

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Funktionelle Analyse des Proteins Asr1p der Bäckerhefe und ausgewählter Interaktionspartner**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2010

vorgelegt von

Thomas Fries

geboren am 25. November 1979 in Sankt Wendel

## **☐ Inhalt**

<b>A.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>I</b>
<b>B.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>IV</b>
<b>C.</b>	<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN .....</b>	<b>V</b>
<b>I.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
I.1.	Funktionelle Analyse des Proteins Asr1p der Bäckerhefe und ausgewählter Interaktionspartner .....	1
I.2.	Functional characterization of baker's yeast protein Asr1p and some of its interaction partners.....	2
<b>II.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
II.1.	Das alkoholsensitive RING/PHD-Finger Protein 1 der Bäckerhefe.....	4
II.2.	Das Ubiquitin-Proteasom System .....	5
II.2.1.	Ubiquitin.....	6
II.2.2.	Ubiquitinierung von Proteinen .....	6
II.2.3.	Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1).....	8
II.2.4.	Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2).....	9
II.2.5.	Ubiquitin Ligasen (E3) .....	10
II.2.6.	Polyubiquitinierungs-Faktoren (E4) .....	11
II.2.7.	Regulation der Ubiquitinierung .....	12
II.2.8.	Ubiquitin-bindende Proteine .....	12
II.2.9.	Das Proteasom System.....	12
II.3.	SUMOylierung .....	13
II.4.	Calmodulin.....	14
II.5.	Die RNA Polymerase II Transkriptionsmaschinerie .....	15
II.6.	Der nukleocytoplasmatische Transport .....	19
II.6.1.	Die Kernpore .....	19
II.6.2.	Die Familie der Karyopherine .....	20
II.6.3.	Der RanGTPase Zyklus .....	21
II.6.4.	Mechanismen des nukleären Imports und Exports .....	22
II.7.	Zielsetzung .....	23
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
III.1.	Material .....	25
III.1.1.	Geräte .....	25
III.1.2.	Verbrauchsmaterialien .....	27
III.1.3.	Chemikalien.....	27
III.1.4.	Enzyme und Proteine.....	28
III.1.5.	Antikörper .....	29
III.1.6.	Oligonukleotide.....	30
III.1.7.	Vektoren.....	33
III.2.	Organismen.....	38
III.2.1.	Bakterienstämme .....	38
III.2.2.	Hefestämme .....	38
III.3.	Kultivierung und Nährmedien .....	40
III.3.1.	Kultivierung von Bakterien .....	40
III.3.2.	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40

