) und *RLI1*-HA wurde mit einem $\Delta hcr1$ *Knockout* Stamm (RPY2562) gekreuzt. Der diploide Stamm wurde sporuliert und die Tetraden analysiert. Durch Markeranalyse wurden die zwei Stämme $\Delta hcr1$ *RLI1*-ProtA und $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA identifiziert. Diese zeigten schon bei 25°C eine stark verlangsamte Wachstumsrate (*slow growth* Phänotyp). Der Wachstumstest bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C) wies neben dem Phänotyp mit verzögertem Wachstum auch eine Temperatursensitivität nach. Bei 30°C erfolgt deutlich schlechteres Wachstum als bei Wildtyp-Zellen und resultierte in einem letalen Phänotyp bei 37°C.

Sowohl die große ProtA-Markierung (30 kDa) als auch die kleine HA-Markierung (3 kDa), die C-terminal an Rli1p fusioniert wurden, zeigte einen synthetisch-temperatursensitiven Phänotyp in Kombination mit einer $\Delta hcr1$ Deletion. Die Zellen wiesen schon bei 25°C ein deutlich langsames Wachstum als die Wildtyp Zellen oder die $\Delta hcr1$ Deletion auf. Bei 30°C wuchsen die Zellen bereits deutlich schlechter als der WT oder $\Delta hcr1$. Bei 37°C waren die Zellen tot, wohingegen der $\Delta hcr1$ Stamm ohne markiertes Rli1p nur verlangsamtes Wachstum zeigte (Abb. 2.45).

2.11.2 Zusammensetzung des Rli1p-Komplexes im $\Delta hcr1$ *Knockout*

Mit dem oben beschriebenen ts-Stamm, $\Delta hcr1$ *RLI1*-ProtA, wurde dann eine Affinitätsreinigung des Rli1p-ProtA durchgeführt, um die direkte Interaktion des Rli1p über Hcr1p an die anderen eIF3 Untereinheiten zu überprüfen. Um die Stabilität des eIF3 in einem $\Delta hcr1$ *Knockout* nachzuweisen, wurde ein Stamm verwendet, der außer einer $\Delta hcr1$ Deletion eine *NIP1*-TAP Markierung trägt (Abb. 2.46).

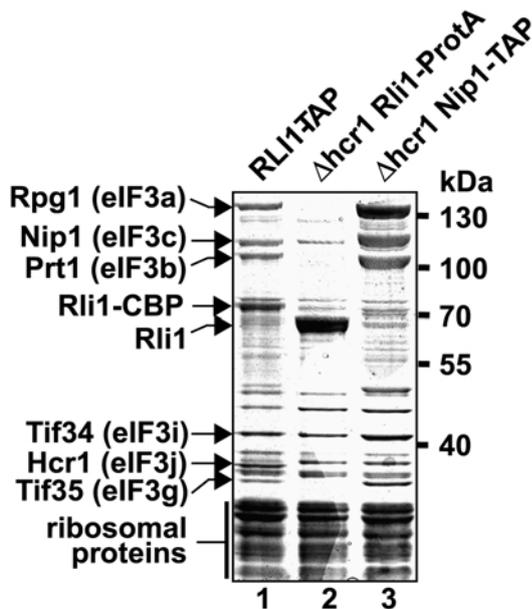


Abb. 2.46: Rli1p-TAP Reinigung im $\Delta hcr1$ Hintergrund

SDS-PAGE Analyse von TEV-Eluaten der TAP Reinigung. Die Zellen wurden auf Grund des *ts*-Phänotyps bei 25°C inkubiert. Extrakte der Stämme *RLI1-TAP* (Spur 1), $\Delta hcr1$ *RLI1-ProtA* (Spur 2) und $\Delta hcr1$ *NIP1-TAP* (Spur 3) wurden verwendet. 20 μ l der TEV-Eluate wurden aufgetragen. Die Pfeile markieren die durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine.

Im TEV-Eluat der Rli1p-TAP Reinigung waren wie erwartet alle eIF3-Untereinheiten sowie ribosomale Proteine zu sehen (Spur 1). Bei einer Reinigung des eIF3 aus einem $\Delta hcr1$ *NIP1-TAP* Stamm (Spur 3) sah man außer dem Verschwinden der Hcr1p Bande keine Veränderung zu einer eIF3-Reinigung in einem WT-Stamm (vgl. Abb. 2.14). Der eIF3 Komplex ließ sich unter diesen Bedingungen stabil reinigen. Die Reinigung von Rli1p-ProtA aus dem $\Delta hcr1$ *RLI1-ProtA* Stamms (Spur 2) zeigte jedoch, dass die Bindung von Rli1p zu manchen eIF3-Untereinheiten verloren ging. Nach wie vor konnten im TEV-Eluat als co-reinigende Proteine Nip1p, Tif34p und ribosomale Proteine ermittelt werden. Wohingegen weder Rpg1p, Prt1p und Tif35p auf dem Gel nachweisbar waren. Das Ergebnis demonstrierte, dass Hcr1p wichtig für die Bindung von Rli1p an die eIF3 Untereinheiten Rpg1p, Prt1p und Tif35p war. Hcr1p kann jedoch nicht der einzige Faktor sein über den Rli1p an eIF3 binden kann, da die Interaktion mit ribosomalen Proteinen nicht beeinflusst wird und zudem die Interaktion mit Tif34p und Nip1p kaum beeinflusst wurde.

2.11.3 Zusammensetzung des Hcr1p-Komplexes

Da sich Hcr1p als wichtiger Interaktionspartner herausstellte und die Bindung von Rli1p zu Rpg1, Prt1p und Tif35p vermittelte, wurde die Zusammensetzung des Hcr1p-Komplexes näher untersucht. Dazu wurde *HCR1* mit einem TAP markiert und der Hcr1p-Komplex TAP gereinigt (Abb. 2.47).

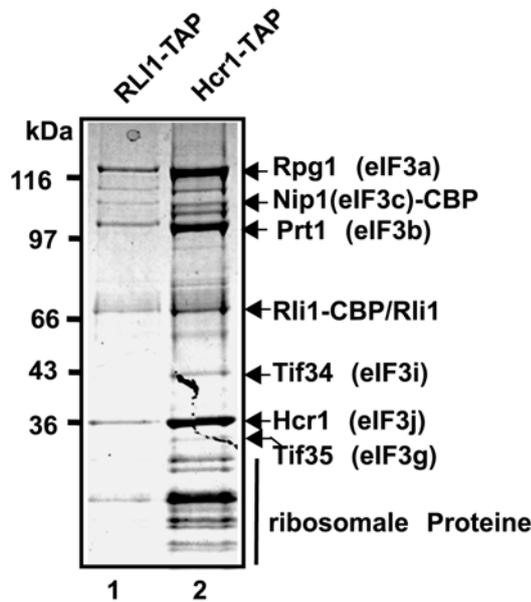


Abb. 2.47: Hcr1p-TAP Reinigung.

SDS-PAGE Analyse von EGTA-Eluaten der TAP Reinigung. Extrakte der Stämme *RLI1-TAP* (Spur 1) und *HCR1-TAP* (Spur 2) wurden verwendet. Die EGTA-Eluate wurden mit TCA gefällt und aufgetragen. Die Pfeile markieren die im Rli1p-TAP Eluat durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine.

Das Eluat einer Hcr1p-TAP Reinigung weist in Bezug auf die eIF3 Untereinheiten fast dieselbe Zusammensetzung wie ein Rli1p-TAP Eluat auf (Abb. 2.47). Somit gleicht die Hcr1p-Reinigung nicht einer eIF3-Reinigung, die mit Nip1p-TAP beobachtet wurde (Abb. 2.14). Hauptsächlich interagierten Rpg1p, Prt1p und ribosomale Proteine, wohingegen Tif34p sehr schwach zu sehen ist. Während in einem Nip1p-TAP Eluat Rli1p nicht stöchiometrisch vorlag (Abb. 2.14), war in dem Hcr1p-TAP Eluat eine deutlich sichtbare Coomassie Bande für Rli1p zu erkennen.

2.11.4 Polyribosomen Analyse des $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm

2.11.4.1 Polyribosomenprofil mit Cycloheximid-behandelten Zellextrakten

Der *ts*-Stamm mit der Kombination einer C-terminalen *RLI1*-Markierung und einer *hcr1* Deletion ($\Delta hcr1$ *RLI1*-HA) wurde auf einen Translationsdefekt hin untersucht. Ein Translationsdefekt konnte für die Immunoinhibition des Rli1p bereits gezeigt werden (Abb. 2.41). Somit wurde erwartet, dass auch der $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm ein ähnliches Polyribosomenprofil aufweist. Dazu wurde der $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm mit Hilfe von Saccharose-Gradienten näher untersucht. Diese Zellen wiesen einen *ts*-Phänotyp auf, und wurden aus diesem Grunde bei 25°C (permissiv) und 37°C (nicht-permissiv) inkubiert (Abb. 2.45). Vor der Auftrennung der Zellextrakte wurden die Polyribosomen mit Cycloheximid (CHX) stabilisiert. Als Kontrolle wurde ein $\Delta hcr1$

Stamm und ein WT-Stamm verwendet und die Co-Fraktionierung mit ribosomalen Markern anhand eines Western Blots untersucht (Abb. 2.48).

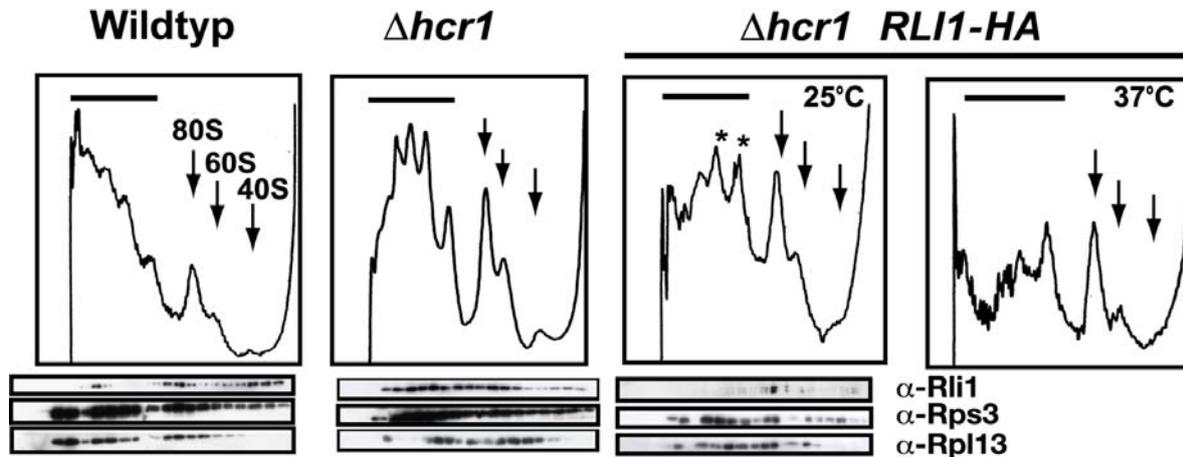


Abb. 2.48: Polyribosomenprofil des $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm

Der Wildtyp-Stamm und der $\Delta hcr1$ Stamm wurden bei 25°C inkubiert. Der $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm wurde bei 25°C wachsen gelassen, bevor die Hälfte der Kultur für weitere 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Alle Stämme wurden mit 100 µg/ml Cycloheximid behandelt bevor Zellextrakte hergestellt wurden. Die Auftrennung erfolgte mit linearen 5 % bis 45 % Saccharose-Gradienten. Die Gradienten wurden gesammelt, während kontinuierlich bei 254 nm gescannt wurde. In den UV-Profilen sind die Positionen der Polyribosomen mit einem Strich gekennzeichnet. 80S, 60S und 40S Positionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Western Blot Analyse zeigt die gesammelten und gefällten Fraktionen. Das Laufverhalten von Rli1p und den Markerproteinen Rps3 (40S ribosomale Untereinheit) und Rpl13 (60S ribosomale Untereinheit) wurden untersucht.

Wie bereits demonstriert wurde, co-fraktionierte Rli1p in einem WT-Stamm mit Polyribosomen, 80S Monosomen und der 40S Untereinheit (Abb. 2.13). In einem $\Delta hcr1$ Stamm beobachtete man im Unterschied zu einem WT-Stamm den Verlust einiger schwerer Polyribosomen, was mit einem leichten Anstieg der 80S Ribosomen einhergeht. Der Western Blot zeigte, dass Rli1p nicht mehr hauptsächlich mit 40S co-fraktionierte. Dafür war die Menge an Rli1p in den Fraktionen mit Polyribosomen und 80S höher. Im Gegensatz zu einer $\Delta hcr1$ Deletion wies der $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm schon bei 25°C eine deutliche Verringerung der schweren Polyribosomen auf, lediglich ein Di- bzw. Trisomen-Peak waren deutlich im UV-Profil zu sehen. Der 80S-Peak in dem $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm zeigte keine Erhöhung, auffällig war jedoch, dass kein 40S-Peak mehr detektiert werden konnte. Die Verteilung von Rli1p in diesem Gradient zeigte, dass der größte Teil des Proteins mit dem 80S-Peak co-fraktionierte. Bei der Inkubation des Stammes $\Delta hcr1$ RLI1-HA für 2 h bei 37°C wurde der beschriebene Phänotyp noch verstärkt. Neben dem Verlust schwerer

Polyribosomen sah man ebenfalls den Verlust des 40S UV-Signals. Der Disomen-*Peak* und der 80S-*Peak* wurden nicht beeinflusst, was auch für den Gradienten bei 25°C beobachtet werden konnte. Der Western Blot zeigte, die gleiche Verteilung von Rli1p wie bei 25°C (Daten nicht gezeigt). Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden neben den CHX behandelten Zellen auch Gradienten untersucht, die mit Formaldehyd (HCHO) fixiert wurden. Im Gegensatz zur CHX Behandlung, die die Ribosomen auf der translatierten mRNA fixiert, werden durch HCHO Behandlung alle Komplexe (43S, 48S und 80S) fixiert und somit stabilisiert. Diese HCHO-Gradienten zeigten jedoch keinen Unterschied zu den oben gezeigten Profilen, somit konnte auch mit einem *Crosslinker* kein korrespondierendes 40S Signal beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

2.11.4.2 Saccharose-Gradient ohne Stabilisierung der Polyribosomen

Durch die oben beschriebene Cycloheximid- oder HCHO Behandlung werden instabile Initiationskomplexe stabilisiert. Es sollte nun untersucht werden, wie sich das UV-Profil verändert, wenn die Zellextrakte der oben beschriebenen Stämme nicht behandelt werden (Abb. 2.49).

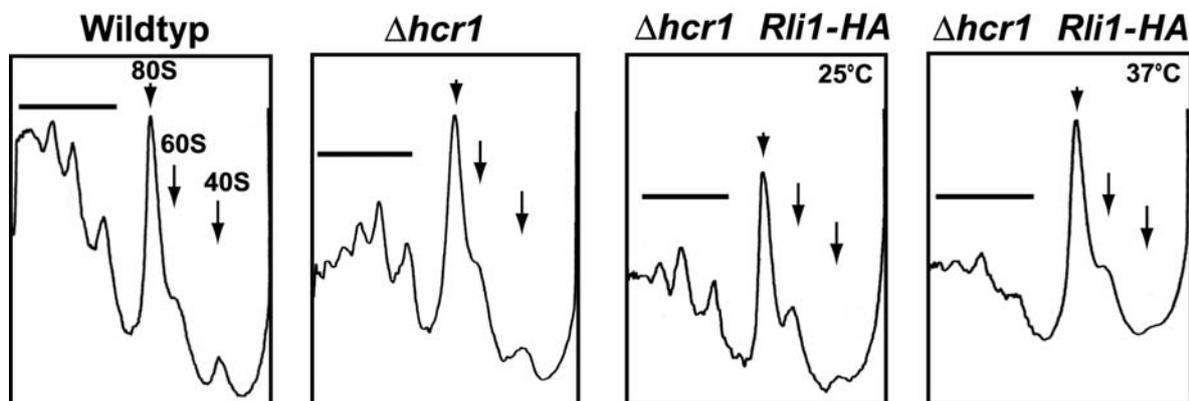


Abb. 2.49: Polyribosomenprofil nicht stabilisierter Zellextrakte

Der Wildtyp-Stamm und der $\Delta hcr1$ Stamm wurden bei 25°C inkubiert. Der $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm wurde bei 25°C wachsen gelassen, bevor die Hälfte der Kultur für weitere 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Die Auftrennung der Zellextrakte erfolgte mit linearen 5 % bis 45 % Saccharose-Gradienten. Die Gradienten wurden gesammelt, während kontinuierlich bei 254 nm gescannt wurde. In den UV-Profilen sind die Positionen der Polyribosomen mit einem Strich gekennzeichnet. 80S, 60S und 40S Positionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Für einen WT-Stamm konnte unter diesen Bedingungen ein normales UV-Profil aufgezeichnet werden (Abb. 2.49). Die unbehandelten Extrakte sind dadurch zu

erkennen, dass allgemein weniger Polyribosomen vorhanden waren. Dafür weist der WT ein höheres Disomen-, 80S-, 60S- und 40S-UV Signal auf, was durch die fehlende Stabilisierung der Polyribosomen zustande kommt (vgl. Abb. 2.48). Der $\Delta hcr1$ Stamm zeigte unter diesen Bedingungen einen deutlichen Verlust der schweren Polyribosomen, hauptsächlich waren die Di- und Trisomen stabil. Die 80S-, 60S- und 40S- *Peaks* unterschieden sich kaum von dem Profil des WT-Stamms. In dem $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm konnte schon bei 25°C ein deutlicher Verlust der Polyribosomen beobachtet werden, und ähnlich zum $\Delta hcr1$ Stamm stabile Di- und Trisomen. Neben der Abnahme des 80S-*Peaks*, war auffällig, dass der 40S-*Peak* nur etwas höher wurde im Vergleich zur Abb. 2.48. Dieser Phänotyp wurde durch die Inkubation der Kulturen auf 37°C noch verstärkt, unter diesen Bedingungen fehlten die schweren Polyribosomen fast vollständig, genau wie der 40S-*Peak*. Dieser Versuch zeigte deutlich, dass durch die Cycloheximid-Behandlung oder durch einen *Crosslinker* (HCHO) instabile Komplexe stabilisiert werden, die auseinander fielen, wenn die Zellextrakte unbehandelt waren. Unerwartet war jedoch, dass unter diesen Bedingungen der 40S *Peak* in den $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Zellextrakten nicht sichtbar wurde. Es stellte sich nun die Frage, ob das Fehlen des 40S *Peak* auf einen Ribosomen Prozessierungsdefekt zurückzuführen war, oder ob dieser *Peak* eher 43S und 48S Initiationskomplexe repräsentieren könnte. Dazu wurden Gradienten mit Polyribosomen und 80S Ribosomen dissoziierenden Bedingungen verwendet.

2.11.4.3 Verhältnis der 60S und 40S ribosomalen Untereinheiten

Für die Bestimmung des 60S/40S Verhältnis in den untersuchten Stämmen wurden Gradienten ohne Magnesium im Puffer durchgeführt, was zur Aufspaltung der Ribosomen in ihre Untereinheiten führt. Mit Hilfe einer *Peak* Integration wurde dann das Verhältnis von 60S/40S bestimmt. Als Kontrolle für einen Stamm mit einem 60S Ribosomen-Prozessierungsdefekt wurde ein $\Delta loc1$ Stamm verwendet und als Beispiel eines leichten 40S Prozessierungsdefekts wurde ein Stamm mit einer $\Delta hcr1$ Deletion verwendet. Die Ergebnisse der UV-Profile, der 60S/40S Verhältnisse und die Co-Fraktionierung von Rli1p mit den Untereinheiten sind in Abb. 2.50 dargestellt.

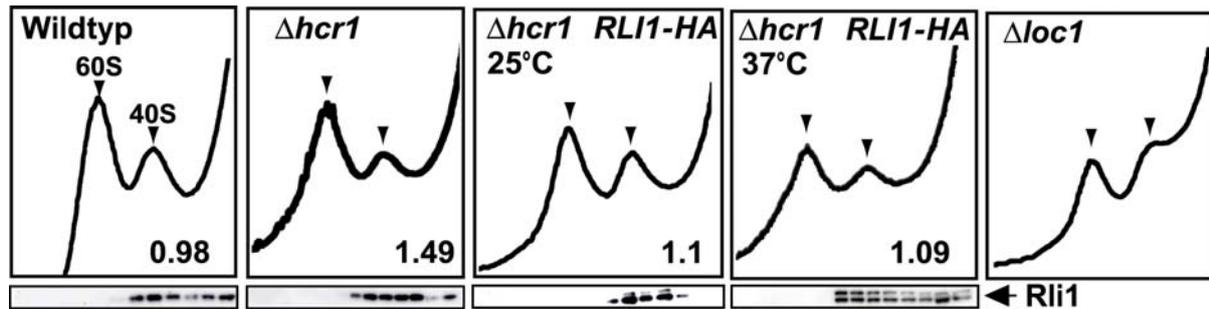


Abb. 2.50: 60S/40S Verhältnis in einem $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm

Der Wildtyp-Stamm und der $\Delta hcr1$ Stamm wurden bei 25°C inkubiert. Der $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm wurde bei 25°C wachsen gelassen, bevor die Hälfte der Kultur für weitere 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Die Zellextrakte wurden mit einem Puffer ohne Magnesium-Ionen hergestellt. Die Auftrennung der so behandelten Zellextrakte erfolgte mit linearen 5 % bis 30 % Saccharose Gradienten. Die Gradienten wurden gesammelt, während kontinuierlich bei 254 nm gescannt wurde. In den jeweiligen Ausschnitten der UV-Profile sind die Positionen 60S und 40S ribosomalen Untereinheiten mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Western Blot Analyse zeigt das Laufverhalten von Rli1p in den gesammelten und gefällten Fraktionen. Die Peaks für 60S und 40S wurden integriert und die Zahlen demonstrieren das 60S/40S Verhältnis.

In einem WT-Stamm war das Verhältnis der 60S/40S = 0,98, dies bedeutet, dass in etwa gleich viele große und kleine Untereinheiten in den Zellen vorhanden sind (Abb. 2.50). In einem $\Delta hcr1$ Stamm, der einen leichten 40S Prozessierungsdefekt aufweist wird das Verhältnis größer (60S/40S = 1.49). Dies bedeutet, dass es mehr 60S Untereinheiten in diesen Zellen gibt. In einem $\Delta loc1$ Stamm, der einen starken 60S Prozessierungsdefekt aufweist wird das Verhältnis kleiner, weil 40S im Überschuss vorhanden ist. Betrachtet man das UV-Profil des $\Delta hcr1$ RLI1-HA Stamm, der bei 25°C oder bei 37°C inkubiert wurde, beobachtete man, dass sich das Verhältnis 60S/40S ungefähr wie in WT-Zellen (60S/40S = 1.1; 60S/40S = 1.09) verhält. Daraus kann man schließen, dass der beobachtete Polyribosomen-Phänotyp der in Abb. 2.48 und Abb. 2.49 gezeigt wurde, nicht dadurch zustande kommt, dass ein Ribosomen Prozessierungsdefekt vorlag, wohingegen in einem $\Delta hcr1$ Stamm eine leichte Verschiebung des Verhältnis 60S/40S aufgezeigt werden konnte. Die Co-Fraktionierung von Rli1p in einem WT-Stamm wird hauptsächlich mit 40S und dem zytoplasmatischen Peak beobachtet, wie anhand eines Western Blots gezeigt werden konnte (Abb. 2.50). In einem $\Delta hcr1$ Stamm co-fraktionierte Rli1p nicht mehr hauptsächlich mit 40S und auch der zytoplasmatische Proteinanteil war geringer im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm. Die Verteilung von Rli1p in den $\Delta hcr1$ RLI1-HA Gradienten bei 25°C zeigte eine eindeutige Co-Fraktionierung mit 40S auf, wobei jedoch ein zytoplasmatischer Proteinanteil hier nicht detektiert werden

konnte. Erstaunlicherweise wurde dies nicht für den Gradient mit dem $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm bei 37°C beobachtet. Trotz des unveränderten 60S/40S Verhältnisses unterscheidet sich die Rli1p Verteilung in diesem Gradienten und gleicht mehr der $\Delta hcr1$ Deletion, d.h. neben einem geringeren Proteinanteil in den zytoplasmatischen Fraktionen ging die Co-Fraktionierung mit 40S verloren und ein Rli1p Signal kann auch in den schwereren Fraktionen detektiert werden.

Die durchgeführte Polyribosomen Analyse des $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stammes konnte keine Übereinstimmung mit dem Translationsphänotyp der Immunoinhibition aufzeigen. Es konnte in beiden Fällen ein Rückgang der Polyribosomen demonstriert werden, jedoch zeigte der $\Delta hcr1$ *RLI1*-HA Stamm einen Anstieg im 80S-Peak und zusätzlich ein Rückgang des 40S-Peaks. Somit entspricht eine Inaktivierung von Rli1p nicht dem Phänotyp, der bei einer Kombination einer C-terminalen *RLI1*-Markierung und einer $\Delta hcr1$ Deletion beobachtet wurde.

3 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe genetischer und biochemischer Methoden die Funktion von Rli1p in *S. cerevisiae* aufzuklären. Dazu wurde eine konditionale *rli1* Mutante hergestellt, die Voraussetzung für die Untersuchung eines essentiellen Gens ist. Der biochemische Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Lokalisierung und der Interaktion von Rli1p mit eIF3 und ribosomalen Proteinen, sowie der Aufklärung einer direkten Funktion von Rli1p in der Translation.

3.1 Identifizierung essentieller Domänen in Rli1p

Um die aus der Struktur des homologen *P. furiosus* (*Pfu*) RLI1 (Karcher et al., 2005) erhaltenen Erkenntnisse experimentell zu testen, wurden konservierte und strukturell wichtige Motive des *S. cerevisiae* Rli1p mit einer ortsspezifischen Mutationsanalyse untersucht. Dabei wurde der Effekt von Mutationen in den entsprechenden Motiven *in vivo* untersucht. Diese Mutantanalyse demonstrierte, dass neben den zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBDs) auch der FeS Cluster und die Hinge Domänen essentiell für die Funktion von Rli1p sind (Abb. 4.1).

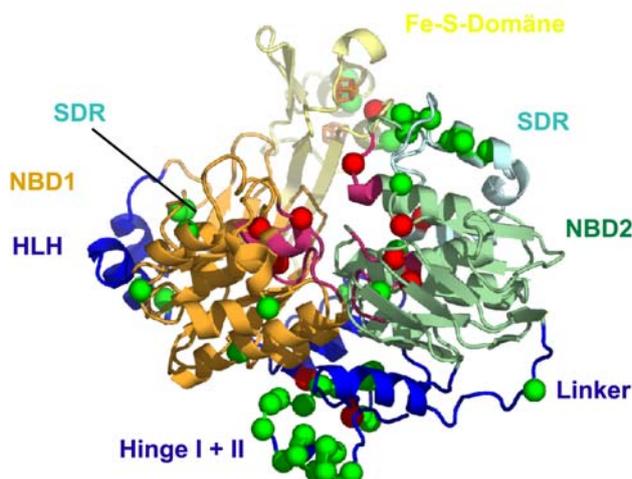


Abb. 4.1: Struktur von *P. abyssi* (*pab*) RLI zur Veranschaulichung der Mutationsanalyse.

Kristallstruktur des *pab*RLI mit FeS Cluster (mit freundlicher Genehmigung von KP. Hopfner und A. Karcher; nicht publizierte Daten). In der Struktur rot markierte Aminosäuren zeigen letale, in grün markierte Aminosäuren zeigen nicht letale Aminosäuresubstitutionen an. Abkürzungen: **NBD** = Nukleotid-Bindedomäne; **HLH** = *helix-loop-helix*; **SDR** = strukturell diverse Region (Bereich zwischen Walker A und *Signature*, der in den verschiedenen Strukturen der ABC-ATPasen unterschiedliche Sekundärstruktur Motive aufweist).

Alle Aminosäuresubstitutionen, die in den Walker A-, Walker B- oder den *Signature*-Motiven der zwei NBDs durchgeführt wurden, führten zu einem Funktionsverlust von Rli1p. Dies deutet darauf hin, dass die ATP-Hydrolyse in beiden NBDs wichtig für die

zelluläre Funktion ist, wie auch anhand der Struktur vorausgesagt wurde, da in beiden aktiven Zentren ein ADP-Molekül co-kristallisiert werden konnte (Karcher et al., 2005).

Eine Aminosäuresubstitution in dem ersten FeS *Cluster* Bindemotiv (C29→A) führte zu funktionalem Rli1p (Tab. 2.1). Dies könnte dadurch verursacht werden, dass das FeS *Cluster* durch die restlichen drei Cysteine im Bindemotiv noch richtig koordiniert werden kann. Kispal *et al.* demonstrierten, dass beide FeS *Cluster* Bindemotive für die Funktion des Proteins essentiell sind, jedoch wurden in dieser Studie andere koordinierende Aminosäure (C25→S und C61→S) ausgetauscht (Kispal et al., 2005). Eine Aminosäuresubstitution im zweiten FeS *Cluster* Bindemotiv C65→A resultierte in einem Funktionsverlust von Rli1p, was wahrscheinlich durch einen falschen oder fehlenden Einbau des FeS *Clusters* verursacht wurde (Tab. 2.1).

In der *Hinge* I Domäne wurde eine essentielle Aminosäure identifiziert (R311). Der Austausch der basischen Aminosäure Arginin an Position 311 durch die saure Aminosäure Glutamat führte zu inaktivem Rli1p (R311→E). Die *Hinge* I Domäne verbindet die zwei ATPase Domänen und ist wahrscheinlich an einer Bewegung innerhalb des Proteins während der ATP-Bindung beteiligt. Die *Hinge* II Domäne, die neben den zwei NBDs und der *Hinge* I Domäne auch hoch konserviert ist, wurde ebenfalls als essentielle Domäne identifiziert; der Austausch von R573→E und S588→E führte zu nicht funktionalen Rli1p.

Mutationen, die in der wenig konservierten strukturell diversen Region (SDR) eingeführt wurden, zeigten dagegen keine Auswirkung auf die Funktion. Diese SDR wurde in anderen ABC ATPasen (Rad50 und BtuCD) als wichtige Domäne für die Kommunikation der NBD mit weiteren Domänen identifiziert {Hopfner, 2000 #105}(Locher et al., 2002). Auch Aminosäuresubstitutionen im *helix-loop-helix* Motiv hatten keinen Einfluss auf die Funktion von Rli1p. Hierbei handelt es sich um eine hoch konservierte Domäne, die als potentielle Substratbindungsdomäne vorhergesagt wurde, da sie exponiert vorliegt und zudem im engen Kontakt mit dem aktiven Zentrum der NBD 1 steht. (Abb. 4.1). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass für die Substratbindung eine der oben als essentiell beschriebenen Domänen verantwortlich ist. Die *Hinge*-Domänen oder das FeS *Cluster* sind mögliche Kandidaten, da diese essentiell sind und zudem exponiert liegen. Eine mögliche Funktion des FeS *Cluster* könnte hierbei die Modifizierung eines Substrates sein, eventuell durch eine Elektronenübertragung. Anhand der Struktur des *pabRLI1*

wurde ein Ferredoxin-ähnlicher Mechanismus der Elektronenübertragung des FeS *Clusters* vermutet (A. Karcher; Dissertation LMU München). Ein Beispiel einer Modifikation bei der eine Elektronenübertragung erforderlich sein könnte, wäre eine Methylierungsreaktion. Eine Dimethylierungsreaktion, an der Rli1p aufgrund seiner beschriebenen Funktion (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005) eventuell beteiligt sein könnte, erfolgt während der 40S prä-Ribosomen Reifung im Zuge der 20S prä-rRNA Prozessierung (Fromont-Racine et al., 2003; Tschochner and Hurt, 2003).

3.2 Konditionale *rli1* Mutante

Um pathologische Effekte eines essentiellen Proteins in Zellen untersuchen zu können, ist es notwendig eine konditionale Mutante herzustellen. Durch die ortsspezifische Mutagenese konnten nur Aminosäuresubstitutionen in Rli1p identifiziert werden, die entweder zu nicht- oder zu voll-funktionalen Rli1p führten, welches auch durch eine Inkubation der Zellen bei erhöhten Temperaturen zu keinem Wachstumsdefekt führte (Tab. 2.1; Abb.2.2). Die Einführung zufälliger Mutationen in *RLI1* mit Hilfe der chemischen (Abschnitt 2.2.1.1) oder der PCR-Mutagenese (Abschnitt 2.2.1.2) führte zur Identifizierung eines temperatursensitiven *rli1^{ts}*-Stamms, der sich jedoch als genetisch instabil herausstellte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch Überexpression eines anderen Gens der Phänotyp kompensiert werden konnte und der Stamm aus diesem Grund seine temperatursensitiven Phänotyp verlor. Dieses Phänomen ist auch als spontane Suppression bekannt und entsteht durch die Anpassung der Hefen an Stress-Situationen, die hier in diesem Fall durch die Temperatur entsteht.

Aus diesem Grund wurde versucht Rli1p *in vivo* zu depletieren. Dies wurde durch Repression der *RLI1* Transkription mit Hilfe reprimierbarer Promotoren erreicht. Bei allen hier verwendeten regulierbaren Promotoren, wurde nach der Repression der Genexpression ein sehr langsamer Abbau (6-8 h) von Rli1p beobachtet (Abb. 2.6, Abb. 2.7). Ein besseres System ist der gezielte Abbau von Proteinen mit Hilfe einer Destruktions-Markierung bzw. einem so genannten „Degron“. Das in dieser Arbeit verwendete „Degron“, welches bereits für viele essentielle Gene erfolgreich verwendet wurde (Varshavsky, 1996), erwies sich jedoch als ineffizient für die gerichtete Rli1p Degradation. Der gezielte Abbau von Rli1p mit Hilfe des Ubiquitin/Proteasom-Systems (Abb. 2.8) erfolgte nicht schneller als der nicht-

induzierte Abbau durch zelluläre Proteasen, der nach einer Promotor-Repression erfolgt (vgl. Abb. 2.6, 2.7). Aufgrund des langsamen Abbaus durch eine *in vivo* Depletion von Rli1p und der damit verbundenen Auswirkungen auf mehrere Prozesse in Zellen wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* System für die Aufklärung der Funktion von Rli1p verwendet.

3.3 Subzelluläre Lokalisierung von Rli1p in Zellen

Für die nähere Charakterisierung der Funktion von Rli1p wurde die subzelluläre Verteilung analysiert. So konnte eine zytoplasmatische Lokalisierung von Rli1p mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 2.9). Das gleiche Ergebnis wurde auch mit einem Rli1p-GFP Fusionsprotein in lebenden Zellen beobachtet (Abb. 2.9). Während das Zytoplasma ein starkes Signal aufwies, erschien der Zellkern mit allen hier verwendeten Nachweismethoden ausgespart. Dieses Ergebnis wurde in einer anderen Studie mit Hilfe einer Rli1p-TAP Markierung bestätigt (Yarunin et al., 2005), wohingegen Dong *et al.* eine gleichmäßige Verteilung von Rli1p-GFP in der ganzen Zelle zeigten (Dong et al., 2004). Darüber hinaus wiesen Yarunin *et al.* nach, dass Rli1p-TAP unter bestimmten Bedingungen im Zellkern akkumuliert werden konnte (Yarunin et al., 2005). In einer *crm1-1/xpo1-1* Mutante ist der Export ribosomaler Untereinheiten aus dem Zellkern blockiert. Unter diesen Export-Block Bedingungen wurde eine Anreicherung von Rli1p-TAP im Zellkern beobachtet (Yarunin et al., 2005). Diese Beobachtung spricht dafür, dass ein kleiner Anteil von Rli1p in den Zellkern gelangen kann und dort durch einen Ribosomenexport-Block akkumuliert werden kann. Mit den hier verwendeten Methoden kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Anteil von Rli1p im Zellkern lokalisiert ist. Der Hauptanteil von Rli1p liegt jedoch im Zytoplasma vor, was auch mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion von Rli1p in der Translation zusammenpasst.

Die nähere Analyse der subzellulären Lokalisierung von Rli1p mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation und der Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Co-Fraktionierung von Rli1p mit Ribosomen aufzeigen (Abb. 2.11; Abb. 2.13). Die Auftrennung in einem Glycerol-Gradienten demonstrierte, dass Rli1p (68 kDa) in einem größeren Komplex vorlag, der eine geschätzte Größe von 1 MDa aufwies (Abb. 2.12). Im Gegensatz zu Glycerol-Gradienten, mit dem nur kleinere Komplexe

(50 kDa - 1 MDa) aufgetrennt werden, können mit einem Saccharose-Gradient größere Komplexe analysiert werden. Der Pool an zytoplasmatischen Proteinen wandert kaum in den Saccharose-Gradienten ein und kann in der obersten Fraktion durch einen hohen UV-*Peak* nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Glycerol-Gradienten wurde in den Saccharose-Gradienten ein gewisser Anteil von Rli1p in dieser obersten, zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen (Abb. 2.13). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass Rli1p sowohl mit den translatierenden Polyribosomen als auch mit 80S Ribosomen und hauptsächlich mit der 40S ribosomalen Untereinheit co-fraktioniert (Abb. 2.13). Diese Beobachtungen deuteten bereits darauf hin, dass die Hauptfunktion von Rli1p mit der Funktion von Ribosomen verknüpft ist und sind in Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion von Rli1p in der Translation (Abschnitt 3.5).

3.4 Interaktion mit eIF3 und ribosomalen Proteinen

In Übereinstimmung mit der Co-Fraktionierung von Rli1p mit Ribosomen, konnte mit Hilfe der TAP-Reinigung nachgewiesen werden, dass Rli1p mit ribosomalen Proteinen und Untereinheiten des eIF3 interagiert (Abb. 2.14). Nach dem ersten Affinitätsschritt der Rli1p-TAP Reinigung konnten neben den ribosomalen Proteinen auch alle Untereinheiten des eIF3-Komplexes mitgereinigt werden. Auch andere Komponenten des Multifaktorkomplexes (MFC) z.B. eIF5/Fun12 konnten identifiziert werden. Dieses Ergebnis wurde durch eine andere Studie bestätigt. Mit Hilfe einer Reinigung von His-markierten Rli1p und anschließender Detektion mit Antikörpern konnte eine Bindung von Rli1p mit dem gesamten MFC (eIF2, eIF3, eIF5) nachgewiesen werden (Dong et al., 2004).

Nach dem zweiten Affinitätsschritt wurde jedoch der Verlust der Bindung von Rli1p zu Nip1p beobachtet, auch die Menge an co-eluierendem Tif34p und Tif35p nahm ab (Abb. 2.14). Andere Komponenten des MFC, wie eIF5, konnten ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Interaktionsstudien, die mit dem Multifaktorkomplex durchgeführt wurden (Valasek et al., 2003)(Abb. 4.2), so stellt man fest, dass eIF1, eIF2, und eIF5 hauptsächlich über eIF3c/Nip1p mit eIF3 assoziiert sind. Insofern stimmen diese Ergebnisse mit vorangegangenen Studien überein (Hinnebusch, 2006), dass ein Verlust der Untereinheit eIF3c/Nip1p auch zum Verlust der anderen eIFs führen kann.

Im Gegensatz dazu, wurde die Bindung zu den eIF3 Untereinheiten Rpg1p, Prt1p und Hcr1p sowie die Interaktion mit ribosomalen Proteinen nicht beeinflusst. Diese können nach wie vor im EGTA-Eluat identifiziert werden (Abb. 2.14). Die Untereinheiten eIF3i/Tif34p und eIF3g/Tif35p sind über eIF3b/Prt1p assoziiert, welches in der Rli1p-TAP Reinigung als nahezu stöchiometrische Bande identifiziert wurde. Die über eIF3b/Prt1p assoziierten Untereinheiten eIF3i/Tif34p und eIF3g/Tif35p co-eluierten in geringeren Mengen, aus diesem Grund ist die Bindung von Rli1p in dem Modell (Abb. 4.2) mit eIF3a/Rpg1p, eIF3b/Prt1p und Hcr1p eingezeichnet. Da es sich bei der TAP-Reinigung durch Kombination zweier Affinitätsschritte um eine stringenteren Reinigungsmethode als die von Dong *et al.* verwendete His-Reinigung handelt, wäre es möglich, dass Rli1p nur mit einem Subkomplex von eIF3 (Rpg1p/Prt1p/Hcr1p) assoziiert vorliegt und zusätzlich mit ribosomalen Proteinen interagiert (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Ein Modell für die Interaktion von Rli1p mit einem potentiellen eIF3 Subkomplex auf dem Ribosom ist in Abb. 4.2 dargestellt.

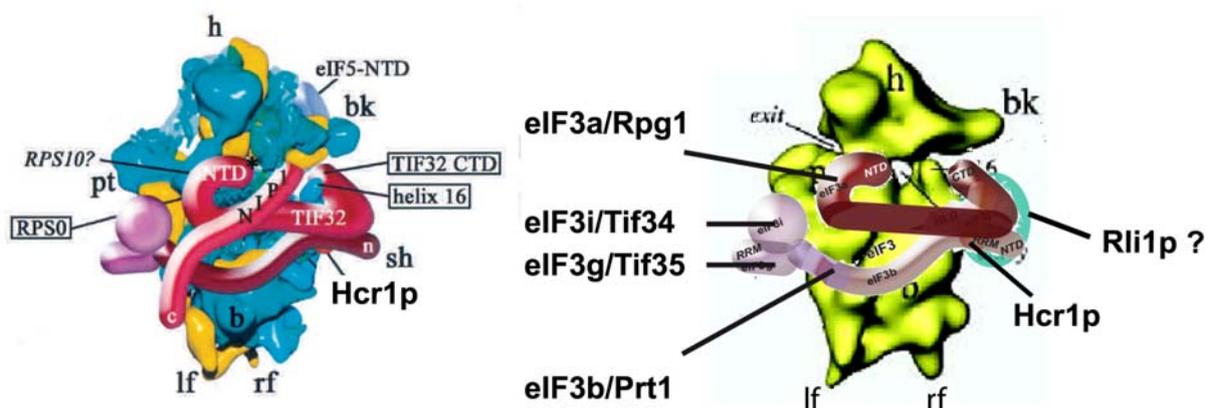


Abb. 4.2: Modell der Interaktionen von Rli1p mit eIF3 Untereinheiten und den ribosomalen Proteinen.

Rechts: Modell der Interaktion von eIF3 mit dem 40S Ribosom nach (Valasek *et al.*, 2003). Links: Interaktionsstudie des Multifaktorkomplexes modifiziert aus (Hinnebusch, 2006) (Spahn *et al.*, 2001) angepasst an die Resultate dieser Arbeit. Dargestellt sind nur die in der Reinigung mit Rli1p identifizierten Interaktionspartner eIF3a/Rpg1p, eIF3b/Prt1p, eIF3j/Hcr1p sowie eIF3i/Tif34p und eIF3g/Tif35. Die hypothetische Bindungsstelle von Rli1p an die eIF3 Untereinheiten, beruht auf den identifizierten stöchiometrischen Bindungen der Reinigung (türkiser Kreis). Die Bindung an das 40S Ribosom wurde anhand der Abbildung rechts modelliert. Abkürzungen: h = Kopf; bk = Schnabel; sh = Schulter; pt = Plattform; b = Körper; lf=linker Fuß; rf=rechter Fuß.

Das Vorhandensein von einem aktivem eIF3 Subkomplex bestehend aus Nip1p/Rpg1p/Prt1p sowie eines nicht-aktiven eIF3 Subkomplex zusammengesetzt aus Prt1p/Tif35p/Tif34p wurde auch schon in früheren Studien beobachtet (Abb. 1.9) (Phan et al., 2001). Es wäre demnach denkbar, dass Rli1p mit einem bisher unbekanntem eIF3 Subkomplex interagiert. Ein Verlust mancher Untereinheiten von eIF3 während des zweiten Affinitätsschrittes der Reinigung oder eine proteolytische Degradation dieser Untereinheiten konnte ausgeschlossen werden. Der ganze eIF3 Komplex konnte mit einer Nip1p-TAP Markierung co-gereinigt werden und alle Untereinheiten blieben nachweisbar.

Dass eIF3 nur zu einem geringen Anteil mit Rli1p assoziiert vorliegt und es mehr Kopien von eIF3 Untereinheiten als von Rli1p in Hefe gibt, wird deutlich, wenn man die Eluate der Rli1p-TAP Reinigung mit denen einer Nip1p-TAP Reinigung vergleicht (Abb. 2.14). Auch gemäß der Hefe-GFP-Datenbank liegen von Rli1p ungefähr 3000 Moleküle pro Zelle vor, wohingegen von den eIF3-Untereinheiten ungefähr 30000 Kopien in einer Zelle existieren (Ghaemmaghami et al., 2003). Die substöchiometrische Assoziation wird ebenfalls deutlich, wenn man die Eluate der Nip1p-TAP Reinigung betrachtet (Abb. 2.14). Während alle fünf eIF3 Untereinheiten (Nip1p-TAP, Rpg1p, Prt1p, Tif34p und Tif35p) sowie Hcr1p in stöchiometrischen Mengen mit Nip1p co-eluierten, konnte Rli1p im Eluat nur mit einem α -RLI1-Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen zum Teil mit Ergebnissen anderer Studien überein (Yarunin et al., 2005) (Dong et al., 2004) und stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Affinitätsreinigung von Kispal *et al.*, die eine Co-Reinigung von Rli1p-TAP ausschließlich mit ribosomalen Proteinen der 40S und 60S Untereinheit nachwies (Kispal et al., 2005). Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass Rli1p möglicherweise mit einem bisher unbekanntem eIF3 Subkomplex (Abb. 4.2) interagieren könnte, ist jedoch neuartig und wurde nicht durch andere Studien bestätigt. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass Rli1p den eIF3 auf dem Ribosom assembliert oder richtig positioniert (Abb. 4.11).

3.5 Translationsinhibition durch *in vitro* Depletion von Rli1p

Als Interaktionspartner von Rli1p wurden Untereinheiten des Translationsinitiationsfaktors eIF3 sowie ribosomale Proteine identifiziert (Abb. 2.14), deshalb liegt es nahe, dass auch Rli1p eine Rolle bei der Translation (Dong et al., 2004) oder der Ribosomenbiogenese spielt (Kispal et al., 2005) (Yarunin et al., 2005). Da Translation und Ribosomenreifung zwei gekoppelte Prozesse sind, die sich stark gegenseitig beeinflussen, war mit Hilfe der in anderen Studien verwendeten *in vivo* Depletionssysteme (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005) nicht klar, welches der primäre Effekt einer Rli1p Depletion ist. Kispal *et al.* und Yarunin *et. al* zeigten, dass durch Repression der *RLI1* Transkription ein Defekt im Ribosomenexport und in der Ribosomenbiogenese entsteht, bevor die Proteinbiosynthese beeinflusst wurde (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Zur Durchführung dieser Experimente wurden nach mehr als 15 h nach Repression der *RLI1* Transkription der Export und die Proteinbiosynthese gemessen. Nicht untersucht wurde, ob es nach der Promotor-Repression zu einem früheren Zeitpunkt bereits zu Translationsdefekten kommt (Kispal et al., 2005) (Yarunin et al., 2005). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Ribosomenexport und Reifungsdefekte durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus verursacht werden, da auch eine Translationsinhibition zur Hemmung der Ribosomenbiogenese führt und daraus resultierend zu einer Akkumulation ribosomaler Untereinheiten im Zellkern (Tschochner and Hurt, 2003).

Mit einem anderen System, einer Proteindepletion mit Hilfe eines Ubiquitin/Proteasom-Degradationssystems, demonstrierten Dong *et al.*, dass bereits nach 8 h eine Reduktion der Translation stattfindet (Dong et al., 2004), jedoch wurde nicht untersucht, ob zu diesem Zeitpunkt bereits der Export ribosomaler Untereinheiten aus dem Zellkern inhibiert ist. Die Translationsaktivität konnte durch Zugabe von gereinigtem FLAG-Rli1p nicht wiederhergestellt werden (Dong et al., 2004). Die fehlende Rekonstitution könnte darauf hinweisen, dass die Extrakte durch den langsamen Abbau von Rli1p (8 h) irreversibel geschädigt wurden und damit wichtige Komponenten in dem Translationsextrakt nicht-funktional oder nicht vorhanden sind. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die beobachtete Abnahme der Translationsaktivität nicht durch die Reduktion von Rli1p hervorgerufen wird, sondern durch eine andere Komponente verursacht wird. Aufgrund anderer

Studien kann man spekulieren, dass es sich hierbei um fehlende oder fehlerhaft prozessierte Ribosomen in den Translationsextrakten handeln könnte (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005), was nicht untersucht wurde (Dong et al., 2004). Das Auftreten sekundärer Effekte kann weder für das Degron-System (Dong et al., 2004) noch für das oben beschriebene Tet^{off}-System (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005) ausgeschlossen werden. Der Abbau von Rli1p erfolgte mit dem Degron-System (8 h) wesentlich schneller als der Abbau mit dem Tet^{off}-System (15 h). Aus diesem Grunde liegt es nahe, dass die beobachtenden Translationsdefekte zuerst erfolgen (Dong et al., 2004) und dann erst die beschriebenen Ribosomenexport bzw. Reifungsdefekte auftreten (Yarunin et al., 2005). Die zwei verschiedenen Depletionssysteme können jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Geschwindigkeit des Rli1p Abbaus sehr unterschiedlich erfolgte. Somit wird auch ein Effekt auf die oben beschriebenen zellulären Prozesse unterschiedlich schnell beobachtet.

Um den primären Effekt einer Rli1p Depletion besser untersuchen zu können, wurden deshalb *in vitro* Depletionssysteme entwickelt. Nach der Inaktivierung von Rli1p in Zellextrakten kann so ein direkter Einfluss von Rli1p auf die Translation nachgewiesen werden, da nur dann ein Effekt in Translationsexperimenten auftritt, wenn Rli1p direkt an diesem Prozess beteiligt ist. Beeinflusst Rli1p ausschließlich die Ribosomenreifung, so würde man mit diesem *in vitro* Depletionssystem keinen Effekt auf die Translation beobachten. In Abb. 4.3 sind die Probleme der *in vivo* Depletion aufgezeigt und mit der *in vitro* Depletion verglichen.

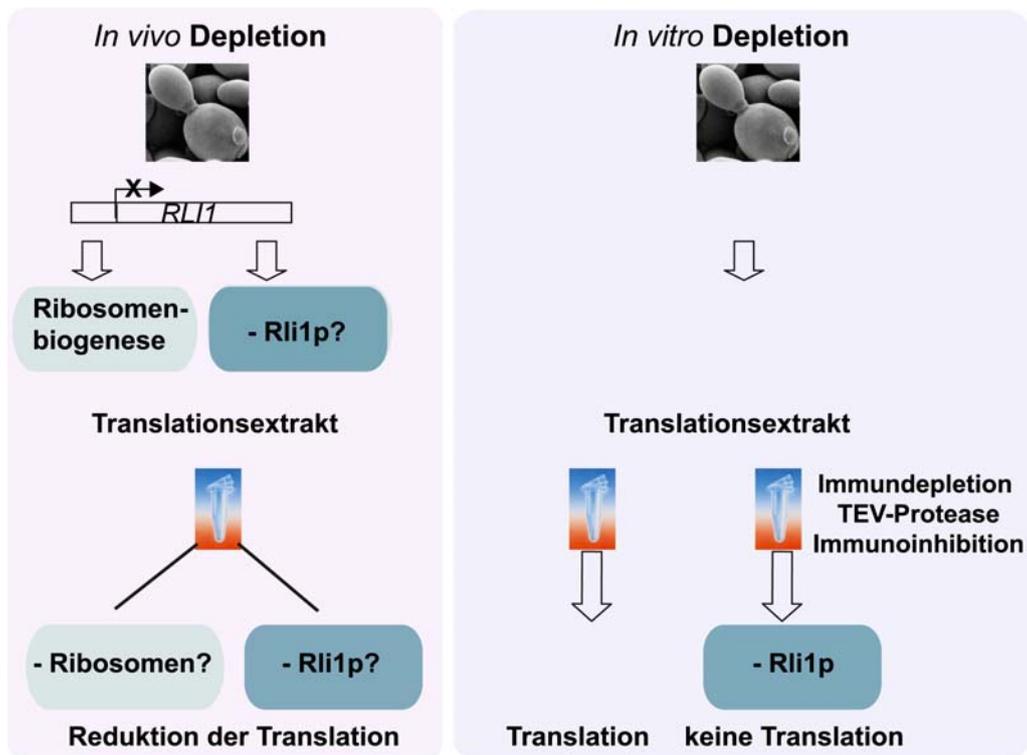


Abb. 4.3: Zusammenfassung der *in vivo* und *in vitro* Depletionsysteme.

Die *in vivo* Depletion von Rli1p führt zu einer Reduktion der Ribosomenbiogenese (Kispal et al., 2005) und zu einem Rückgang der Translationsaktivität (Dong et al., 2004; Preiss, 2003). Unklar ist, ob der nachgewiesene Rückgang der Translationsaktivität auf der Rli1p-Depletion beruht, oder durch unvollständig prozessierte bzw. fehlende Ribosomen verursacht wird. Die *in vitro* Depletion von Rli1p wurde mit Immunodepletionen, Inaktivierung mit Hilfe einer TEV-Protease Schnittstelle und Immuno-inhibition erreicht. Nach der Inaktivierung von Rli1p in Zellextrakten kann so ein direkter Einfluss von Rli1p auf die Translation nachgewiesen werden.

3.5.1 Immunodepletion und Inaktivierung von Rli1p

Einen direkten Einfluss von Rli1p auf die Translation konnte mit Hilfe der Immunodepletion und der Inaktivierung von Rli1p mit der TEV-Protease nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Immunodepletion konnte ein Rückgang der relativen Translationsaktivität beobachtet werden (Abb. 2.27, Abb. 2.28). Die mit IgG-Sepharose depletierten Translationsextrakte mit TAP-markiertem Rli1p zeigten neben der Abnahme der Translationsaktivität um 50 %, auch eine deutliche Abnahme der Rli1p-Konzentration (Abb. 2.27). Die Schwierigkeit bei dieser Affinitätsmatrix war eine hohe unspezifischen Reduktion der Translationsaktivität in der Kontrolle, die wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen von Translationskomponenten (Ribosomen und eIFs) verursacht wurde. Für TAP Reinigungen ist zum Beispiel bekannt, dass ribosomale Proteine oft als

Kontamination gefunden werden, da diese in großen Mengen in Zellen vorkommen (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002). Ein besseres Ergebnis konnte mit der magnetischen Affinitätsmatrix erreicht werden (Abb. 2.28). Die Aktivität von WT-Translationsextrakten wurde hierbei nicht beeinflusst, eine spezifische Reduktion der Translationsaktivität um 50 % erfolgte nur in den Rli1p-TAP enthaltenden Extrakten. Die Immundepletion mit magnetischer Affinitätsmatrix stellt eine gute Möglichkeit dar, effizient Proteinkomplexe zu entfernen, ohne die empfindlichen Translationsextrakte zu beeinträchtigen. Der Nachteil dieses Systems besteht darin, dass bei einer Immundepletion von Rli1p eine Co-Depletion ribosomaler Proteine und eIF3 (Abb. 2.14) erfolgen könnte. Diese scheint jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da alle mit Rli1p assoziierten Proteine in viel höheren Mengen in Zellen vorhanden sind als Rli1p selbst.

Die Vorteile eines Systems mit konditional inaktivierbarem Rli1p gegenüber der Immundepletionen, liegen in der Möglichkeit, Effekte der Proteindepletion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersuchen zu können. In Translationsextrakten mit TEV-Protease spaltbarem Rli1p (Rli1p^{TEV}), kann durch Zugabe von TEV-Protease spezifisch die Funktion des modifizierten Zielproteins beeinflusst werden, ohne andere Komponenten zu beeinträchtigen. Die Einführung der TEV-Protease Schnittstellen (Abb. 2.29, Tab. 2.4) führte in zwei Fällen zu aktivem Rli1p. *In vitro* konnte aber nur für Rli1p^{TEV1} eine spezifische Spaltung durch die Behandlung mit TEV-Protease nachgewiesen werden (Abb. 2.30). Die Behandlung von Translationsextrakten mit spaltbarem Rli1p^{TEV1} mit TEV-Protease führte zu einer Reduktion der Translationsaktivität um 50 % (Abb. 2.31), die mit einer 50 %-igen Spaltung des Rli1p^{TEV1} in den Translationsextrakten übereinstimmte (Abb. 2.32). Die Spaltung *in vivo* demonstrierte die Relevanz der *in vitro* Spaltung des Rli1p^{TEV1} (Abb. 2.33). Durch Überexpression der TEV-Protease in Zellen konnte ein Wachstumsdefekt nachgewiesen werden, der durch eine Spaltung des Rli1p^{TEV1} *in vivo* verursacht wurde. Insofern stellt dieses System eine gute Möglichkeit dar, um pathologische Effekte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* untersuchen zu können. Mit beiden Systemen konnte ein direkter Einfluss von Rli1p auf die Translation nachgewiesen werden: Es konnte aber keine vollständige Inhibierung der Translation erreicht werden, die weiterführende Untersuchungen erleichtern würde.

3.5.2 Immunoinhibition

Die Immunoinhibition stellt eine weitere Möglichkeit dar, um mit der Rli1p Funktion zu interferieren. Diese Methode beruht darauf, dass durch die Bindung eines Antikörpers an ein Protein, dessen Funktion beeinträchtigt wird. Der gereinigte α -RLI1-Antikörper, der gegen ein C-terminales Peptid von Rli1p gerichtet ist, zeigte hohe Spezifität der Erkennung von Rli1p in Zellextrakten (Abb. 2.35) und inhibierte die Translation der Luciferase-mRNA in Anwesenheit oder Abwesenheit von endogener RNA (Abb. 2.36, Abb. 2.40). Rli1p ist demzufolge essentiell für die Translation, unabhängig von der Konzentration an verfügbaren Translationskomponenten in den Extrakten. Obwohl die Zugänglichkeit der Translationskomponenten durch den Abbau endogener mRNA in Translationsextrakten erhöht wird, konnte eine vollständige Inhibition durch den α -RLI1-Antikörper erzielt werden (Abb. 2.40). Die Immunoinhibition mit dem α -RLI1-Antikörper stimmt mit der Beobachtung anderer Studien überein, da auch in Kaninchen-Retikulozytenextrakten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Translationsaktivität mit einem N-terminalen α -ABCE1-Antikörper beobachtet werden konnte (Chen et al., 2006).