<b>III.4. Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>42</b>
III.4.1. Transformationsmethoden .....	42
III.4.1.1. Präparation CaCl <sub>2</sub> kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen .....	42
III.4.1.2. Transformation CaCl <sub>2</sub> kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen .....	43
III.4.1.3. Präparation elektrokompeter <i>E. coli</i> - Zellen .....	43
III.4.1.4. Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> - Zellen .....	43
III.4.1.5. Herstellung Lithiumacetat-kompeter Hefezellen .....	44
III.4.1.6. Transformation Lithiumacetat-kompeter Hefezellen .....	44
<b>III.5. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
III.5.1. Isolierung von DNA .....	45
III.5.1.1. Plasmid-DNA-Mini-Präparation aus Bakterienzellen.....	45
III.5.1.2. Plasmid-DNA-Midi-Präparation aus Bakterienzellen.....	46
III.5.1.3. Isolierung genomischer DNA aus Hefe .....	47
III.5.2. Bestimmung der DNA-Konzentration .....	47
III.5.3. Restriktionsverdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	48
III.5.4. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden.....	48
III.5.5. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	49
III.5.6. DNA-Präparation aus Agarosegelen.....	50
III.5.7. DNA-Präparation durch Fällung mit Natriumacetat und Ethanol .....	50
III.5.8. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	51
III.5.9. Reinigung von PCR-Produkten.....	52
III.5.10. Annealing von kurzen Oligonukleotiden.....	52
III.5.11. Ligation von DNA-Fragmenten.....	52
III.5.12. Zielgerichtete Mutagenese von Vektoren .....	53
III.5.13. Sequenzierung von DNA.....	54
<b>III.6. Biochemische Methoden .....</b>	<b>54</b>
III.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	54
III.6.1.1. Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	55
III.6.1.2. Durchführung der SDS-PAGE.....	56
III.6.1.3. Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	57
III.6.2. Western Blot.....	57
III.6.3. Die rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	59
III.6.4. Synthese und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	61
III.6.4.1. Hefe-Totallysate .....	61
III.6.4.2. Hefe-Sphäroblastierung .....	61
III.6.4.3. Affinitätsreinigung von Protein A-Fusionsproteinen aus Hefesphäroblasten .....	62
III.6.5. <i>In vitro</i> Synthese von Proteinen .....	63
III.6.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	64
III.6.7. <i>In vitro</i> Untersuchungen zu Protein-Protein Wechselwirkungen.....	64
III.6.7.1. Pulldown-Assay .....	64
III.6.7.2. Peptid SPOT Array .....	65
III.6.8. <i>In vitro</i> Ubiquitinierung von Proteinen .....	66
III.6.8.1. Test auf Autoubiquitinierung.....	66
III.6.8.2. <i>In vitro</i> Rekonstitutions Assay .....	66
<b>III.7. Proteinanalytische Methoden.....</b>	<b>67</b>
III.7.1. Massenspektrometrische Analyse .....	67
<b>III.8. Mikroskopische Methoden.....</b>	<b>68</b>
III.8.1. <i>In vivo</i> -Mikroskopie von Hefezellen.....	68
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>69</b>
<b>IV.1. Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Asr1p .....</b>	<b>69</b>
IV.1.1. Asr1p ist ein RING/PHD-Finger Protein.....	69
IV.1.2. Asr1p wird <i>in vitro</i> durch Zellysate ubiquitiniert.....	71
IV.1.3. Asr1p ist eine E3 Ubiquitin-Ligase .....	72
IV.1.4. Die Ubiquitinierung von MBP-Asr1p ist abhängig von der RING-Domäne.....	74
IV.1.5. MBP-Asr1p wird SUMOyliert.....	76