Neben der Inhibition der Translation konnte in immunoinhibierten Extrakten eine Dissoziation von Polyribosomen beobachtet werden. Interessanterweise ging mit dem Verlust der Polyribosomen auch eine Reduktion der 80S Ribosomen einher, die abhängig war von der Konzentration des eingesetzten α -RLI1-Antikörpers (Abb. 2.41). Dieser Verlust der Polyribosomen kann nicht durch einen *run off* erklärt werden, da in der Kontrolle die Polyribosomen über den Inkubationszeitraum stabil blieben. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen, da ein Defekt in der Translationsinitiation zwar zu einem Verlust der Polyribosomen führt, dabei aber ein gleichzeitiger Anstieg des 80S *Peaks* beobachtet wird (Jivotovskaya et al., 2006). Eine Inaktivierung von Rli1p durch den α -RLI1-Antikörper führte neben der Reduktion von Polyribosomen auch zur Dissoziation von 80S Ribosomen in 60S und 40S Untereinheiten (Abb. 2.41). In einem Kontrollexperiment konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Aktivität des α -RLI1-Antikörper handelte, isolierte 80S Ribosomen konnten nicht durch den α -RLI1-Antikörper dissoziiert werden (Abb. 2.42).

Man kann spekulieren, dass der α -RLI1-Antikörper mit einer Funktion von Rli1p interferiert, die notwendig ist, um assemblierte 80S Ribosomen zu stabilisieren. Der Rückgang der Polyribosomen und der 80S Ribosomen könnte möglicherweise bedeuten, dass Rli1p an der Regulation des Ribosomenrecycling oder auch der Re-Initiation beteiligt sein könnte. Rli1p könnte dabei eventuell eine Assoziation ribosomaler Untereinheiten verstärken, und verhindert dadurch eine Dissoziation der Ribosomen von der mRNA. Möglicherweise beruht dies auf einer Hemmung oder Modifizierung von Anti-Assoziationsfaktoren. Eine Anti-Assoziationsaktivität ist für eIF1A, eIF1 und eIF3 beschrieben (Chaudhuri et al., 1999). Diese drei Faktoren verhindern eine vorzeitige Bindung der 60S Untereinheit an den 43S Prä-Initiationskomplex (Abb. 4.11). Zusätzlich dazu induzieren die Anti-Assoziationsfaktoren eine Beweglichkeit des Kopfs und der Plattform des 40S Ribosoms und regulieren dadurch wahrscheinlich die Zugänglichkeit des mRNA Bindungskanal (Ogle et al., 2002; Passmore et al., 2007). Während Rli1p in Archaeobakterien hoch konserviert ist, gibt es kein homologes Protein zu eIF3 in diesen Organismen. Einer der eukaryontischen Anti-Assoziationsfaktoren eIF1A, ist in Archaea konserviert (aIF1A) und könnte daher in diesen Organismen die Funktion übernehmen (Londei, 2005).

3.5.3 Rekonstitution immunoinhibierter Extrakte

Die Spezifität der Immunoinhibition konnte zusätzlich durch ein Rekonstitutionsexperiment nachgewiesen werden (Abb. 2.39). Aus Hefe gereinigtes Rli1p (Abb. 2.37) komplementierte die immunoinhibierten Translationsextrakte, wenn zuvor die α -RLI1-Antikörper Konzentration erniedrigt wurde (Abb. 2.38). Hierbei wurde beobachtet, dass nur die Entfernung des α -RLI1-Antikörper aus den Extrakten erfolgte, während eine Reduktion von Rli1p nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.38). Die Wiederherstellung der Translationsaktivität durch gereinigtes Rli1p demonstriert, dass der α -RLI1-Antikörper die Translationsmaschinerie reversibel hemmt.

Darüber hinaus gab es auch Hinweise darauf, dass Rli1p in den Extrakten durch den α -RLI1-Antikörper irreversibel inaktiviert wird, und somit eine Komplementation nicht durch die Verdünnung des Antikörpers erzielt werden kann. So führte eine Reduktion der α -RLI1-Antikörper Konzentration aus den Extrakten nicht zu einer partiellen

Wiederherstellung der Translationsaktivität (Abb. 2.39), obwohl keine Reduktion der Rli1p Konzentration beobachtet wurde (Abb. 2.38). Auch durch die Zugabe des C-terminalen Peptids, gegen das der α -RLI1-Antikörper gerichtet ist, erfolgte keine Wiederherstellung der Translationsaktivität (Daten nicht gezeigt). Durch Konkurrenz des Peptids mit Rli1p um die Antikörperbindung, konnte somit der immunoinhibitorische Effekt des α -RLI1-Antikörpers nicht aufgehoben werden.

Eine Frage, die offen bleibt ist, wie der α -RLI1-Antikörper die Rli1p Funktion inhibieren könnte. Der α -RLI1-Antikörper ist gegen die Aminosäuren 579-599 gerichtet, diese befinden sich in einer konservierten α -Helix am C-Terminus von Rli1p. Diese Helix ist Teil der *Hinge* Domäne, die die zwei Nukleotid-Bindedomänen verbindet. Aminosäuresubstitutionen (R573 \rightarrow E und S588 \rightarrow E) in dieser Helix resultierten in nicht funktionalem Rli1p (Abb. 4.1). Darüber hinaus konnten die *Hinge* Mutanten die eIF3 Untereinheiten Prt1p und Tif35p nicht mehr binden, was darauf hindeuten könnte, dass diese Domäne für die Substratbindung notwendig ist (Abschnitt 3.7.3). Die ATP-Bindung, die nach einer Substratbindung erfolgt, bewirkt eine Konformationsänderung in den NBDs von ABC-Proteinen (Higgins and Linton, 2004). Equivalent dazu sollte auch die ATP-Bindung von Rli1p zu einer Konformationsänderung der NBDs führen, die aufgrund der beobachteten Interaktionen auch die *Hinge* Region beeinflussen würde (A. Karcher; Dissertation LMU München). Somit könnte auch eine Veränderung der *Hinge* Domäne von Rli1p bewirken, dass keine Substratinteraktion erfolgen kann. Der α -RLI1-Antikörper, der an die *Hinge* Domäne bindet, könnte die Rli1p Funktion dadurch inhibieren, dass Rli1p in einer Form blockiert wird, die mit den Bindepartnern nicht mehr interagieren kann.

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass gereinigtes Rli1p die Translationsaktivität in immunoinhibierten Translationsextrakten wiederherstellen kann. In vorangegangenen Studien konnte durch die Zugabe von FLAG-gereinigtem Rli1p keine Komplementation von Rli1p-depletierten Extrakten beobachtet werden (Dong et al., 2004). Ein Grund dafür könnte sein, dass eine *in vivo* Depletion von Rli1p zu einer irreversiblen Inaktivierung von Translationskomponenten führt (Abb. 4.9). Im Rahmen einer Masterarbeit (M. Vedecnik, Masterarbeit LMU München) wurde deshalb die Komplementation der *in vivo* depletierten Extrakte (Dong et al., 2004) mit TAP-gereinigtem Rli1p untersucht. Die Aktivität des gereinigten Proteins (Abb. 2.37) konnte in immunoinhibierten Extrakten (Abb. 2.39) nachgewiesen

werden. Die Zugabe des Rli1p-CBP führte nicht zu einer Wiederherstellung der Translationsaktivität. Diese Beobachtung verstärkt die Vermutung, dass eine *in vivo* Depletion von Rli1p noch weitere Effekte hat. Die Reduktion der Translationsaktivität kann demzufolge nicht alleine durch eine Reduktion von Rli1p verursacht werden. Aufgrund anderer Studien lag es nahe, dass bei der *in vivo* Depletion auch die Ribosomenbiogenese beeinflusst wird (Yarunin et al., 2005). Diese Vermutung konnte dann mit einem Rekonstitutionsexperiment mit 80S Ribosomen bestätigt werden (M. Vedecnik, Masterarbeit LMU München). Die reduzierte Translationsaktivität von *in vivo* depletierten Translationsextrakten, konnte mit gereinigten 80S Ribosomen teilweise wiederhergestellt werden. Dieses Eingangsexperiment verdeutlicht, dass eine *in vitro* Depletion für die Untersuchung der Rli1p Funktion besser geeignet ist, da diese schneller erfolgt und keine sekundären Prozesse beeinflusst werden. Zusätzlich zu diesem Vorteil, können bei der Immunoinhibition die gleichen Extrakte verwendet werden. Diese unterscheiden sich nur durch die Zugabe des α -RLI1-Antikörper bzw. Kaninchen-IgG, wohingegen bei einer *in vivo* Depletion Translationsextrakte aus verschiedenen Stämmen gewonnen werden, die sich auch in ihren Wachstumsbedingungen unterscheiden.

3.6 Untersuchungen der Interaktion von RLI1 mit HCR1

Als nächstes wurde untersucht, welche eIF3 Untereinheit der direkte Interaktionspartner von Rli1p ist. Sowohl biochemische Untersuchungen als auch die *Yeast-two-hybrid* Analysen deuteten darauf hin, dass Rli1p über die nicht-stöchiometrische eIF3 Untereinheit eIF3j/Hcr1p mit eIF3 assoziiert ist (Abb. 2.14; Tab. 2.3) (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002; Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Eine *Yeast-two-hybrid* Interaktion von eIF3j/Hcr1p mit Rli1p ist abhängig von funktionalen ABC Domänen (Kispal et al., 2005). Auch eine Analyse der co-reinigenden Proteine in Abwesenheit von RNA zeigte, dass die Interaktion von Rli1p zu eIF3j/Hcr1p nicht beeinflusst wird, während die Bindung zu anderen eIF3 Untereinheiten verloren geht (Abb. 4.10).

Um die Zusammensetzung des Rli1p-Komplexes in $\Delta hcr1$ *Knockout* Zellen untersuchen zu können, wurden C-terminal markiertes Rli1p mit einem $\Delta hcr1$ *Knockout* kombiniert (Abschnitt 2.11.1). Eine Kombination von Rli1p-TAP mit einem $\Delta hcr1$ *Knockout* wurde jedoch in vorangegangenen Studien als synthetisch-letal

Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, dass die Stabilität des eIF3 in einem *Δhcr1 Knockout* nicht beeinflusst wurde. Somit kann die Dissoziation von eIF3 Untereinheiten nicht durch die Deletion von Hcr1p verursacht werden, sondern tritt nur auf, wenn zusätzlich der C-Terminus von Rli1p modifiziert ist. Ein *Δhcr1 Knockout* hat kaum Auswirkungen auf das Wachstum von Zellen und scheint damit eher eine untergeordnete Funktion zu haben. Für das humane eIF3j/Hcr1p ist eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Zugänglichkeit des mRNA Bindungskanal des 40S Ribosoms beschrieben (Fraser et al., 2007). Über eine Interaktion von eIF3j/Hcr1p mit eIF1A erfolgt eine Reduktion der Affinität der 40S Untereinheit zu mRNA, die wiederhergestellt wird nachdem eine Bindung der Initiator-tRNA erfolgt (Fraser et al., 2007). Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass eIF3j/Hcr1p eine regulatorische Funktion für die mRNA Bindung an das 40S Ribosom hat. Fehlt diese Regulation zeigen die Zellen keinen Defekt, aber eine zusätzliche Modifikation des C-Terminus von Rli1p führt zu einem temperatursensitiven Phänotyp: Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Rli1p an diesem Prozess beteiligt ist.

Diese Vermutung wurde dadurch bestärkt, dass in einem *Δhcr1 Rli1p-HA* Stamm die generelle Translationsaktivität beeinträchtigt war, was durch den Verlust von Polyribosomen sichtbar wurde (Abb. 2.48). Darüber hinaus wurde eine Abnahme des 40S Peaks beobachtet (Abb. 2.48; Abb. 2.49). Dies könnte auf einen Defekt in der Prä-Initiationskomplex Assemblierung hindeuten, jedoch können mit den hier verwendeten Methoden 40S, 43S und 48S Komplexe nicht unterschieden werden. Aus diesem Grund kann nur spekuliert werden, dass entweder ein 43S oder 48S Assemblierungsdefekt in dem *Δhcr1 RLI1-HA* Stamm vorliegen könnte. Diese Vermutung wurde dadurch verstärkt, dass das Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten in diesen Stämmen nicht verändert war (Abb. 2.50). Dies weist darauf hin, dass der Verlust des 40S Peaks nicht auf einen Ribosomenprozessierungsdefekt zurückzuführen ist. Eine ähnliche Reduktion des 40S Peaks in Polyribosomenprofilen kann auch in Zellen beobachtet werden, die einen Defekt bei der 80S Komplex Assemblierung aufweisen (Jivotovskaya et al., 2006). Normalerweise geht dieser Effekt einher mit dem Auftauchen von unvollständig assemblierten 80S Komplexen, die durch eine zusätzliche Schulter im UV-Profil der 80S Komplexe sichtbar werden. Dies war jedoch nur andeutungsweise in den erstellten UV-Profilen von *Δhcr1 RLI1-HA* Zellen zu erkennen (Abb. 2.48; Abb. 2.49). Hinsichtlich der vermuteten Beteiligung von Rli1p im Zusammenspiel mit Hcr1p bei der Regulation der mRNA

Bindung an das 40S Ribosom wäre es denkbar, dass die 60S Untereinheit nicht binden kann und demnach ein Defekt bei der 80S Komplex Assemblierung besteht.

3.7 Bedeutung einzelner Rli1p Domänen für die Interaktion mit eIF3 und ribosomalen Proteinen

Um den Mechanismus näher zu untersuchen, wurde analysiert, inwieweit hierbei einzelne Domänen von Rli1p für die Interaktion mit eIF3 Untereinheiten eine Rolle spielen. Auch die mögliche Beteiligung von RNA an der Interaktion wurde näher analysiert.

3.7.1 Bedeutung der ATPase Aktivität

Die Struktur von *pfuRli* ist die erste Struktur eines ABC-Proteins, in dem die aktiven Zentren nicht aus einem Homodimer, sondern aus zwei unterschiedlichen Domänen eines Proteins gebildet werden und somit ein Heterodimer ausbilden. In der Kristallstruktur befand sich je ein ADP-Molekül im aktiven Zentrum und auch die *in vivo* Daten in *S. cerevisiae* deuteten daraufhin, dass die ATP-Hydrolyse in beiden NBDs wichtig für die zelluläre Funktion von Rli1p ist (Karcher et al., 2005). In Abb. 4.5 ist eine Übersicht der konservierten Domänen des aktiven Zentrums von ABC-Proteinen dargestellt.



Abb. 4.5: Konservierte Motive in der ABC-ATPase Domäne und deren Funktion. Die ABC-ATPase Domäne enthält fünf konservierte Motive, die für ATP-Bindung und Hydrolyse notwendig sind. In dieser Arbeit wurden das Walker A; *Signature* und Walker B Motiv näher untersucht. Q= Q-loop; H= H-loop nach (Hopfner and Tainer, 2003).

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die ATPase Domänen für eine Interaktion von Rli1p mit eIF3 bzw. ribosomalen Proteine notwendig sind. Um ATP zu depletieren wurde ATP durch Apyrase gespalten und ortho-Vanadat eingesetzt, welches ein unspezifischer ATPase-Inhibitor ist. Ortho-Vanadat ist ein Analog des

anorganischen Phosphates und arretiert einen Enzymzustand der ATPase während der ATP-Hydrolyse. Das ADP-Molekül verbleibt in der Bindungstasche, wohingegen das Phosphat bereits dissoziiert ist. Rli1p sollte somit in beiden Fällen vorwiegend in einer ADP-gebundenen Form vorliegen.

Die durchgeführte Affinitätsreinigung zeigte keinen Verlust der Interaktion von Rli1p zu eIF3 und den ribosomalen Proteinen für die mit Apyrase oder ortho-Vanadat behandelte Rli1p-Komplexe (Abb. 2.15). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Rli1p in ADP-gebundener Form seine Interaktionspartner noch binden kann. Es wäre jedoch auch möglich, dass die ATP-Depletion nicht erfolgreich verläuft, wenn die Komplexe nach der Bindung an die IgG-Affinitätsmatrix behandelt werden. Aus diesem Grund wurden Zellextrakte mit Apyrase behandelt und zur Analyse des Rli1p-Komplexes über einen Glycerol-Gradient aufgetrennt. Hierbei wurde eine Veränderung des Laufverhaltens des Rli1p-enthaltenden Komplexes in die leichteren Fraktionen beobachtet (Abb. 2.16). Im Vergleich zu einem Kontrollgradient, der einen ungefähr 1 MDa großen Rli1p-Komplex aufwies, veränderte sich die Größe des Komplexes nach Apyrase Behandlung auf ungefähr 200-600 kDa. Dies könnte eventuell darauf hindeuten, dass ADP-gebundenes Rli1p manche Interaktionspartner, ribosomale Proteine oder eIF3 Untereinheiten, noch nicht oder nicht mehr binden kann. Betrachtet man das Molekulargewicht aller eIF3 Untereinheiten (352 kDa) und Rli1p (68 kDa) so könnte man spekulieren, dass der neue leichtere Rli1p-Komplex vielleicht nur eIF3 enthält und die Bindung zu den ribosomalen Proteinen verloren gehen könnten.

Weitere Untersuchungen wurden mit mutantern Walker A (K116A), *Signature* (S223R) und Walker B (E247Q) rli1p durchgeführt (Abb. 4.3). Bei der Walker A Mutation ist die Nukleotidbindung im aktiven Zentrum gestört. Von der *Signature* Mutation in der analogen Sequenz anderer ATPasen ist bekannt, dass ebenfalls die ATP-Bindung beeinträchtigt wird (Moncalian et al., 2004), somit sollten das mutante Walker A und *Signature* rli1p in ADP-gebundener Form vorliegen. Im Gegensatz dazu ist von anderen ATPasen bekannt, dass mit der verwendeten Walker B Mutation die ATP-Bindung stattfindet, jedoch keine ATP-Hydrolyse erfolgt (Lammens et al., 2004), somit sollte das mutante Walker B rli1p in ATP-gebundener Form vorliegen.

Das mutante Walker A rli1p (rli1pK116A) wurde mit einer TAP-Markierung gereinigt und die Interaktion zu Nip1-HA und Rps3 analysiert (Abb. 2.20). Die Interaktion zu

Nip1p-HA war nicht beeinträchtigt, wohingegen deutlich weniger ribosomale Proteine bzw. Rps3 gebunden war (Abb. 2.19, Abb. 2.20). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass ADP-gebundenes Rli1p wahrscheinlich mit Nip1p-HA, nicht aber mit Ribosomen interagieren kann. Im *Yeast-two-hybrid* Test konnte keine Interaktion der Walker A und *Signature* Mutanten mit Prt1p und Tif35p nachgewiesen werden, es erfolgte jedoch eine schwache Y2H Interaktion mit Hcr1p (Tab. 2.3), die biochemisch jedoch nicht verifiziert werden konnte (Abb. 2.23). Eine Abhängigkeit der Y2H Interaktion von funktionalen Walker A-Domänen zu eIF3j/Hcr1p wurde von Kispal *et al.* demonstriert (Kispal *et al.*, 2005), und stimmt somit mit den biochemischen Daten dieser Arbeit überein.

Die biochemische Interaktionsstudie mit dem mutanten Walker B rli1p demonstrierte, dass die Interaktion zu Prt1p-HA nicht beeinträchtigt war, jedoch keine Bindung mit Hcr1p-HA erfolgte (Abb. 2.24 B). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass eine ATP-gebundene Form von Rli1p nicht mehr mit Hcr1p interagieren kann, während die Interaktion zu Prt1p nicht beeinflusst wird. In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse der Interaktionsstudie von den ATPase Mutanten zusammengefasst.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Interaktionsstudie von rli1p ATPase Mutanten und eIF3 Untereinheiten.

Immunopräzipitation (IP) und *Yeast-two-hybrid* (Y2H) Analyse mit eIF3 Untereinheiten Nip1p; Prt1p; Hcr1p und Tif35p. n.a.= nicht analysiert.

	Immunopräzipitation (IP) + Y2H			
	Nip1p	Prt1p	Hcr1p	Tif35p
rli1p Walker A	+ IP	- Y2H	+ Y2H/- IP	- Y2H
rli1p <i>Signature</i>	n.a.	- Y2H	+ Y2H	- Y2H
rli1p Walker B	n.a.	+ IP	- IP	n.a.

Das Problem bei dem in dieser Arbeit durchgeführten *Yeast-two-hybrid* Screen war die nur sehr schwache Y2H-Interaktion der Positiv-Kontrolle, was sichtbar wurde durch schlechtes Wachstum der Zellen auf selektivem Medium. Diese Kontroll-Interaktion bestand aus der Y2H-Interaktion des Wildtyp-Rli1p mit den eIF3 Untereinheiten Prt1p, Tif35p und Hcr1p. Die Interaktion wurde bereits biochemisch nachgewiesen (Abb. 2.14) und somit wurde eine starke Y2H Interaktion erwartet, sichtbar durch gutes Wachstum der Zellen. Dies war jedoch nicht der Fall. Bei den im Y2H untersuchten Interaktionen werden jedoch Proteine untersucht, die mit der Aktivierungsdomäne bzw. der Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsaktivators

fusioniert sind, was eventuell das Bindungsverhalten beeinträchtigen könnte. Auch muss ein Y2H Test mit Hefeproteinen nicht unbedingt auf eine direkte Interaktion hindeuten, da auch Proteine, die eine indirekte Interaktion vermitteln könnten in den Y2H Stämmen vorhanden sind.

Alle Studien mit den ATPase-inaktiven rli1p Mutanten wiesen darauf hin, dass die eIF3 Untereinheiten nicht alle gleichzeitig gebunden werden, was eventuell von der unterschiedlichen Konformation von Rli1p in ADP oder ATP gebundener Form abhängen könnte (Abb. 4.6). Eine neue Studie mit dem Drosophila Ortholog zu Rli1p (Pixie) zeigte, dass eine Walker B Mutante oder eine AMP-PNP gebundenen Form von Pixie zu einer konstitutiven Co-Fraktionierung mit 40S Ribosomen führt (Andersen and Leever, 2007). Pixie liegt hierbei in der ATP gebundenen Form vor und dies scheint eine Co-Fraktionierung mit Ribosomen zu begünstigen. Die Depletion ribosomaler Proteine der 40S Untereinheit führte zur Dissoziation von Pixie-AMP-PNP, wohingegen eine Depletion einzelner eIF3 Untereinheiten keinen Einfluss auf die 40S Co-Fraktionierung aufwies, und somit unabhängig von eIF3 Untereinheiten erfolgen konnte (Andersen and Leever, 2007).

Diese Beobachtung ist komplementär zu dem Ergebnis der Reinigung des mutanten Walker A rli1p. Es erfolgte eine Reduktion der Bindung zu ribosomalen Proteinen und Rps3, wenn Rli1p in der ADP-gebundenen Form vorliegt (Abb. 2.19, Abb. 2.20). Auch im Glycerol-Gradient konnte ein leichterer Rli1p Komplex beobachtet werden, wenn ATP depletiert wurde (Abb. 2.16). Man kann spekulieren, dass wahrscheinlich je nach Konformationszustand von Rli1p bestimmte Interaktionen zu eIF3-Untereinheiten oder zu Ribosomen verstärkt werden könnten.

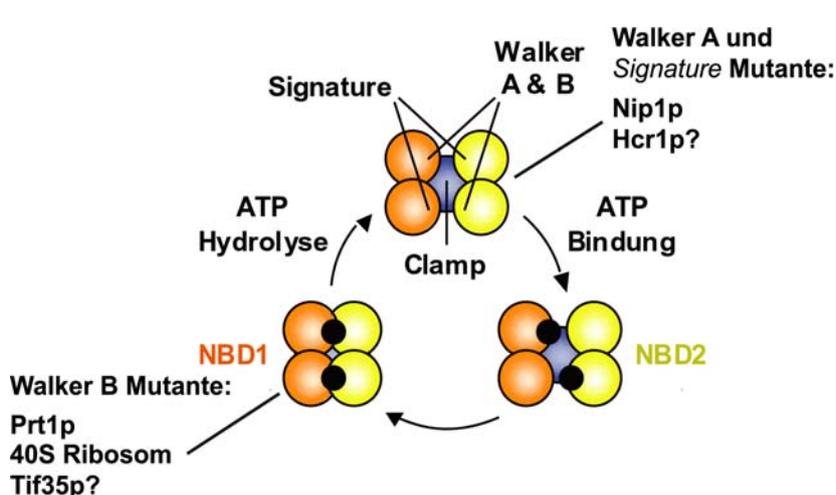


Abb. 4.6: hypothetisches Modell der Interaktion von eIF3 Untereinheiten mit ATPase Mutanten.

Möglicher ATP-Hydrolyse Zyklus nach (Karcher et al., 2005). Die Walker A und Signature Mutanten könnten eine ADP-gebundene Form von Rli1p repräsentieren, mit der Nip1p und eventuell Hcr1p assoziiert vorliegt. Die Walker B Mutante könnte eine ATP-gebundenen Form von Rli1p repräsentieren, mit der Prt1p assoziiert vorliegt und 40S Ribosomen.

3.7.2 Die Funktion des FeS Clusters

Die Rli1p-Sequenz enthält am N-Terminus zwei cysteinreiche Regionen, die eine hohe Ähnlichkeit mit den Eisen-Schwefel (FeS) Bindedomänen in Ferredoxinen aufweisen (A. Karcher; Dissertation LMU München). Ferredoxine transportieren in vielen metabolischen Prozessen Elektronen und so könnte auch die Aufgabe der zwei FeS *Cluster* in Rli1p eine Elektronenübertragung sein (Barthelme et al., 2007).

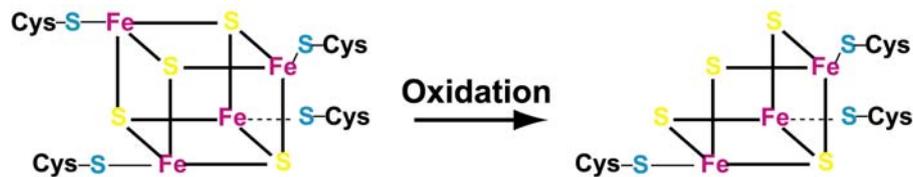


Abb. 4.7: Aufbau eines [4Fe-4S]-Cluster. Rli1p besitzt N-terminal zwei [4Fe-4S]-*Cluster*. In vielen FeS *Cluster* Proteinen wird der [4Fe-4S]-Cluster reversibel oxidiert. Der Übergangszustand wird in einem zweiten Schritt durch Abgabe eines Eisen-Ions zum [3Fe-4S]-*Cluster* stabilisiert.

In dieser Arbeit wurde eine Mutation im zweiten FeS *Cluster* Bindemotiv (C65→A) näher untersucht, die *in vivo* zu nicht funktionalem Rli1p führte. Mit einer Immunopräzipitation konnte nachgewiesen werden, dass Nip1p-HA mit dem mutanten rli1p schwächer assoziiert war (Abb. 2.20). Diese Beobachtung kann darauf hinweisen, dass das FeS *Cluster* wichtig für die Interaktion von Rli1p mit Nip1p ist. Überraschenderweise interagierte das mutante FeS *Cluster* rli1p im Y2H Test stark mit den untersuchten eIF3 Untereinheiten Prt1p, Tif35p und Hcr1p. Diese Interaktion war sogar stärker als die, die für das Wildtyp-Rli1p beobachtet werden konnte. Biochemisch konnte die Y2H-Interaktion mit Hcr1p bestätigt werden (Abb. 2.23; Abb. 2.24B), nicht jedoch die Interaktion mit Prt1p (Abb. 2.23B). Insofern widerspricht die biochemische Interaktion des mutanten FeS *Cluster* rli1p mit Prt1p der Y2H Interaktion, es gibt hierbei jedoch zu beachten, dass im Y2H nicht unbedingt direkte Interaktionen untersucht werden (vgl. Abschnitt 3.7.1). Eventuell wurde also die Bindung zu Prt1p im Y2H Test über einen anderen Faktor vermittelt.

FeS *Cluster* Mutante

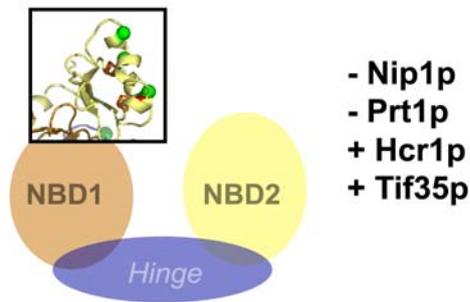


Abb. 4.8: Bindung von mutantem FeS *Cluster* rli1p an eIF3 Untereinheiten

Zusammenfassung der Interaktionsstudie von mutantem FeS *Cluster* rli1pC65A und eIF3 Untereinheiten. Die Nip1p und Prt1p Interaktion erfolgte abhängig von einem funktionalen FeS *Cluster*. Wohingegen im Vergleich zu WT-Rli1p eine stärkere Tif35p und Hcr1p Interaktion mit dem mutantem rli1p beobachtet werden konnte.

Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass im Gegensatz zu der Walker B Mutante, die zu einer konstitutiven Co-Fraktionierung mit Ribosomen führen (Andersen and Leever, 2007), das Fehlen des FeS *Clusters* zu einer konstitutiven Hcr1p und Tif35p Assoziation führen könnte. Man kann spekulieren, dass das FeS *Cluster* für eine Substratmodifikation durch Elektronenübertragung verantwortlich sein könnte. Erfolgt diese Modifikation nicht, verbleibt das mögliche Substrat (Hcr1p, Tif35p) eventuell gebunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass Hcr1p nur unter bestimmten Bedingungen mit eIF3 assoziiert vorliegt, was auch durch andere Studien gezeigt wurde (Fraser et al., 2004; Kolupaeva et al., 2005).

3.7.3 Die Funktion der *Hinge* Domäne

Neben der FeS *Cluster* Domäne ist auch die *Hinge* Domäne eine für ABC-Proteine neuartige Domäne. Sie besteht aus der hoch-konservierten *Hinge* I und *Hinge* II Domäne und stellt eine Scharnierregion zwischen den zwei NBDs dar. Die *Hinge* I Domäne bildet den C-Terminus der NBD1 und führt über einen *Linker* zur NBD2 (Abb. 4.1). Die ATP-Bindung und Hydrolyse führt wahrscheinlich auch zu einer Konformationsänderung in der *Hinge* Region, die insofern an der Bewegung des Proteins bei der ATP-Bindung beteiligt sein könnte (Karcher et al., 2005). Die Bedeutung der *Hinge* Domäne bezüglich der Interaktion mit eIF3 wurde in dieser Arbeit mit einem mutantem *Hinge* I (rli1pR311E) und *Hinge* II (rli1pR573E) Protein untersucht. Für die *Hinge* I Mutante konnte eine deutlich schwächere Bindung zu Nip1p und Hcr1p beobachtet werden (Abb. 2.20; Abb. 2.23). Für die *Hinge* II Mutante wurde im *Yeast-two-hybrid* eine Interaktion mit Hcr1p nachgewiesen, jedoch konnte das mutante Protein nicht mit Prt1p und Tif35p interagieren (Tab. 2.3), was auch biochemisch bestätigt werden konnte (Abb. 2.24 B).

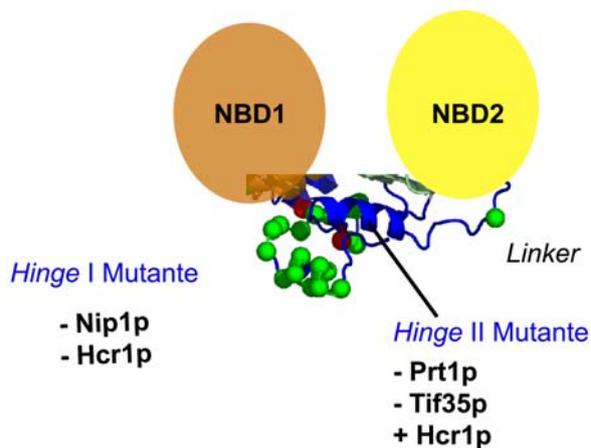


Abb. 4.9: Bindung von mutanterm *Hinge rli1p* zu eIF3 Untereinheiten.

Die *Hinge I* Domäne bildet den C-Terminus der NBD1 und führt über einen *Linker* zur NBD2. Die *Hinge II* Domäne bildet den C-Terminus von Rli1p und ist über Wasserstoffbrücken mit der *Hinge I* Domäne verbunden. Das mutante *Hinge I* rli1p zeigte biochemisch keine Interaktion mit Hcr1p und nur eine schwache Interaktion mit Nip1p. Das mutante *Hinge II* rli1p konnte Prt1p und Tif35p nicht mehr binden, wohingegen die Interaktion mit Hcr1p nicht beeinflusst wurde.

Die fehlende Interaktion deutet daraufhin, dass die *Hinge* Domänen für eine Bindung der untersuchten eIF3 Untereinheiten Nip1p, Prt1p und Tif35p notwendig sind. Eine Ausnahme bildet die Interaktion des mutanten *Hinge II* rli1p mit Hcr1p. Die Interaktion bezüglich der Hcr1p Untereinheit ähnelt der FeS *Cluster* Mutante, bei der ebenfalls verglichen zum WT-Rli1p eine stärkere Hcr1p Bindung beobachtet wurde. Eventuell könnte dies darauf hindeuten, dass die *Hinge II* Domäne an der richtigen Positionierung des FeS *Cluster* beteiligt sein könnte, die möglicherweise durch eine Bewegung der zwei NBDs bei ATP-Bindung zustande kommt (Abb. 4.8).

3.7.4 RNA-abhängige Bindungen von Rli1p zu eIF3-Untereinheiten

Neben der salzsensitiven Bindung von Rli1p an eIF3 (Yarunin et al., 2005) konnte auch demonstriert werden, dass RNA eine wichtige Komponente für die Interaktion ist (Abb. 2.15). Durch eine RNaseA Behandlung des gebundenen Rli1p-Komplexes konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Rpg1p, Nip1p, Prt1p und Tif35p RNA-abhängig erfolgte. Wohingegen die Bindung von Rli1p zu Tif34p und Hcr1p und ribosomalen Proteinen nicht beeinflusst wird. Die RNA-unabhängigen Interaktionen sind in Abb. 4.10 zusammengestellt.

Falls es sich bei der für die Interaktion notwendigen RNA um rRNA (18S rRNA) handelt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Rli1p über ribosomale Proteine bzw. rRNA an eIF3 Untereinheiten bindet. Die Bindung zu rRNA wurde mit Hilfe eines Northern Blots näher untersucht (Abb. 2.17). Es konnte eine Interaktion des Rli1p Komplexes mit der 18S rRNA (Abb. 2.17 B) aber nicht mit der 20S rRNA (Abb. 2.17 C) gezeigt werden. Die Interaktion mit der 18S rRNA wurde ebenfalls von Yarunin *et al.* nachgewiesen und darüber hinaus eine Interaktion mit 20S, 7S, 5.8S und 5S rRNA beobachtet (Yarunin *et al.*, 2005). Ein Grund für das abweichende Ergebnis für die 20S rRNA (Abb. 2.17 C) könnte sein, dass von Yarunin *et al.* das TEV-Eluat verwendet wurde und somit das Signal im hier verwendeten EGTA-Eluat zu schwach sein könnte. Die anderen rRNAs der 60S Untereinheit wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, da in Saccharose-Gradienten eine Co-Fraktionierung hauptsächlich mit der 40S Untereinheit beobachtet wurde (Abb. 2.13). In dieser Arbeit konnte das Vorhandensein der 18S rRNA im Rli1p Komplex nachgewiesen werden, inwieweit diese Interaktion über eIF3 vermittelt wird blieb unklar, da in einem Nip1p-TAP Eluat die 18S rRNA um ein vielfaches stärker angereichert war (Abb. 2.17 B). Die Signalstärke der 18S rRNA korrelierte dabei mit der Menge an eluiertem eIF3 in den jeweiligen Rli1p-TAP und Nip1p-TAP Eluaten (Abb. 2.17 A). Denkbar wäre es, dass die 18S rRNA selbst oder das 40S Ribosom an der Bindung von Rli1p an die eIF3 Untereinheiten Rpg1p, Nip1p, Prt1p und Tif35p beteiligt sein könnte. Für eIF3a/Rpg1 bekannt, dass die CTD mit 18S rRNA interagiert (Valasek *et al.*, 2003). Diese eIF3 Untereinheit wurde als eine der Untereinheiten identifiziert, die RNA-abhängig mit Rli1p assoziiert ist.

3.7.5 Inhibition der Translation durch rli1p-Proteinvarianten

Eine andere Möglichkeit, den Einfluss von Rli1p auf die Translation zu zeigen, stellten die letalen rli1p-Proteinvarianten dar. Es konnte demonstriert werden, dass diese mutanten Proteine unterschiedlich mit eIF3 Untereinheiten interagierten (Abschnitt 3.7). Des Weiteren konnte ein dominant-negativer Phänotyp durch starke Überexpression der rli1p-Proteinvarianten nachgewiesen werden (Abb. 2.25). Um zu untersuchen, worauf der dominant-negative Phänotyp beruht, wurde der Einfluss der rli1p-Proteinvarianten auf die Translation untersucht. Dazu wurde mutantes rli1p gereinigt und auf Interferenz von Wildtyp-Translationsextrakten untersucht. In dieser

Arbeit wurde ein mutantes Walker A Protein (rli1pK453E), ein mutantes FeS *Cluster* rli1p (rli1pC65A) und ein mutantes *Hinge* Protein (rli1pR311E) untersucht. Diese zeigten eine Reduktion der Translationsaktivität in Translationsextrakten (Abb. 2.44). Das Ergebnis der Walker A Mutante ist übereinstimmend mit Beobachtungen früherer Studien (Dong et al., 2004). Durch die Zugabe eines mutanten Walker B rli1p (rli1pE493Q) wurde ebenfalls eine Reduktion der Translationsaktivität in Translationsextrakten beobachtet (Dong et al., 2004). Die Autoren spekulierten, dass dies möglicherweise durch eine bessere Bindung des mutanten Proteins an Ribosomen verursacht wird (Dong et al., 2004), was durch die Beobachtungen neuer Studien bekräftigt wird (Andersen and Leever, 2007). Die Walker A und die Walker B Mutante können ATP nicht mehr hydrolysieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die ATP-Hydrolyse von Rli1p möglicherweise für die Translation essentiell ist. Auch das mutante *Hinge* I Protein könnte aus diesem Grund die Translation inhibieren, da die *Hinge* Domäne ebenfalls eine Rolle spielt bei der für die ATP-Bindung notwendigen Strukturveränderung (Abschnitt 3.7.3). Das mutante FeS *Cluster* Protein könnte eine Translationsinhibition dadurch verursachen, dass manche Untereinheiten des eIF3 (Tif35p und Hcr1p) stärker gebunden werden (Abschnitt 3.7.2). Aus diesem Grund könnte nicht-funktionaler eIF3 entstehen, was eine Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes verhindert (Algire et al., 2002). Eventuell könnte dafür auch eine fehlende Modifikation eines Substrats durch Elektronenübertragung eine Rolle spielen (Abschnitt 3.7.2).

3.8 Genetische Interaktionen

Zur Analyse des Wachstumsverhalten wurden die mutanten letalen rli1p Proteine in einem Wildtyp-Stamm oder einem *NIP1*-HA markierten Stamm exprimiert. Erwartet wurde, dass die Expression der mutanten Proteine zu einem dominant-negativen Phänotyp führt, da es mit dem endogenen Rli1p um Interaktionspartner konkurriert. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 2.24). Nur durch eine massive Erhöhung der Expression mit Hilfe des pEMBLyex4 (Dente et al., 1983; Dong et al., 2004) konnte in Wildtypzellen ein dominant-negativer Phänotyp nachgewiesen werden (Abb. 2.25). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Wildtyp-Stämmen und *NIP1*-HA Stämmen, konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass eine genetische Interaktion von Rli1p zu Prt1p und Tif34p besteht. Durch die Expression von mutantem FeS *Cluster*

rli1p, Walker B rli1p und *Hinge II* rli1p wurde in *PRT1*-HA und *TIF34*-HA Stämmen ein synthetisch-letal Phänotyp etabliert (Abb. 2.24 A). Eventuell sind also die C-terminalen Domänen von Prt1p und Tif34p wichtig für eine Interaktion mit Rli1p. Für die C-terminale Domäne von Prt1p ist bekannt, dass sie mit Tif34p und Tif35p interagiert. Diese Bindung könnte theoretisch von der gleichzeitigen Überexpression der rli1p Mutanten beeinflusst werden. Die nachgewiesenen genetischen Interaktionen passen zu der Vermutung, dass Rli1p nur mit manchen eIF3 Untereinheiten interagiert.

3.9 Funktion von Rli1p und Ausblick

Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten deuten darauf hin, dass Rli1p einen frühen Prozess der Translationsinitiation beeinflusst. Dies könnte eine Funktion in der Assemblierung des 43S Prä-Initiationskomplexes sein. Die Assoziation von Rli1p mit einem eIF3 Subkomplex deutet möglicherweise darauf hin, dass Rli1p notwendig für die Assemblierung oder die Positionierung von funktionalem eIF3 auf dem Ribosom ist (Abb. 4.11). In zukünftigen Experimenten sollte deshalb geklärt werden, was mit dem eIF3 Komplex oder der 40S Assoziation von eIF3 passiert, wenn Rli1p inaktiv ist.

Die Immunoinhibition von Zellextrakten demonstrierte, dass Rli1p essentiell für die Translation ist und Polyribosomen und 80S Komplexe stabilisiert. Dies könnte auch auf eine Funktion im Ribosomenrecycling und der Re-Initiation hindeuten, die auf einer Hemmung oder Regulation des Anti-Assoziationsfaktors eIF3 beruht. In höheren Eukaryonten ist die Interaktion mit eIF3 und Ribosomen konserviert. In Archaeobakterien ist nur Rli1p konserviert, wohingegen kein Homolog zu eIF3 existiert. Aus diesem Grund sollte der Interaktionspartner des homologen Rli1p in Archaea identifiziert werden.

Durch eine Kombination einer C-terminalen Rli1p Markierung mit einem $\Delta hcr1$ *Knockout* wurden Polyribosomen instabil und die 80S Assemblierung war reduziert. Von der Cryo-EM Struktur und den zahlreichen Interaktionsstudien mit dem MFC ist bekannt, dass eIF3 hauptsächlich auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite des 40S Ribosoms lokalisiert ist und eine Extension „Fuß“ in die 60S/40S Kontaktstelle hineinragt. Möglicherweise reguliert Rli1p im Zusammenspiel mit Hcr1p die Zugänglichkeit des mRNA Bindungskanal. Über eine Konformationsänderung von

eIF3 nach der mRNA Bindung könnte eventuell die Bindung der 60S Untereinheit ermöglicht werden. Zukünftige Experimente sollten klären, wo Rli1p zusammen mit eIF3 auf dem 40S Ribosom lokalisiert sind. Ein viel versprechender Ansatz hierfür ist die Cryo-EM Rekonstruktion des Rli1p Komplexes auf dem Ribosom. Das Modell der Rli1p Funktion ist in Abb. 4.11 zusammengefasst.

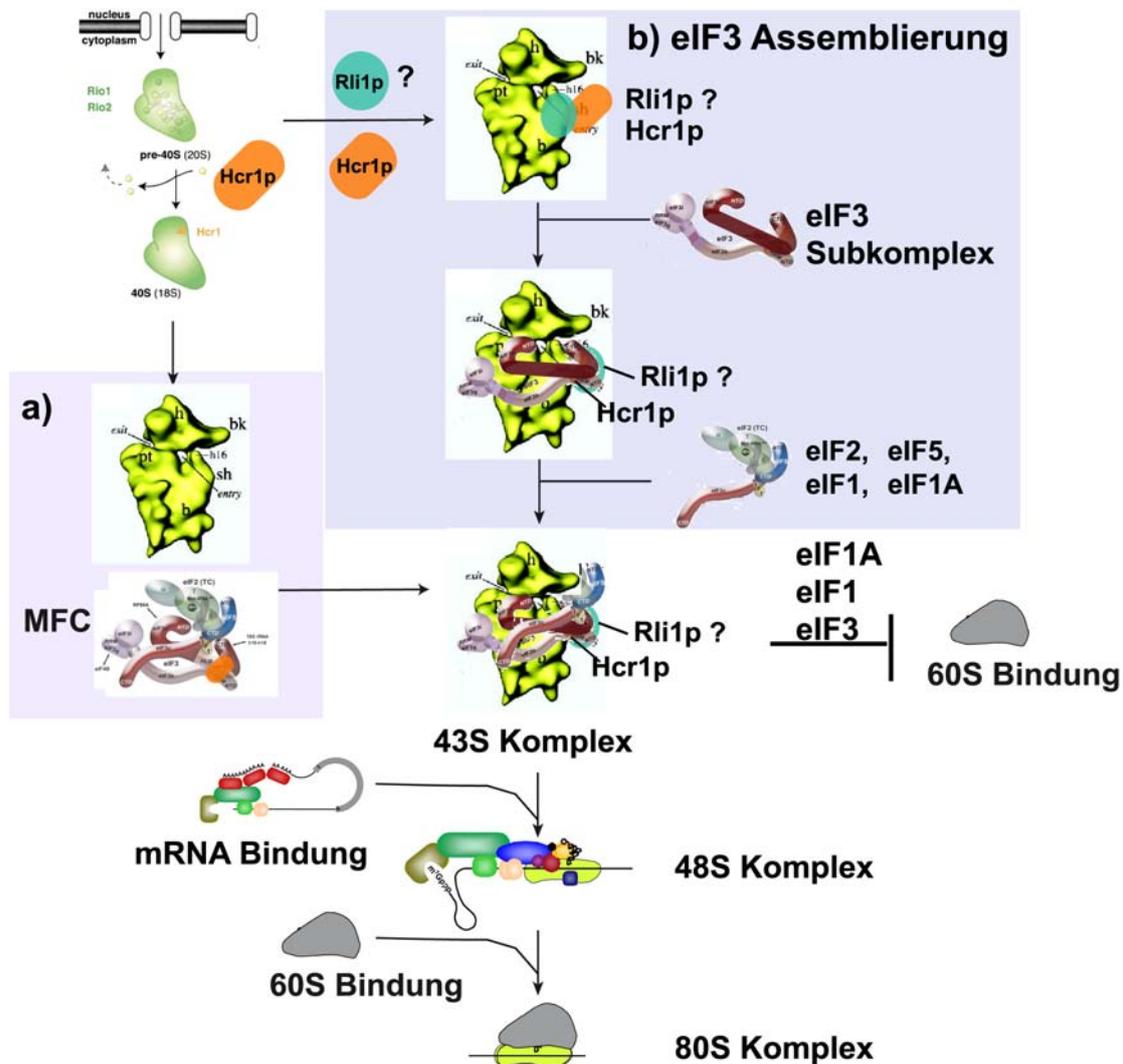


Abb. 4.11: Modell der Rli1p Funktion

Abbildung wurde modifiziert nach (Fromont-Racine et al., 2003) (Spahn et al., 2001) (Hinnebusch, 2006) (Preiss, 2003). Nachdem die prä-40S Ribosomen ins Zytoplasma exportiert werden, findet die 20S rRNA Prozessierung statt, an der Hcr1p beteiligt ist. Alternativ könnte es zwei Wege geben einen 43S Komplex zu assemblieren. Der bereits bekannte Weg (a) Ein Multifaktorkomplex (MFC) aus dem ternären Komplex, eIF1A, eIF1, eIF3 und eIF5 bildet sich aus und bindet an die 40S Untereinheit. Hypothetischer Weg (b) Rli1p bindet zusammen mit Hcr1p an die 40S Untereinheit und assembliert/positioniert die eIF3 Untereinheiten. Dann binden die anderen Faktoren des MFC. Durch die richtige Positionierung von eIF1A, eIF1 und eIF3 auf dem 40S Ribosom wird die vorzeitige Bindung der 60S Untereinheit an den 43S Komplex verhindert. Die Bindung der mRNA verändert die Anti-Assoziationsaktivität von eIF1A, eIF1 und eIF3 so, dass der 80S Komplex assembliert werden kann.

4 Material

4.1 Laborausstattung

Akku-Jet	Neolab, Heidelberg
Analytische Waage	Sartorius Universal
Autoradiodiagraphiekassetten	Sigma, Deisenhofen
Fluoreszenzmikroskop Olympus	Olympus
Gel-Elektrophoreseapparaturen	ZMBH
Lichtmikroskop Labovert	Leitz
PCR-Maschine	Biometra
PCR-Maschine	MWG
Pipetman Gilson P2, P10, P200, P1000	Abimed
Rotoren SS-34, GS-3, GSA	DuPont
Schüttelinkubatoren	New Brunswick
Tischzentrifuge	Heraeus
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vortex	Neolab
Wasserbad	Julabo
Planetenkugelmühle Pulverisette®	Fritsch

4.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth
Objektträger	Roth
HybondP	Amersham
ECL Hyperfilm	Amersham
Nagellack	Jade
Pipettenspitzen	Steinbrenner
ProteinG-Sepharose	Amersham
Glutathion-Sepharose	Amersham
CL4B-Sepharose	Pharmacia
Calmodulin-Sepharose	Stratagene
BSA	Sigma
LDH	Sigma
Katalase	Sigma
Reaktionsgefäße 1.5ml, 2ml	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße 0.5ml	Biozym
Impfösen	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

4.3 Verwendete Antikörper

3F10; Maus-Anti-HA	Roche
16B12; Maus-Anti-HA	Convance
9E10; Maus-Anti-Myc	(Evan et al., 1985)
Anti-Maus-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Anti-Ratte-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Anti-Kaninchen-IgG-Meeretich-Peroxidase	Dianova
Alexa-Fluor-488 Ziege-Anti-Ratte	MobiTec
Alexa-Fluor-546 Esel-Anti-Ratte-IgG	MobiTec
Alexa-Fluor-488 Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	MobiTec

PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase Konjugat)	Sigma
IgG-Sepharose	Amersham Pharmacia
α -RLI1-Antikörper	Dauids Biotechnologie
α -Sec61	M. Seedorf
α -Rpl35	M. Seedorf
α -Rps3	M. Seedorf
α -Rpl13	H. Tschochner

4.4. Molekularbiologische Baukästen (Kits)

Nucleobond AX 100 Midiprep Kit Machery&Nagel; QIAquick Gel Extraktion Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick PCR Purification Kit Quiagen, Hilden; Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen; AmpliScribe SP6 high yield Transkriptions-Kit Epicentre; Prime-It II Random Primer Labeling; Stratagene; QuikChange Site-Directed Mutagenesis; Stratagene; PCR 2.1-TOPO; Invitrogen

4.5. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
CIP (Calf intestinal phosphatase)	Roche, Mannheim
DNaseI (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Lysozym	Biomol
Platinum- <i>Pfx</i> -Proofreading Polymerase	Invitrogen
Restriktionsenzyme	NEB; MBI Fermentas
RNase A	Roche, Mannheim
Quick-T4-DNA-Ligase	New England BioLabs NEB
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas; Axon
Vent-DNA-Polymerase	NEB
Zymolyase 100.000T	ICN
Zymolyase 20.000T	ICN
Apyrase	Sigma
TEV-Protease	Invitrogen
Titanium Taq-Polymerase	Clontech

4.4 Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen

4.5 Verwendete Hefestämme

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

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

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

RJY #	Genotyp
358 W303a	<i>Mat a; ade2; trp1-1; can1-100, leu2-3; his3-11,15; ura3; GAL; psi⁺</i>
359 W303 α	<i>Mat α; ade2; trp1-1; can1-100, leu2-3; his3-11,15; ura3; GAL; psi⁺</i>
361	<i>Mat a; his1</i>
362	<i>Mat α; his1</i>
925	<i>Mat a/Mat α; RLI1/RLI1</i>
1327	<i>Mat α pep4::LEU2 bar1::hisG</i>
1905	<i>Mat a/Matα, RLI1/Δrli1::SpHIS3</i>
1935	<i>Mat a; RLI1-3xHA::His3MX6</i>
1936	<i>Mat a/Mat α, RLI1/RLI1-Tev-ProtA-7His::HIS3MX6</i>
1945	<i>Mat a RLI1-Tev-ProtA-7His::HIS3MX6</i>
1968	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP807 (URA3-RLI1)</i>
1969	<i>Mat α Δrli1:: SpHIS3 pRJP807 (URA3-RLI1)</i>
2073	<i>Mat α pep4::LEU2 bar1::hisG RLI1-TAP::kITRP1</i>
2092	<i>Mat a/Mat α; RLI1-9Myc::kITRP1/RLI1-HA3::His3MX6</i>
2096	<i>Mat a Δrli1::SpHIS3; pRS315-rli1^{ts3}</i>
2097	<i>Mat a Δrli1::SpHIS3; pRS315-rli1^{ts7}</i>
2098	<i>Mat a Δrli1::SpHIS3; pRS315-rli1^{ts11}</i>
2142	<i>Mat a RLI1-3xHA::His3MX6 HCR1-9Myc::kITRP1</i>
2144	<i>Mat a RLI1-9Myc::kITRP1</i>
2145	<i>Mat a HCR1-9Myc::kITRP1</i>
2153	<i>Mat a TIF34-3xHA::His3MX6</i>
2154	<i>Mat a PRT1-3xHA::His3MX6</i>
2155	<i>Mat a NIP1-3xHA::His3MX6</i>
2156	<i>Mat a RLI1-9Myc::kITRP1 TIF34-3xHA::His3MX6</i>
2157	<i>Mat a RLI1-9Myc::kITRP1 PRT1-3xHA::His3MX6</i>
2158	<i>Mat a RLI1-9Myc::kITRP1 NIP1-3xHA::His3MX6</i>
2185	<i>Mat a NIP1-TAP::kITRP1</i>
2320	<i>Mat a HCR1-3xHA::His3MX6</i>
2244 RS453	<i>Mat a/Mat α ade2-1; his3-11,15; ura3-52; leu2-3,112; trp1-1; can1-100; GAL+ Rli1/Δrli1::spHis3</i>
2258 RS453	<i>Mat a Δrli1::spHis3 pRJP807 (URA3-RLI1)</i>
2297	<i>Mat a Δrli1::spHis3 pRJP992 (pGal-RLI1-TAP)</i>
2300	<i>Mat a PRT1-3xHA::His3MX6 rli1^{ts3}::URA3</i>
2301	<i>Mat a PRT1-3xHA::His3MX6 rli1^{ts11}::URA3</i>
2302	<i>Mat a PRT1-3xHA::His3MX6 rli1^{ts7}::URA3</i>
2487 BY4743	<i>Mat α his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0 Δhcr1::kanMX4</i>
2488 BY4743	<i>Mat a his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0 Δhcr1::kanMX4</i>
2562	<i>Mat a Δhcr1::kITRP1</i>
2616	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1152 (pGal-UBI R-RLI1)</i>
2713	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1169 (pGal-UBI-R-RLI1)</i>
2743	<i>Mat a RLI1-TAP::kITRP1</i>
2756	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP998 (pGal1-10-RLI1)</i>
2758	<i>Mat a/Mat α RLI1/RLI1-Tev-ProtA-7His::HIS3MX6 HCR1/Δhcr1::kITRP1</i>
2762	<i>Mat α Δrli1:: SpHIS3 pRJP807 (URA3-RLI1) Δhcr1::kITRP1</i>
2764	<i>Mat a/Mat α RLI1/ RLI1-3xHA::His3MX6 HCR1/Δhcr1::kITRP1</i>
2768	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1193 (RLI1^{TEV1})</i>
2769	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1198 (RLI1^{TEV4})</i>
2776	<i>Mat a RLI1-3xHA::His3MX6 Δhcr1::kITRP1 pRJ807 (URA3-RLI1)</i>
2776s	<i>Mat a RLI1-3xHA::His3MX6 Δhcr1::kITRP1</i>
2777	<i>Mat α RLI1-3xHA::His3MX6 Δhcr1::kITRP1 pRJ807 (URA3-RLI1)</i>
2777s	<i>Mat α RLI1-3xHA::His3MX6 Δhcr1::kITRP1</i>
2809	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1296 (pGal-UBI-R-RLI1)</i>
2857	<i>Mat a NIP1-TAP::kITRP1 Δhcr1::KANMX4</i>
2821	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1311 (pTet^{off}-RLI1)</i>
2831	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1328 (pTet^{off}-RLI1^{TEV4})</i>
2839	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1325 (pTet^{off}-RLI1^{TEV1})</i>
2841	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1328 (pTet^{off}-RLI1^{TEV4}) pRJP 1333 (pGal-TEV)</i>
2843	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1303 (pGalS-UBI R-RLI1)</i>

RJY #	Genotyp
2852	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1325(pTet^{off}-RLI1^{TEV1}) pRJP 1333 (pGal-TEV)</i>
2855	<i>Mat a pRJP 1333 (pGal-TEV)</i>
2873	<i>Mat a HCR1-TAP::kITRP1</i>
2891	<i>Mat a URA3::CMV-tTA his3-1 leu2-0 met15-0 kanR-tetO7-TATA::Rli1</i>
2893	<i>Mat a Δrli1:: SpHIS3 pRJP1358 (pGal-UBI-R-Flag-HisRli1)</i>

4.6 Vektoren und Plasmide

4.6.1 Vektoren

pEMBLyex4	(Dente et al., 1983)
YCplac;YEplac; Ylplac	(Gietz and Sugino, 1988)
pGal Serie	(Mumberg et. al; 1994)

4.6.2 Plasmide

RJP 276	pYM2 (Knop et al., 1999b)
RJP 277	pYM3 (Knop et al., 1999b)
RJP 279	pYM5 (Knop et al., 1999b)
RJP 280	pYM6 (Knop et al., 1999b)
RJP 284	pYM10 (Adams et al., 1997; Knop et al., 1999b)
RJP 292	pBS1479 (Rigaut et al., 1999)
RJP 135	pFA6a-HIS3MX6
RJP 1358	Ycplac111-UBI-R-Flag-HisRli1 (Dong et al., 2004)
RJP 1064	pSP64-luc (Verge et al., 2004)
RJP 1188	Ylplac204-TEV-Protease (F. Uhlmann)