<b>IV.2. Identifizierung von Substraten der E3 Ubiquitin-Ligase Asr1p .....</b>	<b>78</b>
IV.2.1. Calmodulin als Substrat für Asr1p.....	78
IV.2.1.1. Asr1p besitzt zwei putative Calmodulin Binderegionen .....	78
IV.2.1.2. Asr1p bindet <i>in vivo</i> an Calmodulin .....	79
IV.2.1.3. Calmodulin bindet direkt an Asr1p-C in Abhängigkeit von Calcium.....	80
IV.2.1.4. Calmodulin bindet direkt an Asr1p As 243 – 280 .....	81
IV.2.1.5. Der Effekt der Calcium-Konzentration auf die Interaktion von Asr1p mit Calmodulin .....	84
IV.2.1.6. Asr1p ist eine Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase (uCaM-Synthetase).....	85
IV.2.1.7. Calmodulin besitzt vier potentielle Ubiquitinierungsstellen .....	86
IV.2.2. Die RNA Polymerase II als Substrat für Asr1p .....	89
IV.2.2.1. Massenspektrometrische Untersuchung zur Identifizierung weiterer Asr1p Substrate.....	89
IV.2.2.2. Die Asr1p C-terminale Region vermittelt die Interaktion mit der RNAPII CTD .....	91
IV.2.2.3. Vergleich der CTD-bindenden Region von Asr1p mit den Binderegionen anderer CTD-bindender Proteine.....	92
IV.2.2.4. Asr1p bindet sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form der RNAPII .....	95
IV.2.2.5. Asr1p ubiquitiniert die beiden größten Untereinheiten der RNAPII.....	97
IV.2.3. Die CTD-Phosphatase Rtr1p .....	99
IV.2.3.1. Asr1p und Rtr1p sind zusammen in einem Komplex .....	99
IV.2.3.2. Rtr1p bindet die RNA Polymerase II .....	99
IV.2.3.3. Rtr1p shuttelt konstitutiv zwischen Zellkern und Cytoplasma .....	101
<b>IV.3. Der Kernimport von Asr1p.....</b>	<b>103</b>
IV.3.1. Asr1p bildet Import-Komplexe mit einem Set von Importinen.....	103
IV.3.2. Eine kurze Sequenz innerhalb der C-terminalen Region ist ausreichend für den Kernimport von Asr1p.....	105
IV.3.3. Mutationsanalyse der Asr1p Kern-Importsequenz.....	108
IV.3.4. Die Kern-Importsequenz interagiert direkt und funktionell mit einer Reihe von Importfaktoren.....	110
IV.3.5. Der Kernimport von Asr1p wird <i>in vivo</i> durch eine Reihe von Importfaktoren bewerkstelligt.....	112
IV.3.6. Der Mechanismus des Kernimportes von Asr1p ist in Hefen konserviert.....	115
IV.3.7. Das Histon H2A und Asr1p interagieren mit dem gleichen Set von Importinen ...	117
 <b>V. DISKUSSION .....</b>	 <b>120</b>
V.1. Asr1p ist eine neue E3 Ubiquitin Ligase .....	120
V.2. Calmodulin als Substrat für Asr1p .....	123
V.3. Die RNA Polymerase II Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p als Substrate für Asr1p .....	125
V.4. Die CTD-Phosphatase Rtr1p.....	128
V.5. Asr1p beherbergt ein neuartiges Kernimport-Signal.....	129
V.6. Vorhersage der Asr1p Tertiärstruktur .....	132
V.7. Ein Modell für die Funktionsweise von Asr1p.....	133
 <b>VI. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	 <b>136</b>
 <b>VII. PUBLIKATIONEN.....</b>	 <b>147</b>
 <b>DANKSAGUNG .....</b>	 <b>148</b>
 <b>LEBENS LAUF .....</b>	 <b>149</b>
 <b>EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	 <b>150</b>

## A. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Calmodulin	<u>Calcium modulated protein</u>
CaM	Calmodulin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Ci	Curie
CID	CTD-Interagierende Domäne
CSM	Complete Supplement Mixture
CTD	Carboxyterminale Domäne der RNA Polymerase II
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2- aminoethyl)-tetraessigsäure
ERS	Energy Regeneration Solution
evtl.	eventuell
F	Farad
Fa.	Firma
g	Gramm
x g	multipliziert mit der mittleren Erdschwerebeschleunigung g (= 9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAM	Ziege anti-Maus (Goat-anti-Mouse)
gDNA	genomische DNA

## A. Verzeichnis der Abkürzungen

---

GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	kilo ( $10^3$ )
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
LB	Luria Broth
LiT	Lithiumacetat-Tris-Puffer
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar, Mol pro Liter
MBP	Maltose-Bindeprotein
MG132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (Proteasom Inhibitor)
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger (Boten)-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
n	nano ( $10^{-9}$ )
NES	Kernexportsignal (Nuclear Export Signal)
NLS	Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal)
NPC	Kernporenkomplex (Nuclear Pore Complex)
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline; Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PHD	Plant Homeodomain
PIC	Prä-Initiationskomplex
POD	Peroxidase
ProtA	Protein A
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA Polymerase II

## A. Verzeichnis der Abkürzungen

---

RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	Synthetic Dextrose Complete
SDS	Sodiumdodecylsulfate
sog.	so genannt
STUbls	<u>S</u> UMO- <u>t</u> argeted <u>u</u> biquitin- <u>l</u> igases
SUMO	<u>S</u> mall <u>u</u> biquitin-like <u>m</u> odifier
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit, relative Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UBD	Ubiquitin-bindende Domäne
Ubl	<u>U</u> biquitin- <u>l</u> ike protein
UE	Untereinheit(en)
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
z.B.	zum Beispiel
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight per volume)
% (v/v)	Volumenprozent (volume per volume)