4.6.3 Für diese Arbeit erzeugte Plasmide:

RJP #	Insert	Vektor
807	<i>RLI1</i>	pRS316
810	<i>RLI1</i>	pRS315
812	<i>rli1C65A</i>	pRS315
814	<i>rli1K116A</i>	pRS315
871	<i>rli1S223R</i>	pRS315
872	<i>rli1E247Q</i>	pRS315
876	<i>rli1K453A</i>	pRS315
883	<i>rli1R311E</i>	pRS315
888	<i>rli1R573E</i>	pRS315
889	<i>rli1S588E</i>	pRS315
123	YCplac33-Gal	YCplac33
992	pGal- <i>RLI1</i> -TAP	YCplac33-Gal
993	pGal- <i>rli1C65A</i> -TAP	YCplac33-Gal
994	pGal- <i>rli1S233R</i> -TAP	YCplac33-Gal
995	pGal- <i>rli1R311E</i> -TAP	YCplac33-Gal
996	pGal- <i>rli1R573E</i> -TAP	YCplac33-Gal
997	pGal- <i>rli1S588E</i> -TAP	YCplac33-Gal
998	pGal1-10- <i>RLI1</i>	pGal416
1007	pGal- <i>rli1K116A</i> -TAP	YCplac33-Gal
1008	pGal- <i>rli1K453E</i> -TAP	YCplac33-Gal
1035	pGal- <i>rli1E247Q</i> -TAP	YCplac33-Gal
1040	<i>rli1^{ts3}</i>	pRS306
1041	<i>rli1^{ts11}</i>	pRS306
1055	<i>rli1^{ts7}</i>	pRS306
1059	<i>rli1^{ts3}</i>	pRS304
1060	<i>rli1^{ts11}</i>	pRS304

RJP #	Insert	Vektor
1061	<i>rli1</i> ^{ts7}	pRS304
1085	<i>RLI1</i>	pEMBLyex4
1086	<i>rli1C65A</i>	pEMBLyex4
1087	<i>rli1K116W</i>	pEMBLyex4
1088	<i>rli1S223R</i>	pEMBLyex4
1089	<i>rli1E247Q</i>	pEMBLyex4
1090	<i>rli1K453A</i>	pEMBLyex4
1091	<i>rli1R311E</i>	pEMBLyex4
1092	<i>rli1R573E</i>	pEMBLyex4
1095	<i>rli1R588E</i>	pEMBLyex4
1104	<i>YEplac181-RLI1</i>	YEplac181
1152	p414Gal-UbiR- <i>RLI1</i>	p414Gal
1167	p414Gal-UbiR45aa- <i>RLI1</i>	p414Gal
1193	YCplac111- <i>RLI1</i> ^{TEV1}	YCplac111
1194	YCplac111- <i>RLI1</i> ^{TEV2}	YCplac111
1195	YCplac111- <i>RLI1</i> ^{TEV3}	YCplac111
1198	YCplac111- <i>RLI1</i> ^{TEV4}	YCplac111
1296	p414GalL- <i>RLI1</i>	p414GalL
1303	p414GalS- <i>RLI1</i>	p414GalS
1309	pCM185-Tet ^{off} - <i>RLI1</i>	pCM185
1325	pCM185-Tet ^{off} - <i>RLI1</i> ^{TEV1}	pCM185
1328	pCM185-Tet ^{off} - <i>RLI1</i> ^{TEV4}	pCM185
1333	YEplac181-TEV-Protease	YEplac181

4.7 Verwendete Oligos

4.7.1 Ortsspezifische Mutagenese:

RJO #	Sequenz
1390	GAGTGTAACGTTCCGGCTCCCGTTGTGAAAACCTG
1391	CAGTTTTTCAACAACGGGAGCCGAACGTTTACACTC
1392	GTATTTGCGTTAAGAAAGCTCCATTTGATGCTATTC
1393	GAATAGCATCAAATGGAGCTTTCTTAACGCAAATAC
1394	CCAACGGTATTGGTGCCTACCGCCTTG
1395	CAAGGCGGTAGACGCACCAATACCGTTGG
1396	CCAACGGTATTGGTAGGTCTACCGCCTTG
1397	CAAGGCGGTAGACCAACCAATACCGTTGG
1398	GCCGGTAAACAAAAATCTAATTTAGGTCGTTTTG
1399	CAAACGACCTAAATTAGATTTTTGTTTACCGGC
1400	ATTATTAATATTTTCGCTGGTTCTGAATTAC
1401	GTAATTCAGAACCAGCGAAATATTTAATAAT
1402	TCCGTGGTTCTGAAGCACAAAATTACTTCACC
1403	GGTGAAGTAATTTTGTGCTTCAGAACCACGGA
1404	CAAAAAGTTGGCGAAGCTTTGAAATTGAGAATG
1405	CATTCTCAATTTCAAAGCTTCGCCAATTTTTG
1406	TTGAAATTGAGAATGCAAAAAGTCCTGAAGATG
1407	CATCTTCAGGACTTTTTTGCATTCTCAATTTCAA
1408	CTACATCAAAAATTTAATCTTGGAAAACGTTTTG
1409	CAAACGTTTTCCAAGATTAATAATTTTGATGTAG
1410	GATATTGAAAAGTTAAGAGGTGGTGAACCTGCAAAG
1411	CTTTGCAGTTCACCACCTCTTAACCTTTTCAATATC
1412	GTTTATATGTTTCGATCAACCTTCATCTTATTTG
1413	CAAATAAGATGAAGGTTGATCGAACATATAAAC
1414	TGGGTGAAAACGGTGCCGGTAAGACCACTTTG
1415	CAAAGTGGTCTTACCGGCACCGTTTTTACCCA
1416	CTATGAAACCACAAAAgTTGCACCAAGTTCCCAG
1417	CTGGGAACTTTGGTGCAAcTTTTTGTGGTTTCATAG
1418	GGTACTGTGACAAAgcgTTTTTCAAGAAAATTAG
1419	CTAATTTTCTTGAAAAAcgTGTCTGACAGTACC

RJO #	Sequenz
1420	CAGACTGATGTCGTTgcaCCTTTAAGGATTGAC
1421	GTCAATCCTTAAAGGtgcAACGACATCAGTCTG
1422	GATATTATTGATCAAcaaGTCCAACATTTGTC
1423	GACAAATGTTGGACttgTTGATCAATAATATC
1424	GATATTATTGATCAAGAAgccCAACATTTGTCTGG
1425	CCAGACAAATGTTGggcTTCTTGATCAATAATATC
1426	CTTGATTGATGAGaatTCTGCCTACTTAGATTCC
1427	GGAATCTAAGTAGGCAGAttCTCATCAATCAAG
1428	CACCTTCAGAAGGGATagcAACTCCTTCAGACC
1429	GGTCTGAAGGAGTTgctATCCCTTCTGAAGGTG
1430	CCCAAATGGATAAAcaaCAAAAATCATCAGG
1431	CCTGATGATTTTTGttgTTTATCCATTTGGG
1547	ATGCCGCTCAAATTATTgaaTCTTTACTAGCTCCA
1548	TGGAGCTAGTAAAGAttcAATAATTTGAGCGGCAT
1549	GATTTGTCAGTTTTGaatTATCTTTCCGATTTT
1550	GAAATCGGAAAGATAattCAAAACGTACAAATC
1551	ATTACCAGCCTCTGTCgaaGAAGGTATCAACATA
1552	TATGTTGATACCTTcttcGACAGAGGCTGGTAAT
1553	TCCTGCTGAAAACCgaaGATTCAGAActGAAGCTT
1554	AAGCTTCAGTTCTGAATCttcGGTTTTCAGCAGGA
1555	CAAAGTTCCCAGGTgaaGTCAGACAATTGT
1556	ACAATTGTCTGACTtcACCTGGGAACTTTG
1557	GTTCCCAGGTACTGTCgcaCAATTGTTTTCAAG
1558	CTTGAAAAACAATTGtgcGACAGTACCTGGGAAC
1559	TGACGATATTATTgctCAAGAAGTCCAACA
1560	TGTTGGACTTCTTGagcAATAATATCGTCA
1561	TTGAATGTCACCTTCgaaAGGGATCC
1562	GGATCCCTttcGAAGGTGACATTCAAA
1563	CTCCTTCAGACCAgaaATTAATAAGCTAGA
1564	TCTAGCTTATTAATttcTGGTCTGAAGGAG
1565	ATTAATAAGCTAGATgaaCAAATGGATAAAG
1566	CTTTATCCATTTGttcATCTAGCTTATTAAT
1567	CAAATGGATAAAGAAgaaAAATCATCAGGA
1568	TCCTGATGATTTtctTCTTTATCCATTTG
1569	CAGACTGATGTCGTTgaaCCTTTAAGGAT
1570	ATCCTTAAAGGttcAACGACATCAGTCTG
1660	GTGAAAACGGTACCGGTgcgACCACTTTGATC
1661	GATCAAAGTGGTcgacACCGGTACCGTTTTCAC
1662	GAAGTCCAACATTTGagaGGTGGTGAATTAC
1663	GTAATTCACCACctcCAAATGTTGGACTTC
1664	CATATACTTGATTGATcaaCCATCTGCCTACTTAG
1665	CTAAGTAGGCAGATGGttgATCAATCAAGTATATG

4.7.2 Klonierung und Sequenzierung *RLI1*:

RJO	Sequenz
1361	TTAGCCGCCGACGTGTCA
1362	TGTAATGAAGGTGGGAAG
1375	GCCGCCGACGTGTCATTTTCGTCCG
1376	CTGGCGCTCACACCGCGG
1448	ATTCCACCTAGCCTTCTGC
1449	TTGATGATCCTCCTGAATG
1450	ACTAGCTCCAACAATAACG
1451	TAGGCAGATGGCTCATC
1452	CTCCACATTTCTAAACCC
1498	GATTAGATTCTGCGGGAG
1499	acatgcatgcAGTGATAAAAACAGTCG

RJO	Sequenz
1500	acatgcatgcTTAAATACCGGTGTTATCC
1501	aaactgcaggagggaAGTGATAAAAACAGTCG
1502	aaactgcaggagggaTTAAATACCGGTGTTATCC
1765	tgcgcagctgTTAAATACCGGTGTTATC
1766	gctctagaATGAGTGATAAAAACAGTCG
1622	CAGGCTTTACACTTTATGC
1623	GCTGCGCAACTGTTGGGAAG
1363	ATTCCACCTAGCCTTCTGCAAAGTTCTTAAGAAAACACGACAGACAGACCATAC AGCTGAAGCTTCGTACGC
1364	ACCCAAAATAAAACAATCGTCCTCTTGGTTCTCCGAATCCCAAGATGCTGCATA GGCCACTAGTGGATCTG

4.7.3 TEV-Protease Insertionen:

RJO	Sequenz
2184	gagaatttgactttcagggttctagaATCGCATTCAATTTCCG
2185	accctgaaagtacaaattctcAATACATAATTTACCAG
2186	gagaatttgactttcagggttctagaCGTTTTGATGATCCTCC
2187	accctgaaagtacaaattctcACCTAAATTAGGTTTTTGGTTTACCG
2188	gagaatttgactttcagggttctagaGACTTGCAGAATGACTCTGC
2189	gagaatttgactttcagggttctagaGACTTGCAGAATGACTCTGC
2190	gagaatttgactttcagggttctagaTCTGCTAGTCGCGCCTTCTC
2191	accctgaaagtacaaattctcGGTAGCATCAGCTATTC

4.7.4 Epitopmarkierungen:

RJO #	Sequenz
1388	CAAAAATCATCAGGAACTACTTTTTCTTGGATAACACCGGTATTCGTACGCTGCAGGTCGAC
1389	AAAAATAAAACAATCGTCCTCTTGGTTCTCCGAATCCCAAGATGCATCGATGAATTCGAGCTCG
1513	CAAAAATCATCAGGAACTACTTTTTCTTGGATAACACCGGTATTtccggttctgctgctag
1514	AAAAATAAAACAATCGTCCTCTTGGTTCTCCGAATCCCAAGATGCACCTCGAGGCCAGAAGA
1670	CAAAAATCATCAGGAACTACTTTTTCTTGGATAACACCGGTATTtccatggaaaagagaag
1671	CAAAAATAAAACAATCGTCCTCTTGGTTCTCCGAATCCCAAGATGtctagactcactataggg
1739	CTAGATGGCCCCGACGATTTTGAATTCGGTGATGACGACTTTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
1740	TGAGATGGACAAGTTTATCATAGCAAAGAAACAATAAGCAGAATCGATGAATTCGAGCTCG
1767	CGAAGAGATAGTTGAAGAAGTTTTGGAAGAAACAAGGAAAAGGTGCAAcgtacgctgcaggtcgac
1768	ACTAGATATTGTTGTTAGTTTACATATAACAAGCCCGTAAGTTCATGAAATatcgatgaattcgagctcg
1769	CGACGTGGAGAAGGCCCGCCGAAGCTAAAGAGCACATGCAAGAAGCTAATcgtacgctgcaggtcgac
1770	ATGCATATATGTATGTTACTATACATCAACATCAGCATCAAAATTAACAatcgatgaattcgagctcg
1771	CAAAGATATAAAATCGCTAAAGAACGTCTTAACCCACCATCAAATCGTCGTcgtacgctgcaggtcgac
1772	CAATGATTTTTTGTAAAGAATGCTTTCGAAGTAGTTTTTGATTTTATTGAatcgatgaattcgagctcg
1773	GAATATAAAATCGCTAAAGAACGTCTTAACCCACCATCAAATCGTCGTtccatggaaaagagaag
1774	CTACAATGATTTTTTGTAAAGAATGCTTTCGAAGTAGTTTTTGATTTTATTGAatcgactcactataggg

5 Methoden

5.1 Hefemedien

YEP Medium:

1,1 % (w/v) Yeast Extract (Becton Dickinson)

2,2 % (w/v) Bacto Trypton (Becton Dickinson)

0,0055 % (w/v) Adenin

Für YEPD Zugabe von 2 % (w/v) Glukose; Für YEPGal Zugabe von 2% Galaktose

-ura/-his/-leu/-trp Medium:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base

0,074 % (w/v) CSM -ura/-his/-leu/-trp

0,0055 % (w/v) Adenin

2 % (w/v) Glukose bzw. Galaktose

5'-FOA-Medium:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base

0,077 % (w/v) CSM -ura

0,0055 % (w/v) Adenin

20 % (w/v) Glukose bzw. Galaktose

+ 1 mg/l 5'-FOA

5.2 Molekularbiologische Methoden

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

5.3 Kultivierung der Hefen

Soweit nicht anders vermerkt wurden die Hefen in Vollmedium oder Selektivmedium (-ura/-his/-leu/-trp) mit Glukose oder Galaktose als Zucker über Nacht inkubiert, die Zelldichte (5.5) gemessen und die Kultur auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6-1 wachsen gelassen und anschließend je nach Protokoll weiterverwendet. Für die Galaktose Induktion zur Überexpression von Rli1p-TAP und rli1p-TAP wurden 2 l YEPGal Medium ausgehend von 250 ml YNB -ura/+Glc Vorkulturen auf eine OD_{600} von 1 angeimpft. Das Medium der Vorkulturen wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, die Zellen in das YEPGal Medium überführt. Die Induktion erfolgte für 7-9 h bei 30°C unter Schütteln. Die ts-Stämme wurden bei 25°C inkubiert. Für den Stamm RJY2776s wurde vor jedem Experiment das WT-Plasmid über 5'-FOA Platten entfernt (RJY2776), bevor eine Vorkultur angesetzt wurde.

5.4 Glukose- und Doxycyclin-Repression

Für die Glukose-Repression wurde eine Hefekultur über Nacht in Gal-Medium kultiviert. Vor der Repression wurden die Zellen auf eine OD_{600} von 0,2 ebenfalls in Gal-Medium verdünnt und für eine Generationszeit (2 h) wachsen gelassen. Dann wurde die Kultur abzentrifugiert und mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium überführt und zu den jeweiligen Zeitpunkten ein Aliquot abgenommen. Für die Doxycyclin-Repression wurde eine über Nacht Kultur in

Vollmedium verwendet. Die Zellen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt, 2 h inkubiert bevor das Doxycyclin in einer Konzentration von 2-5 µg/µl zugegeben wurde. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und nach 5.25.2 oder 5.25.3 weiterverarbeitet.

5.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Hefekulturen wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Medium als Leerwert gemessen. Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 1 entspricht dabei etwas 2.5×10^7 Zellen.

5.6 Hefetransformation

5.6.1 Schnelle Transformation

Für die Transformation von Plasmid DNA wurde hauptsächlich die schnelle Hefetransformation durchgeführt (Chen *et al.*, 1992). Dazu wurde eine Impföse frisch ausplattierter Zellen in 100 µl One-Step Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Salmon Sperm (SS) DNA (2 mg/ml; Sigma-Aldrich) und 1 µl der zu transformierenden Plasmid DNA (aus Miniprep; 150-500 ng) wurde der Ansatz gründlich gemischt und für 30 min bei 45°C inkubiert. SS-DNA wurde vor der Verwendung zur Auftrennung der DNA Doppelstränge für 5-10 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Im Anschluss an die Transformation wurde der Ansatz direkt auf für das Plasmid selektierendes Medium (YNB –ura/-his/-leu/-trp) ausplattiert. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 30°C folgten Reinigungsausstriche von Einzelkolonien.

One-Step Puffer 200 mM LiAc; 40 % (v/v) PEG 3350; 100 mM DTT

5.6.2 Hoch-Effizienz-Transformation

Für die Transformation von PCR Produkten oder auch für Plasmid DNA wurde die Hoch-Effizienz-Transformation nach (Gietz *et al.*, 1995) verwendet. Dazu wurden 50 ml Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1 geerntet, abzentrifugiert und mit H₂O gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen werden dann in 100 mM LiAc gut resuspendiert, so dass das finale Volumen von Zellen und LiAc ungefähr 500 µl ergibt (100 µl Zellen und 400 µl LiAc 100mM). Die Zellsuspension wird gevortext bevor für einen Transformationsansatz 50 µl aliquotiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen wird. Dann werden 240 µl PEG (50 %), 36 µl 1 M LiAc, 25 µl aufgekochte und dann abgekühlte SS-DNA (2 mg/ml). Zum Schluss wird die Plasmid DNA (150 ng-500 ng) oder das PCR-Produkt (100 ng –1, 000 ng) in einem Gesamtvolumen von 50 µl zugegeben, 1 min gevortext und 30 min bei 30°C inkubiert, Hitzeschock für 20-25 min bei 42°C. Für ts Mutanten nur 10-15 min bei 42°C oder 37°C. Danach wird der Transformationsmix abgenommen und die Zellen in H₂O aufgenommen und auf die entsprechenden Selektivplatten ausplattiert.

5.7 Generierung eines *rli1 shuffle* Stamms

Das PCR-Produkt wurde mit den Oligos RJO1363 und RJO1364 und dem Plasmid RJP135 als *template* generiert und wie unter 5.6.2 beschrieben in den Stamm RJY 925 transformiert. Durch homologe Rekombination wurde in diesem diploiden WT-Stamm (*RLI1/RLI1*) ein Allel von *RLI1* durch den Marker *HIS3* ersetzt, was zu einem heterozygoten *RLI1/Δrli1::spHIS3 Knockout* führte (RJY1905). Mittels PCR-Analyse und Southern Blot Analyse konnte dieser heterozygote *Knockout* nachgewiesen

werden. Anschließend wurde dieser diploide, heterozygote *RLI1/Δrli1* Stamm mit einem *URA3-RLI1*-Plasmid transformiert (RJP807). Um möglichst physiologische Bedingungen für die Expression von *RLI1* zu erhalten, wurde der endogene Promotor erhalten sowie auch 3'-flankierende Bereiche, die wesentlich zu einer korrekten Expression des Gens führen. Durch Sporulation des heterozygoten *RLI1/Δrli1* Stammes und anschließender Tetradenanalyse wurde der gesuchte *shuffle* Stamm identifiziert, der sowohl den *Δrli1 Knockout (HIS3+)* als auch das komplementierende *URA3-RLI1*-Plasmid trägt (*URA3+*). Dieses *URA3-RLI1*-Plasmid wird durch Selektion der Zellen auf 5'-FOA eliminiert werden. Unter diesen Bedingungen müssen die Zellen das WT-Plasmid (*URA3-RLI1*) verlieren, da 5'-FOA toxisch für *URA+* Zellen ist. Dieser Stamm wurde für alle Transformationen von Plasmiden in einen *Δrli1* Stamm verwendet sowie zur Analyse der mutagenisierten Plasmide (5.20; 5.21).

5.8 Knockout

Für die Herstellung eines Gen-*Knockout* wurde die von Knop *et al.* entwickelte Ein-Schritt-Gendeletionen (*one-step-gene replacement*) verwendet (Knop *et al.*, 1999a). Mit Hilfe der PCR wurde ein *Knockout*-Modul amplifiziert, welches einen Selektionsmarker trägt. Diese Kasette wurde mit Primern amplifiziert, welche ca. 50 bp Homologie zur 5'- bzw. 3'-Region der Zielsequenz aufweisen. Das Modul wurde nach der PCR mit dem PCR-Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und in Wasser aufgenommen. Für die Integration wurde das Modul mit der Hoch-Effizienz-Methode in Hefe transformiert und durch homologe Rekombination an die entsprechende Stelle im Genom integriert. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechenden Selektivplatten ausplattiert, um positive Transformanden zu selektieren. Die korrekte Integration des Markers wurde anschließend durch PCR oder Southern Blot analysiert.

5.9 Epitop-Markierung

Für die Epitop-Markierung von Proteinen wurde die von Knop *et al.* entwickelte Ein-Schritt-Markierung (*one-step-tagging*) verwendet (Knop *et al.*, 1999a). Mit Hilfe der PCR wurde ein Epitop-Modul amplifiziert, welches den gewünschten Tag und einen Selektionsmarker trägt. Diese Kasette wurde mit Primern amplifiziert, welche ca. 50 bp Homologie zur 5'- bzw. 3'-Region der Zielsequenz aufweisen. Das Modul wurde nach der PCR mit dem PCR-Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und in Wasser aufgenommen. Für die Integration wurde das Modul mit der Hoch-Effizienz-Methode in Hefe transformiert und durch homologe Rekombination an die entsprechende Stelle im Genom integriert. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechenden Selektivplatten ausplattiert, um positive Transformanden zu selektieren. Die korrekte Integration des Epitops wurde anschließend durch Western Blot Analyse mit dem entsprechenden Antikörper überprüft.

5.10 Rekombinationsklonierung

Für die Rekombinationsklonierung wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das 200-300 bp homologe Sequenzen zum Plasmid hat, in das das PCR-Produkt eingefügt werden soll. Der Vektor wird dann linearisiert und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefen transformiert (Verhältnis 1:9). Durch homologe Rekombination wird das Plasmid zusammengesetzt und durch Selektion auf den Marker die erfolgreiche Ligation überprüft. Anschließend wird das Plasmid aus den Hefen isoliert und in *E. coli* vervielfältigt.

5.11 Transformation von DNA in Bakterien

Kompetente *E. coli* Zellen für die Hitzeschocktransformation wurden nach Hanahan *et al.* generiert (Hanahan, 1983). Für Ampicillinresistente Plasmide wurde die Schnelltransformation nach verwendet. Für die Hitzeschocktransformation wurden etwa 100 ng vorgekühlte DNA zu 100 µl eisgekühlten kompetenten Bakterienzellen gegeben. Die Ansätze wurden vorsichtig mit -20°C kalten Pipettenspitzen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und 5 min Abkühlung auf Eis wurden 900 µl vorgewärmtes LB-Medium (30°C) zugegeben. Die Bakterien wurden dann 60 min bei 37°C geschüttelt, mit Hilfe von sterilen Glaskugeln auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Alternativ wurden die Zellen durch Elektroporation transformiert. Dazu wurde 1 l LB-Medium mit 10 ml einer über Nacht Kultur inkubiert und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5-1,0$ wachsen gelassen. Die Kultur wurde dann auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und das Pellet 3 mal mit kaltem H₂O und 2 mal in 10 % Glycerol gewaschen bevor sie in 2-3 ml 10% Glycerol resuspendiert und bei -80°C gelagert wurden. 50 µl Zellen wurden dann aufgetaut in Elektrotransformations-Küvetten (Biorad) überführt und 1-2 µl Ligationsmix oder 5 µl der aus Hefe isolierten Plasmid DNA (5.15) gemixt und 1 min auf Eis inkubiert. Bei Küvetten mit 0,2 cm Durchmesser wurde mit dem Elektroporator (Biorad) 2,5 kV angelegt und die Zellen gepulst. Die Zellen wurden anschließend in LB-Medium überführt, für 1 h bei 37°C inkubiert bevor die Zellen ausplattiert wurden

5.12 Präparation von Plasmid-DNA

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

5.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* und automatisiert amplifizieren (Ehrlich, 1989; Mullis *et al.*, 1986). Zum qualitativen Nachweis von Epitopmarkierungen wurde *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Die effiziente und möglichst fehlerfreie Amplifikation von DNA-Fragmenten für Epitopmarkierung oder Subklonierung in Expressionsvektoren erfolgte mittels der *Proofreading*-Polymerase Platinum-*Pfx*-Polymerase (Invitrogen). Für die PCR-Reaktionen wurde folgender Ansatz hergestellt (pro 100µl): 200 pmol/Primer, 0,15 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer, 1 mM MgCl₂, 5 U Polymerase, 50-200 ng DNA. Verwendet wurde ein *hot* Start-Protokoll, dem vor dem eigentlichen Amplifikationsprotokoll eine vier bis fünf Minuten lange Erhitzung auf 95°C vorausgeht. Erst nach diesem initialen 95°C Schritt wurde die Polymerase zugegeben oder aktiviert. Dem *Hot* Start folgen dreißig Zyklen mit einer jeweils einminütigen Denaturierungsphase. Gefolgt wird dies von einer Hybridisierungsphase des Primers an die DNA, das *Annealing*, und eine je nach zu amplifizierenden Fragment variable Extensionszeit zwischen 0,5 min und 3 min (ca. 1 kbp Extension/Minute) bei 68°C (*Pfx*) oder 72°C (*Taq*). Nach Ablauf der dreißig Zyklen wurden in einer 7 min andauernden Extensionsphase bis dahin noch nicht komplett synthetisierte Produkte beendet.

5.14 Restriktionsverdau und Ligation

Der Restriktionsverdau von Plasmid DNA und PCR-Produkten wurde mit Enzymen

und Puffern der Firma NEB oder MBI Fermentas nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde mit einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) gereinigt. Die PCR-Produkte wurden dann entweder mit der Quick-T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben direkt in den entsprechenden Vektor kloniert oder mit dem PCR 2.1-TOPO (Invitrogen) Kit zuerst in den TOPO 2.1 Vektor nach Herstellerangaben zwischenkloniert, ausgeschnitten und dann mit dem gewünschten Vektor ligiert.

5.15 PCR aus Hefekolonien

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

PCR-Ansatz:

- 5 µl 10x colony PCR buffer
- 5 µl DNA
- 1.5 µl 50 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTP mix
- 10 pmol je Oligo
- 2 µl 25 % Triton X-100
- 0.3 µl Taq Polymerase (5 U/µl)

Mit H₂O auf 50 µl auffüllen.

5.16 Isolation von genomischer DNA aus Hefe

5.16.1 Lyse mit Glasperlen

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

- Lyse Puffer: 100 mM Tris pH 8.0; 50 mM EDTA; 1 % SDS

5.16.2 Lyse durch Sphäroblastierung

Alternativ wurde ein anderes Protokoll verwendet, dazu wurden 5-15 ml Hefekultur abzentrifugiert und mit H₂O gewaschen. Das Pellet wird anschließend in 200 µl SCE/Zymolyase/2-Mercaptoethanol resuspendiert und bei 37°C für 30-60 min inkubiert. Die Sphäroblastierung wird dabei im Mikroskop überprüft. Dann werden 200 µl SDS Lösung zugegeben und gut gevortext. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 65°C werden 200 µl 5 M KaAc dazugegeben und gut vermischt. Anschließend wird für 20 min auf Eis inkubiert, 5 min bei voller Leistung zentrifugiert und 400–500 µl Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zur Fällung werden nun 500 µl Ethanol zugegeben und bei voller Leistung 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50-100 µl TE resuspendiert. Sollte ein RNA-Verdau

angeschlossen werden wurde das Pellet in 270 μ l TE resuspendiert und mit 1 μ l RNaseA (1 mg/ml) für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde je nach gewünschter Sauberkeit nur mit 500 μ l Isopropanol gefällt. Alternativ wurden 30 μ l 3 M NaAc pH 5,2 und 300 μ l Phenol dazugegeben, durch vortexen gemischt und für 5 min bei voller Leistung abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und 500 μ l Ethanol dazugegeben, gut vermischt und abzentrifugiert. In beiden Fällen wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-100 μ l TE resuspendiert. Für den Southern Blot wurden 5 μ l DNA verwendet, für PCR-Reaktionen wurde die genomische DNA 1:10 verdünnt und 1 μ l eingesetzt.

- SCE: 1 M Sorbitol; 100 mM NaCitrat; 60 mM EDTA pH 7
- 1 ml SCE/Zymolyase/2-Mercaptoethanol: 1 mg Zymolyase 20,000T; 8 μ l; 2-Mercaptoethanol
- SDS Lösung: 2 % SDS; 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA

5.17 Isolation von Plasmid DNA aus Hefe

Über Nacht wurden 2 ml Hefekultur in YEPD bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen, in 100 μ l STET-Puffer resuspendiert und mit 100 μ l Glaskugeln durch 5 minütiges vortexen lysiert. Anschließend wurden 100 μ l STET-Puffer zugegeben, gevortext und 3 min bei 95°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis abgekühlt bevor 10 min bei 4°C und voller Leistung zentrifugiert wurde. 100 μ l des Überstandes abgenommen, mit 500 μ l 7,5 M Ammoniumacetat (pH 7) versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und voller Leistung zentrifugiert. 400 μ l des Überstandes wurden mit 800 μ l vorgekühltem Ethanol versetzt und 10 min bei voller Leistung zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l Wasser oder TE aufgenommen. 1 μ l wurde dann für die Transformation in elektrokompetente *E. coli*s verwendet oder 10 μ l für die Hitzeschocktransformation mit chemisch kompetenten Bakterien (5.11). Die Plasmide wurden dann nach typischen Methoden aus den Bakterien isoliert (5.12).

- STET-Puffer: 8 % Saccharose; 50 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5% Triton X-100

5.18 Isolation von RNA aus Hefezellen

15 ml Hefekultur wurde bei 30°C angezogen bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wurde. Alternativ wurde eine über Nacht Kultur verwendet. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen. Zu dem Zellpellet werden 200 μ l Glasperlen, 400 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) und 500 μ l Cross RNA Puffer 1 gegeben. Der Zellaufschluss erfolgt mit dem Ika-vibrax Mixer für 10 min bei 4°C. Das Zellysate wird dann für 5 min bei voller Leistung zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, und mit 1 ml kaltem Ethanol gemixt und mind. 10 min bei -20°C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 4°C und voller Leistung, wird der Überstand abgenommen und das Pellet je nach Größe in 30-100 μ l Cross RNA Puffer 2 resuspendiert und für 10 min bei 65°C vollständig gelöst. Anschließend wurde die RNA Konzentration bei 260 nm gemessen.

- Cross RNA Puffer 1: 300 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,2 % SDS
- Cross RNA Puffer 2: 1x TE; 0,2 % SDS; DEPC-behandeltes H₂O

5.19 Fällung und Analyse von RNA

Die RNA-enhaltende Lösung wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) gereinigt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen NaAc pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und durch Zentrifugation bei 4°C für mindestens 20 min pelletiert. Die RNA aus 100 μl Calmodulin Eluat wurde durch Zugabe von 100 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) gereinigt und anschließend wie oben beschrieben präzipitiert gegebenenfalls mit Hilfe von 1 μl Glycogen. Die Analyse der RNA erfolgte entweder mit einem 1 % Agarose Gel oder wie unter 5.19 beschrieben. Dazu wurde 1-2 μl RNA oder 1 μl RNA-Marker mit 1 μl Ethidiumbromid (1mg/ml), 10 μl 2x RNA Ladepuffer in einem Volumen von 20 μl für 20 min bei 65°C inkubiert.

- 2x RNA Ladepuffer: 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 50 % Glycerol

5.20 Southern Blot

5.20.1 Restriktionsverdau und Transfer

5 μl der Hefe-DNA (5.15.2) werden in einem 20 μl Reaktionsansatz verdaut. Zum Restriktionsverdau werden 1 μl RNaseA (10 mg/ml), 2 μl Xba1 und 2 μl EcoR5 (10 U/ μl) im geeigneten Restriktionspuffer dazugegeben, auf 20 μl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird dann auf ein 0.8% Agarosegel (12X14 cm) mit EtBr aufgetragen und in 1XTAE bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (2-5 h). Anschließend wird ein Foto des Agarosegels aufgenommen, um den Marker nachher mit dem Blot vergleichen zu können wird ein Lineal angelegt. Dann wird das Gel in 500 ml 0.25 M HCl für 20 min de-purinisiert. Der Bromphenolhaltige Ladepuffer sollte dabei gelb gefärbt werden. Das Gel wird kurz mit H_2O gewaschen und anschließend für 2 mal 20 min mit 500 ml Denaturierungslösung (0.5 M NaOH; 1.5 M NaCl) denaturiert. Eine Hybond N+ Nylonmembran (12X14 cm) wird in H_2O angefeuchtet und anschließend mit der Denaturierungslösung äquilibriert. 4 Whatman Filterpapiere werden so zu geschnitten, dass ein 12x22 cm und drei 12x14 cm Streifen entstehen. Das lange Filterpapier wird auf einen umgekehrten Gelschlitten in eine Schale mit Denaturierungslösung gelegt, so dass die losen Enden in dem Pufferreservoir liegen. Dann wird das kurze Filterpapier luftblasenfrei draufgelegt, bevor das Gel mit den Taschen nach unten, und die Membran daraufgeschichtet werden. Die anderen zwei Filterpapiere werden dann darüber gelegt und mit einem 5-10 cm Papiertücherstapel zugedeckt und mit einer Glasplatte sowie einem Gewicht beschwert. Der Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht durch Kapillarkräfte. Nach dem Transfer wird die Membran für 1 min in 1x SSC gewaschen und getrocknet bevor und mit einem UV-Crosslinker (Stratalinker AUTO Programm) wird die DNA fixiert.

- 20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0

5.20.2 Hybridisierung

Die *RLI1* Sonde wurde mit einem Restriktionsverdau mit Sac2 und EcoR1 des Plasmids RJP810 hergestellt. Das resultierende 300 bp große Restriktionsfragment liegt in der 5'-UTR des *RLI1* Allels und erkennt somit sowohl das 1,400 bp Fragment des WT-Allels als auch das 2,200 bp des durch *HIS3* ersetzte *RLI1*-Allel. Dies ist wichtig da es sich um einen heterozygoten *RLI1*/ $\Delta rli1$ Knockout handelte. Das Restriktionsfragment wurde dann gereinigt und anschließend für die Markierung mit

α^{32} [P]dATP eingesetzt. Dazu wurde das Prime-It II Random Primer Labeling (Stratagene) verwendet. 1 μ l Restriktionsfragment, 22 μ l H₂O und 10 μ l random Oligonukleotid Primer wurden für 5 min bei 96°C inkubiert und für 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden 10 μ l 5x CTP primer Puffer, 5 μ l α^{32} [P]dATP und 1 μ l Exo Klenow-Polymerase für 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 2 μ l Stoppmix beendet. Die Reinigung der markierten Sonde erfolgte durch Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide mit den Micro Spin Säulen von Biorad. Die Membran wurde für 60-120 min bei 65°C in 20 ml Prä-Hybridisierungslösung inkubiert, die Heringsperma DNA wurde vorher für 7 min bei 100°C aufgeköcht. Die gereinigte Sonde wird für 5 min bei 95°C aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und anschließend zu der Prä-Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt dann bei 65°C für mindestens 4 h oder über Nacht. Die Membran wird dann für 3 mal 10 min bei 50°C mit 2x SSC; 1% SDS gewaschen und anschließend wird das Signal dann wird das Signal mit dem Phosphorimagerscreen detektiert und im Phosphorimager sichtbar gemacht.

- 20 ml Prä-Hybridisierungslösung: 9,2 ml H₂O (0,46 Vol. H₂O); 92 μ l 10 mg/ml Heringssperma DNA (0,0046 Vol.); 10,8 ml Scp/Sarc/DS
- 20 x Scp: 2 M NaCl; 0.6M-Na₂HPO₄; 0.02M-EDTA pH 6.2 mit HCl
- Scp/Sarc/DS: 20 g Dextransulfat (500,000) werden in 60 ml 20x SCP aufgenommen und auf 101 ml mit H₂O aufgefüllt, dann 7 ml 30% N-Lauroylsarcosin zugeben; Sterilfiltrieren

5.21 Northern Blot

5.21.1 RNA-Gel und Membran Transfer

Für 1,2 % Agarosegele werden 50 ml für ein kleines Gel und 150 ml für ein großes Gel benötigt. Dazu werden 0,6 g bzw. 1,8 g Agarose in 43,5 ml bzw. 131,5 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und auf 60°C abgekühlt. Danach werden 5 ml bzw. 15 ml 10x MOPS und 1,5 ml bzw. 3,5 ml 37 % Formaldehyd dazugegeben, gemixt und in den Gelschlitten gegossen. Die RNA Proben werden wie folgt vorbereitet. 15-20 μ g RNA werden auf mit H₂O auf 15 μ l aufgefüllt, 5 μ l 10x MOPS, 9 μ l Formaldehyd, 21 μ l Formamid und 10 μ l Ladepuffer werden dazugegeben, gevortext und für 15 min bei 65°C inkubiert. 2-3 μ l des RNA-Markers werden auf 10 μ l mit H₂O aufgefüllt und mit 10 μ l Ladepuffer ebenfalls für 15 min bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 20-30 ml auf das Gel aufgetragen. Das Gel wird dann in 1x MOPS Puffer als Laufpuffer bei 6 V/cm für ca. 3 h laufen gelassen. Danach wird das Gel 2 Mal mit DEPC-H₂O gewaschen und einmal in 10x SSC. 2 Whatman Filter werden mit 10X SSC inkubiert und auf den umgekehrten Gelschlitten gelegt, so dass die Enden in einem Tank mit 10X SSC liegen. Dann wird das Gel mit der oberen Seite nach unten auf das Filterpapier gelegt und rundherum mit Parafilm abgedeckt, so dass keine Flüssigkeit daneben vorbeilaufen kann. Anschließend wird eine Hybond N+ Nylonmembran mit 10x SSC inkubiert und auf das Gel gelegt. Darüber werden noch 2 in 10x SSC inkubierte Whatman Filterpapiere gelegt. Mit einer Glaspipette werden alle Luftblasen entfernt, bevor ein 5-10 cm Stapel von Papiertüchern, eine Glasplatte und ein Gewicht darauf gestapelt werden und über Nacht der Transfer über Kapillarkräfte auf die Membran erfolgt. Die Membran wird nach dem Transfer in 2x SSC gewaschen, getrocknet und mit einem UV-Crosslinker fixiert (Stratalinker AUTO Programm). Der erfolgreiche Transfer kann mit Färbung durch Methylenblau (0,04 % Methylenblau in 500 mM NaAc pH 5,5) und anschließender Entfärbung mit H₂O überprüft werden.

- Ladepuffer: 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 50 % Glycerol
- 10x MOPS: 48,1 g MOPS in 800 ml DEPC-H₂O pH 7,0 (NaOH); 16,6 ml 3 M DEPC-NaAc; 20 ml 0,5 M DEPC-EDTA pH 8,0; ad 1 l DEPC-H₂O
- 20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0

5.21.2 Hybridisierung mit Oligo-Sonden

Die Membran wird dann in einem Hybridisierungs Gefäß mit 25 ml Prä-Hybridisierungslösung bestehend aus 11,5 ml H₂O; 115 µl 10 mg/ml Heringsperma DNA (7 min bei 95°C aufgekocht) und 13,5 ml Scp/Sarc/DS Mix für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Oligos für die 20S rRNA (RJO1853) TTAAGCGCAGGCCCGGCTGG und für die 18S rRNA (RJO1841) CATGGCTTAATCTTTGAGAC wurden mit γ^{32} [P]dATP markiert. Dazu wurde je 10 pmol der Oligos mit 5 µl 10X Polynukleotidkinase Puffer (NEB), 3 µl γ^{32} [P]dATP und 2 µl T4 Polynukleotidkinase (NEB) in einem 50 µl Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert und 3 min auf Eis abgekühlt. Die Entfernung der freien Nukleotide erfolgte mit G25 Sepharose Säulen (Roche). Anschließend wurde die Sonde zu der Prä-Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 35°C inkubiert. Die Prä-Hybridisierungslösung wird entfernt und die Membran anschließend 2-mal mit 2x SSC + 0,1 % SDS und 2-mal 20 min mit 0,5x SSC + 0,1 % SDS gewaschen. Dann wird das Signal mit dem Phosphorimagerscreen detektiert und im Phosphorimager sichtbar gemacht.

- 20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0
- 20x Scp: 2 M NaCl; 600 mM Na₂HPO₄; 20 mM EDTA pH 6,2 mit HCl
- Scp/Sarc/DS Mix: 20 g Dextransulfat (500000) werden in 60 ml 20x SCP aufgenommen und auf 101 ml mit H₂O aufgefüllt, dann 7 ml 30% N-Lauroylsarcosin zugeben; sterilfiltrieren

5.22 Ortsspezifische Mutagenese

Für die ortsspezifische Mutagenese wurden die Mutagenese-Oligos aus 4.71 verwendet und in das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben eingesetzt (Stratagene). Die PCR-Reaktion wurde mit RJP810 als template nach Angaben des Herstellers durchgeführt, in kompetente *E. coli*s transformiert und wie unter 5.11 beschrieben weiterverarbeitet. Die Plasmide wurden dann zur Überprüfung der richtigen Basensubstitution mit den Oligos RJO1448-1552 sequenziert. Das mutagenisierte Plasmid wurde dann wie unter 5.6.1 beschrieben in den *shuffle* Stamm (5.7) transformiert und auf -*leu* Medium selektioniert. Einige Transformanten wurden anschließend auf 5'-FOA Selektionsmedium überführt, 2-3 Tage bei 25°C inkubiert und so auf Komplementation des $\Delta rli1$ Stamms getestet.

5.23 Generierung einer *rli1* Genbank

5.23.1 Chemische Mutagenese

20 µg der Plasmid-DNA (in 10-20 µl Volumen) werden mit 500 µl Hydroxylamin Puffer für 20 h bei 50°C inkubiert: Nach der Inkubation wird die DNA gefällt mit Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 5,2 und 2 Volumen 100 % Ethanol. Dann wird das Pellet in 400 µl TE resuspendiert und wie oben beschrieben erneut gefällt. Das Pellet wird dann in 10 µl TE resuspendiert. 1 µl der konzentrierten DNA wird zur Kontrolle über ein Agarosegel aufgetrennt und zum Test der Transformationseffizienz nach dem Hoch-Effizienz-Transformation Protokoll 5.6 in

den shuffle Stamm eingebracht, und auf Selektivplatten für 3-5 Tage im Dunkeln inkubiert. Eine 1:10 Verdünnung der transformierten Hefen sollte dabei ungefähr zu 200 Kolonien auf den Platten führen. Anschließend erfolgt die große Transformation mit dem restlichen mutagenisierten Plasmid. Die erhaltenen Transformanden werden auf 5'-FOA selektioniert und bei 30°C inkubiert (Todesrate ungefähr 5-10%). Die Kolonien werden dann zweimal auf YEPD Platten gestrichen und für hitzesensitive bei 25°C und 37°C, für kältesensitive bei 20°C und 30°C gescreent. Die temperatursensitiven Phänotypen werden gesucht, und nochmals ausgestrichen um den ts-Phänotyp zu überprüfen. Die Komplementation wird mit einer Re-Transformation des WT-Rli1-Plasmids überprüft. Aus den komplementierten Stämmen werden das mutierte Plasmide isoliert und in den shuffle Stamm retransformiert und nach der Selektion auf 5'-FOA wird der ts-Phänotyp per Tropftest überprüft.

- Hydroxylamin Puffer: 1 M Hydroxylamin; 0,4 M NaOH; 20 mM NaP pH 7,0; 5 mM EDTA
- NaP pH 7,0:

5.23.2 PCR-Mutagenese

Die zu mutierende Sequenz wurde mit RJP810 als template mit Primern so amplifiziert, dass ca. 300 bp Homologie zur 5'- bzw. 3'-Region des Vektors entstehen. Nach der PCR können die mutierten PCR Produkte zusammen mit dem mit Sac 1 und Xba1 linearisierten Vektor pRS315 (RJP297) in den shuffle Stamm transformiert werden. Dies ermöglicht eine Rekombinationsklonierung (5.10), auch gap repair genannt, in den Hefezellen. Die Mutagenese PCR wurde wie folgt durchgeführt.

PCR-Reaktion:

- 10 µl PCR Puffer (Titanium Taq-Polymerase)
- 1 µl RJP 810
- 1 µl Oligo RJO #1622
- 1 µl Oligo RJO #1623
- 10 µl MgCl₂ (50 mM)
- 5 µl MnCl₂ (25 mM)
- 0,8 µl dATP (25 mM)
- 4 µl dCTP/dGTP/dTTP (25 mM)
- 1 µl Titanium Taq-Polymerase (5 U/µl)

Mit H₂O auf 100 µl auffüllen.

50 Zyklen: 94°C 40 sec; 50°C 40 sec; 68°C 3 min

Das PCR Produkt wurde anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Quiagen gereinigt. Der geschnittene Vektor und das PCR Produkt werden auf einem Agarosegel überprüft, wobei 2 µl gut sichtbar sein sollten. Die Co-Transformation des linearisierten Vektors mit dem PCR Produkt sollte in einem Verhältnis 1:10 und 1:20 in den shuffle Stamm erfolgen mit der unter 5.6.2 beschriebenen Methode. Als Kontrolle für den Hintergrund wird der linearisierte Vektor alleine transformiert. Die Selektion erfolgt auf -leu bei 30°C für 3-4 Tage und es sollten ca. 300 Kolonien pro Platte wachsen. Die Kolonien wurden dann auf 5'-FOA Selektivplatten ausgestrichen. Nach 2-4 Tagen werden die wachsenden Kolonien auf 4 YEPD Platten verteilt und bei 20°C, 25°C, 30°C und 37°C für 2-4 Tage inkubiert. Anschließend werden die Platten miteinander verglichen und nach Wachstumsdefekten bei 20°C (kältesensitiv)

und 37°C (hitzesensitiv) gesucht. Die potentiellen Kandidaten werden dann zur Überprüfung eines ts-Phänotyps erneut ausgestrichen und bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Zeigt sich erneut ein Wachstumseffekt werden die Plasmide aus den Hefen wie unter 5.16 beschrieben isoliert, in *E. colis* transformiert und anschließend isoliert und in den *shuffle* Stamm re-transformiert. Die Transformanden werden dann auf 5'-FOA selektioniert, um den Effekt des isolierten, mutagenisierten Plasmids auf den $\Delta rli1$ Stamm untersuchen zu können. Tropftests auf YEPD Platten und Inkubation bei entsprechender Temperaturen (cs: 20°C und 30°C; ts: 25°C und 37°C) zeigen dann die Abhängigkeit des ts-Phänotyps von dem Plasmid.

5.24 High copy suppressor Screen

Zuerst wurde die Genbank (RJP2) amplifiziert. Dazu wurden 500000 Bakterien transformiert von den Platten abgekratzt, in 1 l LB überführt und für 2 h bei 37°C wachsen gelassen und anschließend ein GigaPrep (Qiagen) durchgeführt. Die so amplifizierte Genbank wurde dann zum Test der Transformationseffizienz in den Stamm RJY2301 oder RJY1968 transformiert, so dass je ca. 300 Kolonien/Platte auf –leu Medium wachsen.

5.24.1 ts-Stamm

Für den Screen mit dem ts-Stamm wurde ein großer Ansatz des Stammes RJY2301 mit der Genbank transformiert und mit den Bedingungen der Test Transformation auf 15 Platten (a 300 Kolonien) auf –leu selektioniert und bei 25°C für 12 h inkubiert. Anschließend wurden 14 Platten bei 37°C solange inkubiert, bis auf der Kontrollplatte bei 25°C die Kolonien gut sichtbar waren. Die Kontrolle wurde mit dem leeren Vektor (Yeplac181) durchgeführt auf 2 –leu Platten aufgebracht und 12 h bei 25 °C inkubiert bevor eine der Platten zu 37°C überführt wurde (Test auf spontane Suppressoren). Von den 14 Platten wurden dann die wachsenden Kolonien auf eine neue Platte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Flüssigkulturen angesetzt und die Plasmide wie unter wie unter 5.16 beschrieben isoliert, in *E. colis* transformiert und anschließend isoliert. Durch einen Restriktionsverdau wurde das Restriktionsmuster überprüft und einige Plasmide mit den Oligos RJO166 cccgactggaaagcgggcag und RJO167 ggagaaaataccgcatcaggc.sequenziert. Die potentiellen Suppressoren werden in einem letzten Schritt in den Stamm RJY re-transformiert und auf Wachstum bei 37°C überprüft. Der ts-Stamm war jedoch bei diesem Schritt nicht mehr ts, wie die Kontrollplatte mit dem leeren Plasmid bei 37°C zeigte.

5.24.2 Shuffle Stamm

Für den Screen mit dem shuffle Stamm wurde ein großer Ansatz des Stammes RJY1968 mit der Genbank (RJP2) transformiert und mit den Bedingungen der Test Transformation auf 20 Platten (a 300 Kolonien) auf 5'-FOA selektioniert und bei 25°C für 3-4 Tage inkubiert. Die Kontrolle wurde mit dem leeren Vektor () durchgeführt und die Transformanden auf 5'-FOA bei 25°C selektioniert (Test auf 5'-FOA resistente Kolonien). Von den 20 Platten wurden dann die wachsenden Kolonien auf eine neue 5'-FOA Platte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Flüssigkulturen angesetzt und die Plasmide wie unter wie unter 5.16 beschrieben isoliert, in *E. colis* transformiert und anschließend isoliert. Durch einen Restriktionsverdau wurde das Restriktionsmuster überprüft und einige Plasmide mit den Oligos RJO166 cccgactggaaagcgggcag und RJO167 ggagaaaataccgcatcaggc

sequenziert.

5.25 Mating, Sporulation und Tetradenanalyse

Durch die Verpaarung von haploiden Hefezellen des entgegengesetzten Paarungstypes können Stämme mit neu kombinierten genetischen Eigenschaften hergestellt werden. Außerdem kann diese Methode für analytische Zwecke eingesetzt werden (z.B. für genetische Interaktion). Zu diesem Zweck wurden die zu verpaarenden Stämme frisch ausgestrichen und am nächsten Tag eine Impfösespitze von jedem auf einer YEPD-Platte vermischt. Alle 2 h wurde mit dem Mikroskop überprüft, ob sich bereits Zygoten gebildet haben. War dies der Fall, wurden die Zellen mit Wasser gemischt und anschließend mit dem Tetradenmikroskop Zygoten isoliert. Tragen die Stämme unterschiedliche Marker, wurden die Stämme in YEPD gemischt und nach ca. 6 h auf der entsprechenden Selektivplatte ausplattiert. Die Zygoten oder Kolonien auf den Selektivplatten wurden anschließend noch mal auf YEPD-Platten ausgestrichen und einen Tag später eine Impföse auf Sporulationsmedium inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurde unter dem Mikroskop nach Tetraden gesucht. Anschließend wurde eine Impföse voll Zellen in 100 µl Wasser mit 5 µl Zymolyase 20T (5 mg/ml 1 M Sorbitol) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl auf einer YEPD-Platte ausgestrichen und mit Hilfe des Tetradenmikroskops die Tetraden isoliert, wobei die einzelnen Sporen getrennt wurden. Diese Masterplatten wurden dann auf die entsprechenden Selektivplatten gestempelt, um die Verteilung der Marker zu verfolgen. Die Bestimmung des Paarungstyps erfolgt durch Stempeln auf Minimalplatten, auf denen zuvor Testerstämme (RJY361; RJY362) ausgestrichen wurden, die nur durch Verpaarung mit dem entgegengesetzten Paarungstyp wachsen können und Kolonien bilden.

5.26 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

5.26.1 Schnelle Proteinextrakte

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

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

5.26.2 Alkalische Lyse

1 ml Hefekultur des jeweiligen Zeitpunkts wurde abzentrifugiert (5 min; 4000 rpm; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) und das Zellpellet in 1 ml kaltem Wasser resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 150 µl Vorbehandlungslösung versetzt, gründlich gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 55 %-

iger TCA-Lösung, Mischen und weiteren 10 min Inkubation auf Eis, folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min; 13200 rpm; 4 °C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge). Das dabei erhaltene Pellet wurde in 40 µl HU-Puffer resuspendiert und mit wenigen Tropfen 1 M Tris/HCl pH 8,0 bei Bedarf bis zum Farbumschlag von gelb nach blau neutralisiert. Vor dem Gelauftrag wurde die Probe für 10 min bei 65 °C unter Schütteln (600 rpm; Eppendorf Schüttelheizblock) inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min; 13200 rpm; Eppendorf Mikrozentrifuge). Alternativ wurden 15 ml Hefekultur jedes Zeitpunkts eingesetzt. Die weiteren Protokollschritte zur Herstellung von Zellextrakten wurden in diesen Fällen unverändert angewendet.

- HU Puffer: 8 M Harnstoff; 5 % (w/v) SDS; 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 1 mM EDTA; 1,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
- Vorbehandlungslösung: 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 1,85 M NaOH (Die Lösung wurde für jede Anwendung frisch angesetzt)

5.26.3 Lyse mit Glasperlen

Dem WB-Lysepuffer wurden vor Verwendung 20 mM DTT, sowie OneComplete® Proteaseinhibitoren (Roche) entsprechend den Herstellerangaben zugesetzt. 10-20 ml Hefekultur wurden abzentrifugiert (5 min; 4000 rpm; 4 °C; Heraeus Multifuge). Das erhaltene Zellpellet wurde im einfachen Pelletvolumen WB-Lysepuffer resuspendiert, wobei ein Mindestvolumen von 150 µl bei zu kleinen Pellets eingesetzt wurde. Nach Zugabe des gleichen Volumens Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) (mind. 150 µl) wurden die Zellen im Vibrax-VXR (IKA) lysiert (10 min; 4 °C; maximale Einstellung). Die Glasperlen wurden im Anschluss daran durch Zentrifugation (5 min; 4000 rpm; 4 °C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) entfernt. 120 µl des Zellextrakts wurden abgenommen, mit 40 µl 4x SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und 20 µl Aliquots über SDS-PAGE und Western Blot (5.14; 5.16) analysiert.

- WB-Lysepuffer 50 mM Tris/HCl pH7,5; 1 mM EDTA; 20 mM DTT;

5.27 TCA-Fällung

Das Eluat einer Reinigung oder andere Proteinlösungen wurden mit 10-15 % Tri-Chloressigsäure (TCA) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die ausgefällten Proteine 15 min bei 13,000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Säurerückstände führen zu einer Gelbfärbung der Lösung und zu einer verminderten Löslichkeit der präzipitierten Proteine. Zu diesem Zweck wurde die Lösung mit gesättigtem Tris-Puffer versetzt, bis die Gelb- in eine Blaufärbung umschlägt. Dann wurde der Extrakt 5 min bei 95 °C aufgeköcht und für die Gelanalyse eingesetzt.

5.28 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Laemmli, 1970), werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Masse aufgetrennt. Durch das verwendete Detergenz SDS wurde dem Protein eine negative Ladung gegeben und durch Erhitzen mit DTT oder β-Mercaptoethanol denaturiert. Für kleine Gele wurde das Minigel-System Mighty Small SE260 der Firma Hoefer Scientific verwendet, für größere ein im ZMBH hergestelltes System (Gelgröße: 20 x 20 cm). Die Proben wurden vor dem Auftragen im gleichen Volumen 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min inkubiert und dadurch denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 15 mA/Gel im Sammelgel bzw. 25 mA/Gel im Trenngel bei Raumtemperatur. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit den

aufgetrennten Proteinen durch Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert oder mit Coomassie angefärbt.

Lösungen:

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

5.29 NuPAGE (Novex)

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

5.30 Western Blot

Der Proteintransfer erfolgte nach dem *Semidry* Verfahren auf PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Pharmacia) in einer Biometra *Semidry* Blot Apparatur nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde ein "Sandwich", von unten nach oben, aus drei Filterpapieren (in 1x Semi-dry Transferpuffer getränkt), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel und noch mal drei Filterpapieren aufgebaut. Die PVDF-Membran wurde zuvor kurz 3 sec in Methanol aktiviert und anschließend 1 min in H₂O gewaschen, während das SDS-Polyacrylamidgel für ca. 10 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gefläche für 2-4 h bei Raumtemperatur. Alternativ wurde auch bei 5 V-Einstellung über Nacht geblottet. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran für 5 min in 1x PBS gewaschen und dann für 30 min-1 h in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockingpuffer für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in Waschpuffer und einem weiteren in Blockingpuffer wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper 60 min inkubiert und erneut zweimal in Waschpuffer und einmal in 1x PBS gewaschen. Der indirekte Nachweis der Proteine erfolgte durch Zugabe von Chemilumineszenz-Substratlösung (2,5 ml/Blot), die von der Meerrettich-Peroxidase in ein chemilumineszentes Produkt katalysiert wird. Die Fluoreszenz wurde durch Expositionszeiten zwischen 1 min und 30 min in einer Autoradiographiekassette auf Amersham-Röntgenfilmen dokumentiert.