## B. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1	Schematische Darstellung von Asr1p und seinen Domänen .....	5
Abb. 2	Ubiquitin und Arten der Ubiquitinierung .....	7
Abb. 3	Mechanismus der Ubiquitinierung .....	10
Abb. 4	Struktur des 26S Proteasoms .....	13
Abb. 5	Struktur von Calmodulin .....	15
Abb. 6	Mechanismus der Transkription .....	18
Abb. 7	Schematische Darstellung einer Kernpore .....	19
Abb. 8	Regulation des Gsp1pGTP/GDP-Gradienten .....	22
Abb. 9	Schematische Darstellung der nukleocytoplasmatischen Transportprozesse durch Kernporen .....	23
Abb. 10	Asr1p besitzt eine RING- und eine PHD-Finger Domäne .....	70
Abb. 11	Asr1p wird durch Zelllysate ubiquitiniert .....	72
Abb. 12	Asr1p beherbergt E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität .....	73
Abb. 13	Asr1p wird in Abhängigkeit von der RING-Finger Domäne ubiquitiniert .....	75
Abb. 14	Asr1p wird <i>in vitro</i> SUMOyliert .....	77
Abb. 15	Asr1p besitzt zwei putative Calmodulin Binderegionen .....	79
Abb. 16	Asr1p interagiert mit Cmd1p <i>in vivo</i> .....	80
Abb. 17	Asr1p interagiert mit Cmd1p in Ca <sup>2+</sup> -abhängiger Weise .....	81
Abb. 18	Asr1p As 243 – 280 interagiert direkt mit Calmodulin .....	83
Abb. 19	Asr1p bindet bei physiologischen Calcium-Konzentrationen an Calmodulin .....	85
Abb. 20	Asr1p ist eine Ubiquityl-Calmodulin Synthetase .....	86
Abb. 21	Mutation der potentiellen Cmd1p Ubiquitinierungsstellen .....	88
Abb. 22	Massenspektrometrische Analyse von Asr1p .....	90
Abb. 23	Asr1p-C interagiert <i>in vivo</i> mit der CTD .....	92
Abb. 24	Homologievergleich der CID aus Pcf11p der Bäckerhefe und des Menschen mit Asr1p As 233 – 310 .....	94
Abb. 25	Asr1p assoziiert mit unterschiedlichen Phosphorylierungsformen der RNAPII .....	97
Abb. 26	Asr1p ubiquitiniert Rpb1p und Rpb2p <i>in vivo</i> .....	98
Abb. 27	Rtr1p assoziiert mit der transkriptionell aktiven Form der RNAPII .....	100
Abb. 28	Rtr1p shuttelt konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern .....	102
Abb. 29	Asr1p bildet funktionale Import-Komplexe mit Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p .....	105
Abb. 30	Deletionsanalyse zur Eingrenzung der minimalen Kern-Importsequenz von Asr1p .....	107
Abb. 31	Mutationsanalyse des Asr1p Kernlokalisierungssignals .....	109
Abb. 32	Die Asr1p Kern-Importsequenz As 243 – 280 interagiert direkt und funktionell mit einer Reihe von Importfaktoren .....	111
Abb. 33	<i>In vivo</i> Analyse des Kernimports von Asr1p As 243 – 293 .....	114

Abb. 34	Der Mechanismus des Kernimports von Asr1p liegt in der Hefe konserviert vor .....	116
Abb. 35	Asr1p und H2A interagieren mit dem gleichen Set von Importinen.....	119
Abb. 36	Phylogramm der humanen E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzyme .....	121
Abb. 37	Phylogramm der <i>S. cer.</i> Importfaktoren.....	130
Abb. 38	Vorhersage der Asr1p Tertiärstruktur .....	133
Abb. 39	Modell für die Funktionsweise von Asr1p .....	134