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

Primäre Antikörper:

- Maus-Anti-Myc, 9E10, 1:1000 verdünnt
- Ratte-Anti-HA, 3F10, 1:1000 verdünnt

- Anti-ProA, PAP, 1:5000 verdünnt (bereits HRP-gekoppelt)

Sekundäre Antikörper:

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

5.31 Coomassie-Färbung zum Nachweis von Proteinen

Mit Hilfe der Coomassie-Blaufärbung lassen sich Protein ab 200 ng pro Bande im SDS-Polyacrylamidgel direkt nachweisen. Für die Coomassie-Färbung wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach dem Lauf für 15-30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurde das Gel mit Hilfe der Entfärberlösung 2-3x für 15-20 min oder einmal über Nacht entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden.

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

5.32 Immunfluoreszenz

5.32.1 Sphäroblastierung der Zellen für die Immunfluoreszenz

Zunächst wurden Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur fixiert. Hierzu wurden 10 ml Kultur mit 3,7 % Formaldehyd versetzt und 1 h unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml Sphäroblastierungspuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 500 µl Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 50 µg Zymolyase 100,000 und 1 µl 2-Mercaptoethanol für 30 min bei 30°C sphäroblastiert. Nach der Sphäroblastierung wurden die Zellen für 3 min bei 1,000 g in der Tischzentrifuge (3000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Sphäroblastierungspuffer gewaschen und erneut für 3 min bei 1,000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl Sphäroblastierungspuffer aufgenommen. Die Zellen konnten direkt für die Immunfluoreszenz verwendet, oder bei -80°C gelagert werden.

Lösungen:

- Sphäroblastierungspuffer: 1,2 M Sorbitol, 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,4), 0,5 mM MgCl₂.

5.32.2 Immunfluoreszenz

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

wurden die primären, bzw. sekundären Antikörper in einer Blockierlösung vermischt und parallel auf die Zellen gegeben.

Lösungen:

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

Primäre Antikörper:

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

Sekundäre Antikörper (Molecular Probes):

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

5.33 Differentielle Zentrifugation

Eine 100 ml Hefekultur wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,8-1 inkubiert, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 µl Polyribosomen-Puffer (+ Protease-Inhibitoren und 1 mM PMSF) resuspendiert und mit Glaskugeln auf dem Vibrax aufgebrochen (3x 3 min aufbrechen, zwischendurch 3min auf Eis). Der Extrakt wurde dann 2 min bei 1200 g zentrifugiert, der Überstand (S1) abgenommen und erneut für 20 min bei 7000 g zentrifugiert. Der Überstand (S7) wurde abgenommen, ein 100 µl Aliquot aufgehoben und das Pellet (P7) im gleichen Volumen des Überstandes in 1x Polyribosomen-Puffer aufgenommen (100 µl Aliquot). Der S7-Überstand wurde dann bei 20000g für 30 min zentrifugiert und anschließend wieder in Überstand (S20) und Pellet (P20) getrennt, wobei das Pellet im Volumen des Überstandes in Polyribosomen-Puffer resuspendiert und ein Aliquot abgenommen wurde. Als letztes wurde der S20-Überstand bei 100000g zentrifugiert und erneut der Überstand und Pellet wie in vorherigen Zentrifugationen behandelt. Anschließend wurden die Fraktionen S1, S7, S20, S100 und S200 zusammen mit den Pellets P7, P20, P100 und P200 für die SDS-PAGE mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

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

5.34 Glycerol-Gradient (20-40 %)

Bei dem hier beschriebenen Glycerol-Gradienten handelt es sich um eine Dichtegradientenzentrifugation. Proteine werden nach ihrer Größe und Dichte aufgetrennt. Eine 100 ml Hefekultur wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,8-1 inkubiert, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 µl 2x Lyse-Puffer (+ Protease-Inhibitoren und 1 mM PMSF) resuspendiert und mit Glaskugeln auf dem Vibrax aufgebrochen (3x 3 min aufbrechen, zwischendurch 3 min auf Eis). Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 3,600 rpm wurden 500 µl des Überstandes auf den Gradienten geladen. Für die Herstellung des Gradienten von 20 % Glycerol bis 40 % wurden in SW40-Zentrifugenröhrchen 6 ml 20 % Glycerollösung mit 6 ml 40 % Glycerollösung überschichtet und bei -20°C eingefroren. Die Glycerollösungen wurden durch

Verdünnung einer 60 % Glycerollösung mit Lysepuffer hergestellt. Vor der Verwendung wurden die Gradienten langsam auf Eis aufgetaut, wodurch ein linearer Gradient entstand. Als Marker wurde ein Mix von verschiedenen Proteinen hergestellt: 400 µl Laktat-Dehydrogenase (LDH, 5 mg/ml), 200 µl BSA (10mg/ml) und 200 µl Katalase (10 mg/ml) wurden gemischt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend über Nacht und danach 4 h gegen 1x Lysepuffer dialysiert. Vom Dialysat wurden 500 µl auf den Gradienten aufgetragen. Alternativ wurde ein Gelfiltrationsstandard von Biorad in 1x Lyse-Puffer verwendet. Die Gradienten wurden bei 36,000 rpm für 24 h bei 4°C zentrifugiert und anschließend in 500 µl Fraktionen von oben beginnend abgenommen. Diese Fraktionen wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und ein Aliquot 25 µl mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

- 2x Lysepuffer: 50 mM Hepes (pH 7,4), 100 mM K-Acetat, 10 mM MgAcetat, 10 % Glycerol, 0,2 % Triton
- 20 %-Lösung: (40 ml) 13,3 ml 60% Glycerol; 20 ml 2x Lysepuffer; 6,7 ml H₂O
- 40 %-Lösung: (40 ml) 26,7 ml 60% Glycerol; 13,3 ml 2x Lysepuffer

5.35 Saccharose-Gradienten

Bei dem hier beschriebenen Saccharose-Gradienten handelt es sich um eine Dichtegradientenzentrifugation. Die Polyribosomen Analyse wurde nach (Foiani et al., 1991) durchgeführt, außer dass der unten aufgeführte Polyribosomenpuffer verwendet wurde. Die Hefekulturen (50 ml) wurden in YPD zu einer OD₆₀₀ von 0.8 wachsen gelassen. Für den Stamm RJY2776s wurde 50 ml über Nacht Kultur verwendet (OD₆₀₀ von 0.8), die Kultur anschließend aufgeteilt und 25 ml der Kultur wurden für 2 h bei 37°C inkubiert, die andere 25 ml Kultur wurde weiterhin bei 25°C kultiviert. Für Cycloheximid-behandelte Zellextrakte wurde Cycloheximid zu der Kultur in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben und die Zellen für weitere 10 min inkubiert, allen anschließend verwendeten Puffer wurde 100 µg/ml Cycloheximid zugesetzt. Wenn nichts anderes vermerkt ist wurden die Zellen mit Glasperlen für 5 min bei 4°C durch vortexen lysiert. Die Zellysate wurden 5 min bei voller Leistung zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur RNA Gehaltsbestimmung des Zellextraktes wurde die OD₂₈₀ einer 1:100 Verdünnung (10 µl Zellextrakt plus 990 µl Wasser) mittels eines Biophotometers (Eppendorf) gegen Wasser als Referenz bestimmt. Die nachfolgenden Saccharose-Gradienten (5.36.3) wurden je nach vorliegender RNA Konzentration und Menge des Zellextraktes mit 150-250 µg RNA auf den 10 ml 5-45 % oder 5-30% Saccharose-Gradient geschichtet.

- Polyribosomenpuffer: 50 mM KAc; 20 mM HEPES pH 7,6; 5 mM MgAc₂; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; OneComplete[®] Proteaseinhibitoren (Roche) laut Herstellerangaben mit oder ohne 100 µg/ml Cycloheximid

5.35.1 Formaldehydfixierung von Hefezellen und Zellaufschluss

Für Wildtyp-Zellextrakte wurden 50 ml YEPD Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8. Für sehr langsam wachsende Stämme wurde die anfängliche Vorkultur auf höhere OD₆₀₀ (0,3-0,4) angeimpft und im Fall der ts-Stämme wurden die Kulturen über Nacht bei 25°C inkubiert. Zweimal 20 ml jeder Zellsuspension wurden mit jeweils 5 g Eis in Falcon-Röhrchen (Sarstedt) abgekühlt und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 540 µl Formaldehydlösung (37 %) pro Röhrchen und gründlichem Mischen folgte die Inkubation für 1 h auf Eis. Die Ansätze wurden mit je 84 µl 3 M Glycinlösung versetzt (Gesamtkonzentration 100 mM) und abzentrifugiert

(5 min; 4000 rpm, 4°C; Heraeus Multifuge). Beide Pellets wurden in insgesamt 1 ml Polysomenpuffer resuspendiert und in einem Eppendorf tube vereinigt. Im Anschluss an diesen Waschschrift und Zentrifugation (5 min; 4000 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) wurden die Zellen in 1,3fachem Pelletvolumen Polysomenpuffer resuspendiert und mit gleichem Volumen an Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) versetzt. Die Zellyse erfolgte durch 8 mal 30 s Vortexen bei 4°C mit jeweils dazwischen liegend 30 s Pause auf Eis. Glasperlen wurden durch Zentrifugation (5 min; 4000 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) entfernt und der erhaltene Überstand durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt (10 min; 13,200 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) von Zelltrümmern befreit und auf den Gradienten geladen.

5.35.2 Abweichungen vom Standard Protokoll

Unbehandelte Zellextrakte wurden in Polysomenpuffer ohne Cycloheximid hergestellt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Zellextrakte auf den Gradienten geladen wurden um den Polyribosomen *run off* zu erleichtern. Polyribosomen Gradienten mit Antikörper behandelten Extrakten, wurden mit 300 ng oder 600 ng α -RLI1-Antikörper oder 300 ng Kaninchen-IgG für 2 h auf Eis inkubiert bevor sie auf den 5-30 % Saccharose-Gradienten aufgetragen wurden. Für Gradienten mit niedrigen Mg^{2+} wurden die Extrakte in Polysomenpuffer B hergestellt und über 5-30 % oder 5-45 % Saccharose-Gradienten in Polysomenpuffer B analysiert. Die gereinigten 80S Ribosomen wurden mit identischen Mengen (300 ng) an α -RLI1-Antikörper oder 300 ng Kaninchen-IgG für 2 h auf Eis inkubiert und über einen 5-30 % Saccharose-Gradienten analysiert. Alle Gradienten wurden wie unter 5.36.3 beschrieben weiterverarbeitet.

- Polysomenpuffer B: 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 50 mM K-Acetat, 1 mM DTT

5.35.3 Auftrennung der Saccharose-Gradienten

Zum Giessen der Gradienten wurden jeweils 5 ml 30 % oder 45 % Saccharoselösung in einem dickwandigen Polyallomer Röhrchen (Beckman Coulter) luftblasenfrei vorgelegt und vorsichtig mit 5 ml 5 % Saccharoselösung überschichtet. Die Grenzschicht zwischen den beiden Lösungen sollte dabei unverletzt bleiben. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen und für 2 h bei RT zur Ausbildung des Gradienten horizontal eben abgelegt. Nach dieser Zeitspanne wurde der Gradient erneut vorsichtig aufgerichtet und für weitere 2 h bei 4°C aufrecht gelagert. Nach Beladen mit dem zu analysierenden Gesamtzellextrakt (5.35) und sorgfältigem Austarieren wurden die Gradienten in einem auf 4°C vorgekühlten SW-40 Ti Ausschwingrotor (Beckman Coulter) in einer Ultrazentrifuge der Optima® Serie (Beckman Coulter) zentrifugiert (1,5-3 h; 38,000 rpm; 4°C; maximale Beschleunigung und Bremsung). Im Anschluss an die Zentrifugation erfolgte die Abnahme des Gradienten im 4°C Kühlraum über eine Nadel die auf den Grund des Zentrifugen-Röhrchens gesetzt wurde. Unter Zuhilfenahme einer Peristaltikpumpe P-1 (Amersham Biosciences) wurde die Saccharoselösung langsam (Pumpeneinstellung 0,7 bis 0,9) über die UV Zelle (UV-900) eines ÄKTA®fplc® Systems (Amersham Biosciences) zur Detektion der Absorption bei 254 nm (A_{254}) geleitet. Der nachgeschaltete Fraktions-Sammler Frac-950 (Amersham Biosciences) wurde so eingestellt, dass pro Gradient Fraktionen zu jeweils etwa 500 μ l erhalten wurden. 250 μ l jeder Fraktion wurden mit 750 μ l Wasser versetzt und enthaltene Proteine durch Zugabe von 150 μ l TCA (100 %) über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proben wurden im Anschluss daran abzentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4°C; kühlbare Mikrozentrifuge)

und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Pellets wurden in jeweils 50 µl 1x SDS-Auftragspuffer resuspendiert, mit wenigen Tropfen 1 M Tris/HCl, pH 8,0 neutralisiert und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden 15-20 µl jeder Probe auf ein SDS-Gel geladen. Für die *Peak* Quantifizierung wurde die Software Unicorn 5.0 (GE Healthcare) verwendet.

- Polysomenpuffer: 50 mM KAc; 20 mM HEPES pH 7,6; 5 mM MgAc₂; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; OneComplete® Proteaseinhibitoren (Roche) laut Herstellerangaben
- 5 % Saccharoselösung: 5 % (w/v) Saccharose in Polysomenpuffer (vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast); 1 mM DTT (frisch zugesetzt)
- 45 % Saccharoselösung: 45 % (w/v) Saccharose in Polysomenpuffer (vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast); 1 mM DTT (frisch zugesetzt)
- 30 % Saccharoselösung: 30 % (w/v) Saccharose in Polysomenpuffer (vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast); 1 mM DTT (frisch zugesetzt)

5.36 Co-Immunopräzipitation

Logarithmisch wachsende Zellen einer 100 ml Kultur (OD₆₀₀=1) wurden abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl 2x Breaking Buffer resuspendiert, der außerdem Protease-Inhibitoren (EDTA-Free, Roche) und 1 mM PMSF enthält. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit 200 µl Glaskugeln auf dem Vibrax durch 3 minütiges Schütteln bei 4°C und anschließender Inkubation von 3 min auf Eis. Diese Prozedur wurde 3x wiederholt. Danach wurden die Ansätze 5 min, bei 3,000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und 50 µl vom Extrakt als Total-Kontrolle für den späteren Western Blot abgenommen. Für die Immunopräzipitation wurde ProteinG-Sepharose FastFlow (Amersham) verwendet. Um unspezifische Bindung an die Sepharose zu verhindern, wurden die Proteinextrakte zunächst mit CL4B-Sepharose inkubiert (Amersham). Zu diesem Zweck wurden 400 µl CL4B-Sepharose-Beads mit 1x Breaking Puffer gewaschen und anschließend als 50:50 Slurry mit Breaking Puffer verdünnt. 500 µl Proteinextrakt wurden dann 30 min bei 4°C mit 100 µl CL4B-Slurry rotierend inkubiert. Die Beads wurden bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 5 µl 9E10 Antikörper 1 h auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die ProteinG-Sepharose mit 1x Breaking Puffer gewaschen und zu einem 50:50 Slurry verdünnt. Von diesem Slurry wurden 60µl zum Proteinextrakt-Antikörper-Gemisch gegeben und 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 1500 rpm abzentrifugiert, dreimal mit 1x Breaking Buffer (+ Protease-Inhibitoren und 1 mM PMSF) gewaschen und dann mit 30 µl 2x Laemmli-Puffer 5 min bei 95°C aufgekocht (Pellet-Extrakt). Für die Bindungsanalyse wurden dann 15 µl des Total- und 8 µl des Pellet-Extraktes aufgetragen.

- 2x Breaking Puffer: 100mM HEPES pH 7,4; 100mM KAc; 10mM MgAc; 0.2 % Triton X-100, 10 % Glycerol

5.37 TAP Reinigung

Soweit nicht anders vermerkt, wurde dem Standard- bzw. Rli1p-Lysepuffer vor Verwendung jeweils 1 mM DTT und 100-200 mM PMSF frisch zugesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis mit vorgekühlten Gefäßen und Puffern. Die TAP-Methode (Rigaut et al., 1999) erlaubt in zwei Affinitätschromatographie-Schritten eine effektive und vor allem native Reinigung ganzer Proteinkomplexe über eine TAP-markierte Untereinheit. Die hier verwendete TAP-Markierung setzt sich aus den Immunglobulin G (IgG) Bindungsdomänen des Protein A aus *Staphylococcus*

aureus, sowie einem Calmodulin bindendem Peptid (CBP) zusammen. Beide Teile sind durch eine Schnittstelle der Tobacco Etch Virus (TEV) Protease verbunden. Der TAP-Tag ist so konstruiert, dass in der ersten Affinitätschromatographie der Protein A Teil an eine IgG-Sepharosematrix binden kann. Diese Interaktion ist so stark, dass sie nach erfolgten Waschschritten unter nativen Bedingungen nur durch einen proteolytischen Schnitt der Markierung durch die TEV-Protease gelöst werden kann. Übliche Methoden zum Lösen einer Protein A-IgG Interaktion (Denaturierung bzw. sehr niedriger pH-Wert) vertragen sich nicht mit einem nativen Reinigungsprotokoll, bei dem vor allem auch mögliche Interaktionspartner erhalten bleiben sollen. Die zweite Affinitätschromatographie basiert auf der Bindung des CBP an eine Calmodulin-Matrix in Gegenwart von Ca^{2+} . Die zum Lösen der Bindung verwendete Methode mittels EGTA ist sehr mild und erhält die Proteine in ihrer nativen Konformation. EGTA chelatiert Ca^{2+} , worauf die CBP / Calmodulin Interaktion aufgrund ihrer Ca^{2+} Abhängigkeit nicht bestehen bleibt. Für alle Rli1-TAP Reinigungen wurde der Rli1p-Lysepuffer verwendet. Im Falle der eIF3 Komplexereinigung über Nip1p-TAP kam der Standardlysepuffer zum Einsatz.

5.37.1 Zellernte und Lyse

Für eine Reinigung wurden 2 l YEPD Medium des gewünschten TAP-markierten Stammes bis zu einer OD_{600} von 3,5-4,0 bei 30°C wachsen gelassen. Für den temperatursensitiven Stamm RJY2682 wurden die Zellen bei 25°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min; 4000 g) unter Verwendung des SLC-6000 Rotor (Sorvall) in einer Zentrifuge der Evolution Serie (Sorvall) geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden einmal mit Wasser gewaschen, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) überführt und abzentrifugiert (5 min; 4000 rpm). Im weiteren Verlauf folgte ein Waschschriff mit Rli1p-Lysepuffer und erneutes Abzentrifugieren (5 min; 4000 rpm;). Alternativ wurde das Zellpellet an dieser Stelle in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei -20°C gelagert. Nach Zugabe eines Pelletvolumens Rli1p-Lysepuffer, sowie dem doppelten Pelletvolumen an Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurden die Zellen unter Verwendung einer Pulverisette® (Fritsch) lysiert (3x 4 min; 500 rpm). Glasperlen wurden über ein Sieb aus dem Zellysat entfernt und mit wenig Rli1p-Lysepuffer nachgespült. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (40 min; 20000 g; Sorvall SS-34 Rotor) um Zelltrümmer aus dem Lysat zu entfernen. An dieser Stelle kann das Lysat nach Zugabe von Glycerin auf eine Endkonzentration von 5 % in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert werden. Das Lysat wurde in diesem Fall am nächsten Tag möglichst kurz bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Für eine Nip1p-TAP Reinigung wurden 2 l YEPD Medium bis zu einer OD_{600} von 3,5-4,0 wachsen gelassen. Zellernte und Lyse erfolgten analog dem oben beschriebenen Vorgehen unter Verwendung des Standardlysepuffers oder Rli1p-Lysepuffers.

- Rli1p-Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7,5; 100 mM KAc; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,15 % (v/v) NP-40; frisch dazugeben 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren
- Standard-Lysepuffer: 100 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,15 % (v/v) NP-40; 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren

5.37.2 IgG-Sepharose Bindung und TEV Protease Spaltung

400 μl IgG Sepharose 6 Fast Flow slurry (Amersham Biosciences) (entspricht 200 μl gepackten beads) wurden 3-mal mit kaltem Lysepuffer (ohne DTT) gewaschen und dadurch äquilibriert. Die gewaschene IgG-Sepharose wurde dem Zellysat (Abschnitt 5.38.1) in einem Falcon-Röhrchen zugesetzt und für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad

inkubiert. Nach Abzentrifugieren der IgG-Sepharose (3 min; 1800 rpm) wurde der größte Teil des Überstands entfernt und die verbleibenden beads in ein Mobicol[®] (MoBiTec) überführt. Nach Anschluss des Mobicols[®] an eine 20 ml Spritze wurde mit 10 ml Lysepuffer + 0,5 mM DTT unter Einfluss der Schwerkraft bei 4°C gewaschen. Nach vollständigem Durchfluss des Puffers, wurde das Mobicol[®] am unteren Ende verschlossen, 150 µl Lysepuffer + 0,5 mM DTT, sowie 5-10 µl TEV-Protease (1 mg/ml) zugegeben. Die TEV-Protease Spaltung erfolgte auf einem Drehrad für 1,5-3 h bei 16°C. Das TEV-Eluat wurde mittels Zentrifugation (1 min; 2000 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) durch die in den Mobicols[®] eingesetzte Filtermembran von der IgG-Sepharose abgetrennt. Aliquots von 30 µl des TEV-Eluats wurden für spätere SDS-PAGE (5.29) abgenommen.

5.37.3 Calmodulin-Sepharose Bindung

500 µl Calmodulin Affinity Beads (Stratagene) (entspricht 250 µl gepackten beads) wurden 3-mal mit kaltem Lysepuffer + 2 mM CaCl₂ + 1 mM DTT gewaschen. Nach Transfer in ein Mobicol[®] Röhrchen wurden 150-200 µl Lysepuffer + 4 mM CaCl₂ sowie 150-200 µl TEV-Eluat (4.14.2) zugegeben. Während der folgenden Inkubation für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad bindet das Zielprotein an die Calmodulin Affinitätsmatrix. Nach Anschluss des Mobicols[®] an eine 20 ml Spritze wurde mit 5 ml Lysepuffer + 2 mM CaCl₂ + 1 mM DTT unter Einfluss der Schwerkraft bei 4°C gewaschen. An dieser Stelle wurde alternativ mit 20 ml Rli1p-Waschpuffer gewaschen (5.38.5).

5.37.4 Elution

Nach vollständigem Durchfluss des Waschpuffers wurde das Mobicol[®] am unteren Ende verschlossen und 600 µl Elutionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und bei 37°C auf einen Heizblock (Eppendorf) unter Schütteln (600 rpm) für 10-15 min inkubiert. Das Eluat wurde mittels Zentrifugation (1 min; 2000 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) durch die in den Mobicols[®] eingesetzte Filtermembran von den Calmodulin beads abgetrennt. Das Eluat wurde für die SDS-PAGE mit 10-15 % TCA für 15 min auf Eis gefällt und anschließend wurden die Proteinproben abzentrifugiert (15 min; 13,200 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliter-Zentrifuge), und das Pellet in 50 µl 1x SDS-Auftragspuffer resuspendiert und nach Neutralisation durch Zugabe weniger Tropfen 1 M Tris/HCl pH 8,0 durch SDS-PAGE analysiert. Zur nativen Konzentrierung wurden die Eluate der Rli1p-TAP Reinigungen mittels Zentrifugation (11000 rpm; 4°C; Eppendorf Mikroliterzentrifuge) durch Ultrafree[®]-0,5 Centrifugal Filter (Millipore) auf ein Volumen von 50-70 µl konzentriert. Die Filter wurden zuvor mit Elutionspuffer benetzt. Nach Abnahme eines 5 µl Aliquots der konzentrierten Proben für die SDS-PAGE (5.28) wurde das verbleibende Eluat nach Bestimmung der Proteinkonzentration (5.38) in die *in vitro* Translation (5.41) eingesetzt.

- Elutionspuffer 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EGTA

5.37.5 Modifizierungen des Standard Protokolls

Um eIF3-freies Rli1p-CBP aufzureinigen wurde die Calmodulin Affinitätsmatrix mit gebundenem Rli1p-CBP zusätzlich mit 20 ml Rli1p-Lysepuffer mit 1 M KAcetat gewaschen (Rli1p-Waschpuffer). Für die Rli1p-ProtA Reinigung wurde nur der erste Affinitätsschritt durchgeführt. Um den Rli1-eIF3 Komplex unter ATP-limitierenden oder RNA-limitierenden Bedingungen zu analysieren wurde Rli1p-TAP an die IgG-Sepharose gebunden, mit 20 ml Rli1p-Lysepuffer gewaschen und in 150 µl Rli1p-

Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 5 μl Apyrase (0.1 U/ μl), 1 μl Orthovanadat (200 mM), oder 5 μl RNase A (10 mg/ml) hinzugegeben und der immobilisierte Komplex für 30 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde die IgG-Sepharose mit 10 ml Rli1p-Lysepuffer gewaschen und Rli1-TAP mit TEV-Protease eluiert. 15 μl der TEV eluate wurden mit der SDS-PAGE analysiert.

- Rli1p-Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7,5; 100 mM KAc; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,15 % (v/v) NP-40; frisch dazugeben 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren
- Rli1p-Waschpuffer: 50 mM HEPES pH 7,5; 1 M KAc; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,15 % (v/v) NP-40; frisch dazugeben 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren

5.38 Bestimmung der Protein Konzentration

Der Proteingehalt von Zellextrakten (5.6.2) wurde mit Bradford-Reagenz (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für die Eluate wurde der Proteingehalt über die OD_{280} bestimmt. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung der Proteinlösung (1 μl + 99 μl Wasser) zur Bestimmung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) über ein Biophotometer (Eppendorf) eingesetzt. Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass sich der Extinktionskoeffizient (ϵ) eines Proteins in Näherung aus der Summe der ϵ -Werte seiner aromatischen Seitenketten zusammensetzt. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins lässt sich somit der molare Extinktionskoeffizient ermitteln. Bei bekanntem ϵ -Wert (für Rli1p: $\epsilon=30215 \text{ l/cm mol}$) und $\text{MW}=68336 \text{ g/mol}$) lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentration c des Proteins berechnen.

5.39 Herstellung von in vitro Translationsextrakte

Alle Arbeitsschritte erfolgten konsequent auf Eis bzw. 4°C mit vorgekühlten Gefäßen und Puffern. Die Zellextrakte wurden nach (Asano et al., 2002) hergestellt. 2 l Hefeflüssigkultur in YEPD Medium wurde über Nacht bis zu einer OD_{600} von 3 bis 5 wachsen gelassen. Zellen wurden durch Zentrifugation in einem SLC-6000 Rotor (Sorvall) in einer Zentrifuge der Evolution® Serie (Sorvall) geerntet (5 min; 4000 g; 4°C). Das Zellpellet wurde in 15 ml WCE-AM Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml WCE-AM Puffer (Zentrifugationen: 5 min; 4000 rpm; 4°C; Heraeus Multifuge). Das gewaschene Pellet wurde gewogen, in 1,5 fachem Pelletvolumen WCE-AM Puffer resuspendiert und das 6fache Pelletgewicht an Glasperlen ($\varnothing = 0,45 \text{ mm}$) zugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss daran durch 5-mal kräftiges manuelles Schütteln für 1 min mit jeweils 1 min Pause auf Eis lysiert. Der so erhaltene Zellextrakt wurde von den Glasperlen durch ein Sieb über eine Spritze abgetrennt. Auf ein Nachspülen der Glasperlen wurde an dieser Stelle verzichtet um den Zellextrakt nicht unnötig zu verdünnen. Es folgte die Zentrifugation in einem SS-34 Rotor (Sorvall) zum Entfernen der Zelltrümmer (6 min; 38000 g; 4°C; Sorvall Evolution Zentrifuge). Der Überstand wurde ohne die aufliegende Fettphase abgetrennt und unter den gleichen Bedingungen wiederholt zentrifugiert. 3 ml des so erhaltenen Zellextraktes wurden zur Entfernung kleiner Moleküle (Aminosäuren, ATP, GTP, etc.) auf eine Sephadex PD-10 Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen. Vor Gebrauch wurde die Säule mit 25 ml WCE-AP Puffer äquilibriert. Nachdem der Zellextrakt in die Säule eingesunken war, erfolgte der Säulenlauf unter Einfluss der Schwerkraft (Flussrate ca. 2 Tropfen / s) mit WCE-AP Puffer. 500 μl Fraktionen wurden gesammelt und eine 1:1000 Verdünnung (1 μl Probe + 999 μl Wasser) über eine OD_{260} Messung gegen Wasser als Referenz in einem Biophotometer (Eppendorf) auf ihren RNA Gehalt überprüft. Fraktionen mit einer A_{260}

über 90 wurden vereinigt und in Aliquots zu je 500 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der IVT-Zellextrakte erfolgte bei -80 C. Mit einem Aliquot der Extrakte wurde ein Aktivitätstest wie in Abschnitt 5.42 beschrieben durchgeführt.