## C. VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	<i>S. cer.</i> E2 Enzyme und die biologischen Prozesse, die sie beeinflussen .....	9
Tab. 2	<i>S. cer.</i> Karyopherine und ihre Substrate.....	20
Tab. 3	Verwendete Antikörper .....	29
Tab. 4	Verwendete Oligonukleotide .....	30
Tab. 5	Verwendete Vektoren .....	33
Tab. 6	Verwendete Bakterienstämme.....	38
Tab. 7	Verwendete Hefestämme .....	38
Tab. 8	Konzentrationen der 100 x Aminosäure-/Nukleinbase-Stammlösungen .....	41
Tab. 9	Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	55
Tab. 10	Bedingungen für die Expression der verwendeten Fusionsproteine .....	59

## **..: Zusammenfassung**



### **I.1. Funktionelle Analyse des Proteins Asr1p der Bäckerhefe und ausgewählter Interaktionspartner**

Asr1p (Alcohol sensitive RING/PHD finger 1 protein) ist ein nicht essentielles, etwa 36 kDa und 212 Aa großes, cytoplasmatisch lokalisiertes Protein der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die N-terminale Region, die auf die Aa 1 – 211 festgelegt wurde, beherbergt zwei Zink-bindende Domänen, einen RING- und einen PHD-Finger, über deren Funktion zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war. Computeranalysen sagten für die C-terminale Region, die auf die Aa 212 – 310 festgelegt wurde, keine bekannten Domänen voraus. Ursprünglich wurde Asr1p in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem Kernporenprotein Nup116p identifiziert (Bailer, unveröffentlichte Daten), was erste Hinweise auf einen Kerntransport von Asr1p gab. Zudem wurde gezeigt, dass Asr1p konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern „shuttelt“, aber nach Stress durch aliphatische Alkohole vorübergehend im Zellkern akkumuliert (Betz *et al.*, 2004; Betz, 2005). Diese Beobachtungen waren Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführte systematische Analyse der nukleocytoplasmatischen Transportprozesse von Asr1p. Eine kurze Sequenz (Aa 243 – 280) innerhalb der Asr1p C-terminalen Region ist notwendig und ausreichend für den Kernimport. Dieses Kernlokalisierungssignal liegt in der Hefe konserviert vor und kann *in vitro* direkt mit den Importrezeptoren Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p interagieren. Diese Interaktionen sind funktionell relevant, da sie auf RanGTP sensitiv reagieren. Auch *in vivo* sind diese Importine, die zum Teil redundant agieren, für den Kernimport von Asr1p notwendig. Interessanterweise vermittelt das gleiche Set von Importinen auch den Kernimport des Histons H2A. Aufgrund des Homologievergleichs von Asr1p und Histon H2A konnte ein neuartiges Kernlokalisierungssignal der Konsensussequenz [R/K]-x<sub>2</sub>-L-x<sub>n</sub>-[V/Y]-x<sub>2</sub>-[V/I]-x-[K/R]-x<sub>3</sub>-[K/R] beschrieben werden, das als Minimalsequenz von den Importinen Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p erkannt wird.

Der in der N-terminalen Region enthaltene RING-Finger ließ vermuten, Asr1p könne eine Funktion bei der Ubiquitinkonjugation besitzen. Nähere Untersuchungen bestätigten dies, so dass mit Asr1p eine neue E3 Ubiquitin-Ligase identifiziert werden konnte. Es wurde gezeigt,

dass der RING-Finger, nicht aber der PHD-Finger, die Ubiquitin-Ligase-Aktivität vermittelt. In Zusammenarbeit mit spezifischen E2 Ubiquitin-aktivierenden Enzymen und dem E1 Ubiquitin-konjugierenden Enzym katalysierte Asr1p *in vitro* seine Autoubiquitinierung.

Auf der Suche nach möglichen Substraten wurde Calmodulin als Interaktionspartner von Asr1p identifiziert. Eine kurze Sequenz innerhalb der Asr1p C-terminalen Region beherbergt zwei putative Calmodulin-bindende Motive (As 243 – 280), die notwendig und ausreichend für die Bindung an Calmodulin sind. Hierbei handelt es sich um ein IQ-Motiv und um eine basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix. Die Interaktion mit Calmodulin war direkt und fand bei physiologischen Calcium-Konzentrationen statt. Es ist schon lange bekannt, dass Calmodulin in der Hefe in Abhängigkeit von Calcium ubiquitiniert wird (Jennissen *et al.*, 1992; Hadas *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnte nun Asr1p als Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase identifiziert werden. Ein *in vitro* Rekonstitutionssystem, das aus Asr1p, dem E1 Enzym und dem E2 Enzym UbcH5a zusammengesetzt war, konnte Calmodulin der Bäckerhefe ubiquitinieren. Diese Reaktion war abhängig von einer intakten RING-Finger-Domäne. Vier vorausgesagte Ubiquitinierungsstellen innerhalb von Calmodulin wurden redundant mit Ubiquitin konjugiert.

Zur Identifikation weiterer putativer Substrate, wurden Proteine, die mit Asr1p aus Hefe co-gereinigt werden konnten, massenspektrometrisch analysiert. Darunter befanden sich mehrere Komponenten der RNA Polymerase II (RNAPII) Transkriptionsmaschinerie. Bindestudien zeigten, dass die Wechselwirkung von Asr1p mit dem RNAPII-Komplex von der C-terminalen Domäne (CTD) der größten Untereinheit Rpb1p vermittelt wird (Betz, 2005). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Asr1p die beiden größten Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p *in vivo* ubiquitiniert, wozu eine intakte RING-Finger-Domäne notwendig ist. Somit wurde Asr1p als E3 Ubiquitin Ligase identifiziert, die spezifisch die RNAPII ubiquitiniert und somit in die Transkription regulierend eingreifen kann.

### **I.2. Functional characterization of baker's yeast protein Asr1p and some of its interaction partners**

Asr1p (Alcohol sensitive RING/PHD finger 1 protein) is a non-essential, about 36 kDa and 212 amino acids (aa) long cytoplasmic protein of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The N-terminal region defined as aa 1 – 211 harbors two zinc binding domains, a RING- and a PHD-finger domain of unknown function. Computational analysis did not reveal any known domain within Asr1p C-terminal region defined as aa 212 – 310. Initially, Asr1p was identified in a yeast-two-hybrid screen with nucleoporin Nup116p (Bailer, unpublished data), indicating a possible role in nuclear transport processes. Furthermore, it was shown that Asr1p

constitutively shuttles between the nucleus and the cytoplasm, but reversibly accumulates in the nucleus during stress caused by aliphatic alcohols (Betz *et al.*, 2004; Betz, 2005). This observation gave reason to the systematic analysis, done during this work. A short sequence comprising residues 243 - 280 within the C-terminal region of Asr1p was sufficient and necessary for targeting to the nucleus. This nuclear import signal is conserved in yeast and directly interacted *in vitro* with the importins Kap114p, Kap95p, Pse1p, Kap123p and Kap104p. These interactions were sensitive to the presence of RanGTP consistent with their functionality. Furthermore, these partly redundant importins were necessary for nuclear import *in vivo*. Interestingly, the same set of importins mediated nuclear transport of histone H2A. Thus, a novel type of nuclear localization signal with the consensus sequence [R/K]-x<sub>2</sub>-L-x<sub>n</sub>-[V/Y]- x<sub>2</sub>-[V/I]-x-[K/R]- x<sub>3</sub>-[K/R] could be described which as a minimal sequence is recognized by importins Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p and Kap104p.