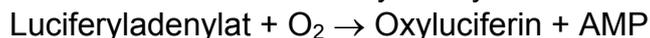
- WCE-A Puffer 30 mM HEPES pH 7,4; 100 mM KAc; 2 mM MgAc₂; 2 mM DTT (vor Verwendung frisch zugesetzt)
- WCE-AM Puffer 30 mM HEPES pH 7,4; 100 mM KAc; 2 mM MgAc₂; 8,5 % Mannitol; 2 mM DTT (frisch zugesetzt)
- WCE-AMP Puffer 30 mM HEPES pH 7,4; 100 mM KAc; 2 mM MgAc₂; 8,5 % Mannitol; 0,5 mM PMSF; 2 mM DTT (frisch zugesetzt)

5.40 In vitro Transkription

Für die Herstellung des *templates* für die *in vitro* Transkription wurde ein Plasmid-Maxi-Präparation (Qiagen) des Plasmids RJP1064 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden 30 µg in je 100 µl Restriktionsansätzen mit 1-2 µl BsrB1 über Nacht bei 37°C vollständig linearisiert. Dann wurde die DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) gereinigt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen NaAc pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und durch Zentrifugation bei 4°C für mindestens 20 min pelletiert. Das Pellet wurde dann in DEPC-behandelten H₂O resuspendiert, so dass die finale Konzentration der DNA 1 µg/µl beträgt. Für die *in vitro* Transkription mit dem AmpliCAP SP6 high yield message maker kit (Epicentre) wurde 1 µg linearisierte Plasmid DNA eingesetzt und nach Herstellerangaben transkribiert. Die RNA wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Transkription wie unter 5.17.2 beschrieben mit einem Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin RNA clean-up Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt (200-300 ng/µl) und wie unter 5.42 beschrieben verwendet.

5.41 In vitro Translation

Die hier verwendete *in vitro* Translation (Asano et al., 2002) verwendet m⁷G-Cap Luciferase-mRNA (m⁷G LUC mRNA) um die Gesamt Translationsaktivität eines Zellextraktes zu ermitteln. Die während einer bestimmten Inkubationszeit translatierte Menge an luc wird dabei luminometrisch bestimmt. Luciferase katalysiert die Luftoxidation des Substrats Luciferin zu Oxyluciferin unter Verbrauch von ATP. Diese Reaktion setzt Energie in Form von Licht frei, welches durch ein Luminometer detektiert werden kann und so Rückschlüsse über die vorliegende Menge LUC zulässt.



Für die Translationsreaktionen eines Experiments wurde ein Mastermix hergestellt. Ein 15 µl 2x Ansatz enthält dabei 1,7 µl IVT-A Puffer; 1,7 µl IVT-B Puffer; 1,3 µl Creatinphosphatkinase (4 mg/ml in 50 % Glycerol; Sigma); 0,2 µl RNasin (40 units/µl; Promega); 0,2 µl m⁷G-cap Luciferase-mRNA (200-300 ng/µl) und 4,9 µl H₂O. 15 µl des Translationsextrakts werden dazugegeben und für 20-30 min bei 26°C inkubiert. Alternativ wurde ein 10 µl 2x Ansatz verwendet mit 1,7 µl IVT-A Puffer; 1,7 µl IVT-B Puffer; 1,3 µl Creatinphosphatkinase (4 mg/ml in 50 % Glycerol; Sigma); 0,2 µl RNasin (40 units/µl; Promega); 0,2 µl m⁷G-cap Luciferase-mRNA (200-300 ng/µl) und 4,9 µl H₂O. 10 µl des Translationsextrakts werden dazugegeben und für 20-30

min bei 26°C inkubiert. Anschließend werden 15-20 µl der Reaktion in die Messung über ein Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) eingesetzt. Das dabei verwendete Programm veranlasst die Injektion von 100 µl LUC-Detektionslösung und die darauf folgende Lumineszenz-Detektion für 10 s.

- IVT-A Puffer 120 mM HEPES pH 7,4; 9 mM ATP; 1,2 mM GTP; 300 mM Creatinphosphat
- IVT-B Puffer 120 mM HEPES pH 7,4; 360 mM KAc; 24 mM MgAc₂;
- 0,5 mM Aminosäuremischung (Promega)
- LUC-Assay Puffer: 25 mM Glycylglycin (mit KOH auf pH 7,4 eingestellt), 9,2 mM K₂HPO₄, 5,8 mM KH₂PO₄, 15 mM MgSO₄; 4 mM EGTA
- LUC-Detektionslösung: 20 ml LUC-Assay Puffer; 5 ml Luziferinlösung; 300 µl ATP (0,1 M); 925 µl DTT (1 M)
- Luciferinlösung: 1 mM Luciferin; 25 mM Glycylglycin (KOH pH 7,4)

5.42 Micrococcus Nuklease Verdau

Um endogene RNA aus den *in vitro* Translationsextrakten (5.40) zu entfernen wurde zu 50 µl Extrakten 0,75 µl 50 mM CaCl₂, und 0,5-1 µl Micrococcus Nuklease (Roche; 15 U/µl) gemixt, und 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 100 mM EGTA gestoppt und die Extrakte auf Eis gestellt und anschließend in die unter 5.42 *in vitro* Translation eingesetzt.

5.43 Immundepletionen

Zur Bestimmung der Grundaktivität der verwendeten Zellextrakte (5.40) (Rli1p-HA Stamm RJY1935; Rli1p-TAP Stamm RJY2073 und Kontroll-Wildtypstamm RJY358) wurden jeweils 15 µl Extrakt entsprechend des in Abschnitt 5.42 beschriebenen allgemeinen IVT-Ansatzes eingesetzt. Für die Immundepletion wurden entweder 10-30 µl IgG-Sepharose (in WCE-A äquilibriert) oder je 40 µl gut resuspendierte IgG gekoppelte Dynabeads[®] (5.46) (entspricht ca. 20 µl gepackten beads) verwendet. Nach Abnahme des Überstandes wurden sie mit 100 µl des jeweiligen Zellextraktes (RJY2073; RJY1935 bzw. RJY358) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Abtrennen der Dynabeads[®] (Magnet; 1 min) oder der IgG Sepharose durch 2 minütige Zentrifugation bei 3,000 rpm wurden jeweils 15 µl Aliquots abgenommen und als Zellextrakt in die IVT (5.42) eingesetzt. Die Dynabeads[®] wurden in den restlichen Proben erneut resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Schema (jeweils 30 min Inkubation auf Eis) wurden insgesamt 4 weitere IVT-Messungen mit 15 µl Aliquots der Ansätze durchgeführt. Vor Inkubation der letzten Messung wurden 20 µl frische Dynabeads[®] trocken eingesetzt. Die von jedem IVT-Ansatz nach Messung im Luminometer verbleibenden 10 µl wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die in den Zellextrakten enthaltenen Mengen Rli1p bzw. Rli1p-TAP untersucht.

5.44 Kopplung von IgG an tosylaktivierte Dynabeads[®]

333 µl sorgfältig resuspendierte, tosylaktivierte Dynabeads[®] M-280 (DYNAL, Invitrogen) (30 mg/ml, entspricht 10 mg gepackten beads) wurden in einem Eppendorfgefäß mittels eines Magneten abgetrennt (4 min), der Überstand komplett abgenommen, beads in 333 µl Boratpuffer (100 mM Borat pH 9,5) resuspendiert und für 2 min äquilibriert. Nach erneutem Abtrennen der Dynabeads[®] (Magnet; 4 min) und Abnehmen des Überstands wurden 314,8 µl Borat-Puffer, sowie 18,2 µl Kaninchen IgG (11 mg/ml) (Jackson Immuno Research) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 min durch vortexen gründlich gemischt und anschließend für 24 h bei 37

C und leichter Rotation inkubiert. Während dieser Zeit reagieren N-Termini der Antikörper mit Tosyl-funktionalisierten Gruppen der Dynabeads[®]. In einer S_N² Reaktion kommt es zur kovalenten Kopplung der Antikörper über eine Aminbindung an die Matrix unter Abspaltung des Tosylrestes. Der Überstand mit ungebundenen Antikörpern wurde nach Abtrennen der Dynabeads[®] (Magnet; 4 min) komplett abgenommen und zur Ermittlung der Bindungseffizienz verwendet (siehe unten). Es folgten zwei Waschschrte mit je 333 µl PBS (mit 0,1 % (w/v) BSA). Hierbei wurden die beads in Puffer resuspendiert und für 5 min bei 4 C unter Rotation inkubiert. Im folgenden Schritt wurden die bisher nicht reagierten Stellen der beads durch BSA abgesättigt. Hierzu wurden beads in 333 µl Trispuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,5; 0,1 % (w/v) BSA) resuspendiert und für 24 h bei 20 C inkubiert. Nach Abtrennen der Dynabeads[®] (Magnet; 4 min) folgte ein letzter Waschschrte mit 333 µl PBS (mit 0,1 % (w/v) BSA) wie oben beschrieben. Fertige IgG-Dynabeads[®] wurden in 333 µl PBS (mit 0,1 % (w/v) BSA und 0,02 % NaN₃) resuspendiert und bis zum weiteren Einsatz bei 4° C gelagert. Zur Berechnung der Bindungseffizienz von IgG wurde die OD₂₈₀ des Überstandes nach der Kopplung in einen Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Die eingesetzten 200 µg IgG (18,2 µl bei einer Konzentration von 11 mg/ml) entsprechen dabei 0,275 A₂₈₀/ml. Die Messung ergab eine A₂₈₀ von 0,288. Dies entspricht bei einem Volumen von 333 µl 0,096 A₂₈₀/ml. Hieraus ergibt sich eine Kopplungseffizienz von 65,1 %, da sich nach der Kopplung noch 34,9 % der ursprünglich eingesetzten IgG Moleküle im Überstand befanden.

5.45 Reinigung der TEV-Protease

Die Zellen (*E. coli* Datenbank RJB #48/49) wurden mit 5% einer über Nacht Kultur in 1 l LB mit Chloramphenicol (34mg/ml in EtOH 1:1000) und Kanamycin (25mg/ml 1:1000) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀=0.7 bei 37°C inkubiert, bevor die Kultur für 30 min bei 24°C abgekühlt wurde. Die Induktion erfolgte mit 0,5mM IPTG für 3 h bei 24°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10min 5.000rpm) und in 25 ml TEV-Puffer/250 ml Kultur eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (4-mal 20s bei 90 %), die Zellysate wurden anschließend für 15 min bei 15,000 rpm und 4°C abzentrifugiert. 400µl Talon-bead Suspension/250ml Kultur wurde mit 2-mal 5ml TEV-Puffer äquilibriert und zur Bindung der HIS-markierten TEV Protease für 2 h bei 4°C mit dem klaren Lysat inkubiert. Das Säulenmaterial wurde dann 2-mal mit 5ml TEV-Puffer und einmal mit 5 ml TEV-Puffer + 1 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 x 1 ml TEV-Puffer + 10 mM Imidazol (E10), 2 x 1 ml TEV-Puffer + 50 mM Imidazol (E50), 2 x 1 ml TEV-Puffer + 150 mM Imidazol (E150-1) und mit 2 x 1 ml TEV-Puffer + 150 mM Imidazol (E150-2). Anschließend wurden die Eluate mit einem SDS-PAGE auf die vorhandene Menge an TEV-Protease (25 kDa) überprüft. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden dann vereinigt und für die TAP-Reinigung mit 1 l Dialyse-Puffer A über Nacht bei 4°C dialysiert. Für die TEV-Protease, die für die *in vitro* Translation verwendet wurde, wurde der Dialyse-Puffer B verwendet.

- TEV-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.2; 150 mM NaCl; 2 mM β-Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0.03 % NP40; 1mM PMSF
- Dialyse-Puffer A: 50 % Glycerol; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 5 mM DTT
- Dialyse-Puffer B: 50 % Glycerol; 30 mM HEPES pH 7,4; 100 mM KAc; 2 mM MgAc₂; 5 mM DTT

5.46 Inaktivierung von Rli1p^{TEV1} mit TEV-Protease

50 µl Aliquots der Translationsextrakte (5.41) aus dem Stamm RJY2768 wurden in 6 Parallelansätzen mit 5 µl der TEV-Protease (Dialyse-Puffer B) vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden 6 Parallelansätze mit 5 µl des Dialyse-Puffer B inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 µl Aliquots der Translationsextrakte entnommen und in einen 10 µl 2x Translationsansatz wurde die *in vitro* Translation durchgeführt (5.43). 15 µl wurden im Luminometer gemessen, die restlichen 5 µl wurden für die Western Blot Analyse verwendet.

5.47 α -RLI1-Antikörper Reinigung

Das Serum des α -RLI1-Antikörpers wurde von Davids Technologies hergestellt und ist gegen ein C-terminales Peptid CRPRINKLDSQMDKEQKSSGN (Aminosäuren 580-599) des Rli1p gerichtet. Der Antikörper wurde nach (Harlow and Lane, 1999) Affinitäts-gereinigt.

5.47.1 Kopplung des Rli1p-Peptids

Für die Kopplung des Peptids wurden 0,24 g CNBr aktivierte Sepharose (Amersham) in 10 ml 1mM HCl resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur über Kopf rotierend inkubiert. Die Matrix wurde anschließend 3-mal mit 10 ml 1 mM HCl gewaschen. Zur Kopplung des Rli1p-Peptids wurden 1,5 mg Peptid in 3 ml Affinitätspuffer gelöst und mit der Matrix für 1,5 h bei Raumtemperatur über Kopf rotierend inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Kopplung wurde je ein 10 µl Aliquot der Peptidlösung vor und nach der Inkubation mit der Sepharose Matrix entnommen und mit einer SDS-PAGE analysiert. Nach der Kopplung wurde die Affinitätsmatrix 3-mal mit 3 ml 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl und einmal mit 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 2 h bei Raumtemperatur inkubiert oder alternativ bei 4°C über Nacht. Die Peptid-gekoppelte Sepharose wurde dann 3-mal mit 5 ml 0,1 M NaAc pH 4,0 + 0,5 M NaCl und 3-mal mit 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 + 0,5 M NaCl gewaschen. Die Lagerung der Peptid-gekoppelten Sepharose erfolgte in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 und 10 mM NaN₃ oder wurde gleich verwendet wie unter 5.50.2 beschrieben.

- Affinitätspuffer: 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF

5.47.2 Affinitätsreinigung des Serums

Für die Affinitätsreinigung des Serums wurde die Peptid-gekoppelte Sepharose wie folgt äquilibriert:

- 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5
- 10 ml 100 mM Glycin-HCl pH 2,5
- 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8
- 10 ml 100 mM Na-Phosphat pH 11,5
- 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Dann wurde die Säule mit dem Serum beladen, dazu wurden 4 ml Serum, 16 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 µl 200 mM PMSF, 40 µl 0,5 M EDTA pH 8,1 und 80 µl 0,5 M EGTA pH 8,0 vermischt und mindestens 4-mal über die Säule gegeben (4 h). Dann wurde die Säule mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl gewaschen. Dann erfolgte die Elution unspezifisch gebundener IgG mit 10 ml 100 mM Citrat/NaOH pH 4,0. Die Elution des α -RLI1-Antikörpers erfolgte mit 100 mM Glycin pH 2.5 in 3 mal 1 ml Schritten. In die erste 1 ml Fraktion wurde 160 µl 1 M Tris, in die zweite 100 µl 1M Tris und in die dritte 70 µl

Tris zur Neutralisierung dazugegeben. Mit pH Stäbchen wurde der pH Wert überprüft und lag bei ca. pH 8,0. Diese drei Fraktionen des gereinigten Antikörpers wurden dann wie unter 5.48 beschrieben auf ihre Funktionalität überprüft, meist war nur die erste Eluat-Fraktion in der durchgeführten Immunoinhibition aktiv. Die Konzentration des Antikörpers wurde nach der Reinigung mit Bradford gemessen und betrug 30-50 ng/µl. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit 20 µl Zellextrakt eines WT-Stamms (äquivalent von 110 A_{280nm} Einheiten) in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50) und 5 µl eines Zellextrakts von *RLI1-3xHA* Stamm (äquivalent von 230 A_{280nm} Einheiten) bestimmt. Für die Western Blot Analyse wurde eine 1:5000 Verdünnung des gereinigten α-RLI1-Antikörpers verwendet.

- Bindepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA
- EB/Tris: 100 mM Glycin-HCl pH 2.5 neutralisiert mit 1 M Tris

5.47.3 Regenerierung der Peptid-gekoppelte Sepharose

Zur Wiederverwendung der Säule wurden die noch gebundenen Antikörper mit 7 ml 100 mM Glycin-HCl pH 2.5 und mit 10 ml 100 mM Na-Phosphat pH 11,5 entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 10 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 0,05 % NaN₃ gewaschen und in 10 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5 + 0,05 % NaN₃ aufbewahrt.

5.48 Immunoinhibition

Für die Immunoinhibition wurden 40 µl der *in vitro* Translationsextrakte (5.41) eines WT-Stamms (RJY358) verwendet und mit 10-12 µl Puffer EB/Tris (5.51.2), 10-12 µl α-RLI1-Antikörper (30-50 ng/µl) oder gereinigte Kaninchen-IgG (30-50 ng/µl) in Puffer EB/Tris vermischt, so dass eine finale Konzentration des Antikörpers/IgG von 8 ng/µl erreicht wurde. Die Ansätze wurden für 2 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde von 10 µl des Translationsextrakts die Translationsaktivität bestimmt (5.43).

5.49 Komplementationsexperiment

Für das Komplementationsexperiment wurde die Konzentration des gereinigten Rli1p-CBP (5.38.5) durch Messung der OD₂₆₀ auf 100ng/µl eingestellt. Acht Aliquots der Translationsextrakte wurden wie unter 5.52 beschrieben mit 320 ng α-RLI1-Antikörper oder 320 ng Kaninchen-IgG behandelt. Nach 2 h Inkubationszeit auf Eis wurde die erfolgreiche Immunoinhibition mit 10 µl der verschiedenen Ansätze (5.43) beschrieben überprüft. Die restlichen 30 µl wurden für 30 min mit 10 µl Schaf-anti-Kaninchen M-280 Dynabeads (Prä-äquilibriert mit WCE-A) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der α-RLI1-Antikörper und das IgG aus den Ansätzen entfernt (5 min Magnet) und die Ansätze gepoolt. 10 µl wurden verwendet um die Luciferase-Synthese zu messen. Für die Komplementation wurden je drei 15 µl Ansätze pro Proteinkonzentration gemessen. Dazu wurde ein Mastermix (5.43) ohne Wasser hergestellt. 2 µl (200 ng) und 4 µl (400 ng) gereinigtes Rli1p-CBP wurde mit 5,7 µl und 3,7 µl H₂O gemischt, 7,4 µl des Mastermixes dazugegeben und mit 15 µl Translationsextrakt (IgG oder α-RLI1-Antikörper behandelt) für 30 min bei 26°C inkubiert.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997). *Methods in yeast genetics* (New York: CSH laboratory press).
- Algire, M. A., Maag, D., Savio, P., Acker, M. G., Tarun, S. Z., Jr., Sachs, A. B., Asano, K., Nielsen, K. H., Olsen, D. S., Phan, L., et al. (2002). Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *Rna* 8, 382-397.
- Andersen, C. B., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J. S., Spahn, C. M., et al. (2006). Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* 443, 663-668.
- Andersen, D. S., and Leever, S. J. (2007). The essential *Drosophila* ABC domain protein, pixie, binds the 40S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. *J Biol Chem*.
- Asano, K., Phan, L., Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Gomez, E., Hannig, E. M., Nika, J., Donahue, T. F., Huang, H. K., and Hinnebusch, A. G. (2002). Analysis and reconstitution of translation initiation in vitro. *Methods Enzymol* 351, 221-247.
- Barthelme, D., Scheele, U., Dinkelaker, S., Janoschka, A., Macmillan, F., Albers, S. V., Driessen, A. J., Salamone-Stagni, M., Bill, E., Meyer-Klaucke, W., et al. (2007). Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J Biol Chem*.
- Bauer, B. E., Wolfger, H., and Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 217-236.
- Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., and Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* 270, 13308-13317.
- Bisbal, C., Salehzada, T., Silhol, M., Martinand, C., Le Roy, F., and Lebleu, B. (2001). The 2-5A/RNase L pathway and inhibition by RNase L inhibitor (RLI). *Methods Mol Biol* 160, 183-198.
- Browning, K. S., Gallie, D. R., Hershey, J. W., Hinnebusch, A. G., Maitra, U., Merrick, W. C., and Norbury, C. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends Biochem Sci* 26, 284.
- Chaudhuri, J., Chowdhury, D., and Maitra, U. (1999). Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* 274, 17975-17980.
- Chen, Z. Q., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A. G., and Dean, M. (2006). The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* 281, 7452-7457.
- Dente, L., Cesareni, G., and Cortese, R. (1983). pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res* 11, 1645-1655.
- Dong, J., Lai, R., Jennings, J. L., Link, A. J., and Hinnebusch, A. G. (2005). The novel ATP-binding cassette protein ARB1 is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 25, 9859-9873.
- Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C. A., Qiu, H., and Hinnebusch, A. G. (2004). The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 279, 42157-42168.

- Dooher, J. E., Schneider, B. L., Reed, J. C., and Lingappa, J. R. (2007). Host ABCE1 is at Plasma Membrane HIV Assembly Sites and Its Dissociation from Gag is Linked to Subsequent Events of Virus Production. *Traffic*.
- Estevez, A. M., Haile, S., Steinbuchel, M., Quijada, L., and Clayton, C. (2004). Effects of depletion and overexpression of the *Trypanosoma brucei* ribonuclease L inhibitor homologue. *Mol Biochem Parasitol* 133, 137-141.
- Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J., Harashima, S., and Hinnebusch, A. G. (1991). GCD2, a translational repressor of the GCN4 gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 3203-3216.
- Fraser, C. S., Berry, K. E., Hershey, J. W., and Doudna, J. A. (2007). eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol Cell* 26, 811-819.
- Fraser, C. S., Lee, J. Y., Mayeur, G. L., Bushell, M., Doudna, J. A., and Hershey, J. W. (2004). The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro. *J Biol Chem* 279, 8946-8956.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Ufano, S., and Hinnebusch, A. G. (2000). Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *Embo J* 19, 1887-1899.
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Ghaemmghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harlow, E., and Lane, D. (1999). *Using antibodies: a laboratory manual*, 1 edn (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Higgins, C. F., and Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11, 918-926.
- Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-450.
- Hinnebusch, A. G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* 31, 553-562.
- Hopfner, K. P., and Tainer, J. A. (2003). Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* 13, 249-255.

- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-4574.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jivotovskaya, A. V., Valasek, L., Hinnebusch, A. G., and Nielsen, K. H. (2006). Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Mol Cell Biol* 26, 1355-1372.
- Kamath, A., and Chakraborty, K. (1986). Protein synthesis in yeast. Purification of elongation factor 3 from temperature-sensitive mutant 13-06 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 261, 12596-12598.
- Karcher, A., Buttner, K., Martens, B., Jansen, R. P., and Hopfner, K. P. (2005). X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure* 13, 649-659.
- Kean, K. M. (2003). The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis. *Biol Cell* 95, 129-139.
- Kispaal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Rotte, C., and Lill, R. (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J* 24, 589-598.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999a). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999b). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: More tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Kolupaeva, V. G., Unbehauen, A., Lomakin, I. B., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *Rna* 11, 470-486.
- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109-1123.
- Kozak, M. (2005). A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 33, 6593-6602.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lammens, A., Schele, A., and Hopfner, K. P. (2004). Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr Biol* 14, 1778-1782.

- Leger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choismel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P. E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *Embo J* 23, 2336-2347.
- Lingappa, J. R., Doohar, J. E., Newman, M. A., Kiser, P. K., and Klein, K. C. (2006). Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem* 281, 3773-3784.
- Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. (2002). The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091-1098.
- Londei, P. (2005). Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* 29, 185-200.
- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 278, 6580-6587.
- Maurice, T. C., Mazzucco, C. E., Ramanathan, C. S., Ryan, B. M., Warr, G. A., and Puziss, J. W. (1998). A highly conserved intraspecies homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor-3 encoded by the HEF3 gene. *Yeast* 14, 1105-1113.
- Moncalian, G., Lengsfeld, B., Bhaskara, V., Hopfner, K. P., Karcher, A., Alden, E., Tainer, J. A., and Paull, T. T. (2004). The rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function. *J Mol Biol* 335, 937-951.
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111, 721-732.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* 26, 41-50.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I., and Hellen, C. U. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394, 854-859.
- Pestova, T. V., and Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16, 2906-2922.
- Phan, L., Schoenfeld, L. W., Valasek, L., Nielsen, K. H., and Hinnebusch, A. G. (2001). A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. *Embo J* 20, 2954-2965.
- Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E., and Hellen, C. U. (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* 328, 589-605.
- Preiss, T., Hentze, M. (2003). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25, 1201-1211.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Siridechadilok, B., Fraser, C. S., Hall, R. J., Doudna, J. A., and Nogales, E. (2005). Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* 310, 1513-1515.

- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-263.
- Valasek, L., Hasek, J., Nielsen, K. H., and Hinnebusch, A. G. (2001a). Dual function of eIF3j/Hcr1p in processing 20 S pre-rRNA and translation initiation. *J Biol Chem* 276, 43351-43360.
- Valasek, L., Mathew, A. A., Shin, B. S., Nielsen, K. H., Szamecz, B., and Hinnebusch, A. G. (2003). The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes Dev* 17, 786-799.
- Valasek, L., Phan, L., Schoenfeld, L. W., Valaskova, V., and Hinnebusch, A. G. (2001b). Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding. *Embo J* 20, 891-904.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-12149.
- Verge, V., Vonlanthen, M., Masson, J. M., Trachsel, H., and Altmann, M. (2004). Localization of a promoter in the putative internal ribosome entry site of the *Saccharomyces cerevisiae* TIF4631 gene. *Rna* 10, 277-286.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., and Phillippsen, P. (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1065-1075.
- Wade, C. H., Umbarger, M. A., and McAlear, M. A. (2006). The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast* 23, 293-306.
- Yarunin, A., Panse, V. G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D., and Hurt, E. C. (2005). Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *Embo J* 24, 580-588.
- Zimmerman, C., Klein, K. C., Kiser, P. K., Singh, A. R., Firestein, B. L., Riba, S. C., and Lingappa, J. R. (2002). Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415, 88-92.

Abkürzungsverzeichnis:

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CBP	<i>calmodulin binding peptide</i>
CSM	<i>complete supplement mixture</i>
C-terminal	carboxyterminal
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
EM	Elektronenmikroskopie
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
Fe-S-C	Eisen Schwefel Cluster
g	Schwerefeldbeschleunigung der Erde
Gal	Galactose
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HA	Hemagglutinin
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HCS	<i>high copy suppressor</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLH	<i>helix-loop-helix</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IVT	<i>in vitro</i> Translation
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LiAc	Lithiumacetat
LUC	Luciferase
m ⁷ Gppp	<i>5' cap (7-Methylguanylat)</i>
Met-tRNA _i ^{Met}	Initiator-Methionyl-Transfer-RNA
MFC	<i>multifactor complex</i>
MgAc ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	milimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	<i>molecular weight</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>

Abkürzungen

N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PABP	Poly-A bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Brookhaven Protein Data Base</i>
PEG	Polyethylenglykol
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
P_{GAL}	Galactose-induzierbarer Promoter
P_i	<i>inorganic phosphate</i>
PP_i	<i>inorganic diphosphate</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ProtA	Protein A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLI	RNase-L Inhibitor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
Rpl	<i>Ribosomal protein of the large subunit</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
Rps	<i>Ribosomal protein of the small subunit</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SS	<i>salmon sperm</i>
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TC	<i>ternary complex</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamid
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Ura	Uracil
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
WCE	<i>whole cell extract</i>
WT	Wildtyp
YEP	<i>yeast extract peptone</i>
YEPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

Publikationen:

Karcher, A., Buttner, K., **Märtens, B.**, Jansen, R. P., and Hopfner, K. P. (2005). X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure* 13, 649-659.

Jasiak, AJ., Armache KJ., **Märtens, B.**, Jansen, RP.; Cramer P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol. Cell* 2006 Jul 7;23(1):71-81.

Lebenslauf:

Persönliche Angaben

Name: Birgit Märtens
Anschrift: Engadinerstr.2/1, 81475 München
Geburtsdatum: 04.09.1976
Geburtsort: Ruit a.d. Fildern
Familienstand: ledig
Kinder: keine
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1983-1987 Grundschole Wolfschlugen
1987-1996 Hölderlin-Gymnasium Nürtingen
1996 Abitur

Studium und Doktorarbeit

1996-2001 Studium der Biologie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2001-2002 Diplomarbeit am Institut für Biologie II im Lehrstuhl für
Mikrobiologie II bei Prof. Dr. V. Braun mit dem Thema:
„Reinigung, Charakterisierung und Klonierung eines neuen
Hämolysins und Cytotoxin von *Pseudomonas aeruginosa*“
März 2002 Abschluss Diplom Biologie
Mai 2002-
Februar 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Max von Pettenkofer-Institut der
LMU München am Lehrstuhl für Bakteriologie bei Prof. Dr. Dr. J.
Heesemann
seit Februar 2003 Doktorarbeit im Genzentrum der LMU München in der Gruppe
von Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen mit dem Thema „ Die Funktion
der ABC-ATPase Rli1p in der Translation“
seit 2006 Doktorand des Elite-Netzwerk Bayern (ENB) „ protein dynamics
in health and disease“