The RING-finger domain, found in the Asr1p N-terminal region, suggested a function of Asr1p in ubiquitin conjugation. More precise examinations corroborated this hypothesis and identified Asr1p as a novel E3 ubiquitin ligase. It was demonstrated that the RING finger but not the PHD finger harbors E3 ubiquitin ligase activity. In concert with defined E2 ubiquitin conjugating enzymes and the E1 ubiquitin activating enzyme, Asr1p catalyzed its autoubiquitination. In search of new putative substrates, Calmodulin was identified as an interaction partner of Asr1p. A short sequence within the Asr1p C-terminal region harboring two putative Calmodulin-binding motifs (residues 243 – 280) is sufficient and necessary for interaction with Calmodulin. The first one was an IQ-motif, the second one a basic amphipathic  $\alpha$ -helix. The interaction with Calmodulin was direct and dependent on physiological concentrations of Calcium. In yeast it has been known for a long time, that Calmodulin is ubiquitinated in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Jennissen *et al.*, 1992; Hadas *et al.*, 1993). In this study, Asr1p was identified as an E3 ubiquitin ligase for yeast Calmodulin. An *in vitro* reconstitution system consisting of the Asr1p E3 ligase, the E1 enzyme and the E2 enzyme UbcH5a was able to ubiquitinate Calmodulin of baker's yeast. This reaction required a functional Asr1p RING domain. Four predicted acceptor lysines within calmodulin were redundantly conjugated to ubiquitin.

For identification of further putative substrates, proteins co-purified with Asr1p from yeast were analysed by mass spectrometry. Among them were several components of the RNA polymerase II (RNAPII) transcription machinery. Binding studies showed that Asr1p contacts the RNAPII complex via the C-terminal domain (CTD) of its largest subunit Rpb1p (Betz, 2005). Further investigations demonstrated, that Asr1p required an intact RING finger domain for *in vivo* ubiquitination of the two largest subunits Rpb1p and Rpb2p. Thus, Asr1p was identified as a novel E3 ubiquitin ligase, specific for RNAPII, thereby playing a role during transcriptional regulation.

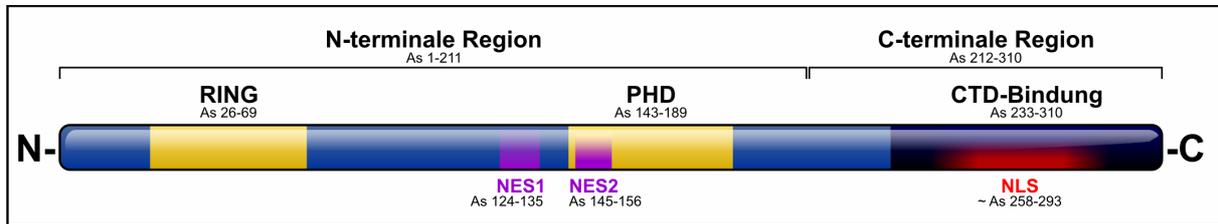
## **II. Einleitung**



### **II.1. Das alkoholsensitive RING/PHD-Finger 1 Protein der Bäckerhefe**

Das in dieser Arbeit charakterisierte Protein Asr1p (Alcohol sensitive RING/PHD finger 1 protein) ist ein etwa 36 kDa großes, nicht-essentielles Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cer.*). Das 310 Aminosäuren (As) große Protein beherbergt in seiner N-terminalen Region (As 1 – 211) eine RING (Really Interesting New Gene)- (As 26 – 69) und eine PHD (Plant Homeodomain)-Finger-Domäne (As 143 – 189). Zudem wurden innerhalb der N-terminalen Region zwei Kernexportsignale (Nuclear export signal, NES) identifiziert (Betz *et al.*, 2004). Das erste ist zwischen dem RING-Finger und dem PHD-Finger gelegen, das zweite befindet sich innerhalb des PHD-Fingers. Für die C-terminale Region (As 212 – 310) sagen Computer-Analysen keine bekannten Domänen voraus. Es wurde beobachtet, dass Asr1p als Reaktion auf aliphatische Alkohole (7,5% Ethanol, 5% 2-Propanol, 2% 1-Butanol) reversibel im Zellkern lokalisiert. Andere Stressbedingungen führten nicht zu einer Kernlokalisierung von Asr1p (Betz *et al.*, 2004). Dieser Befund und die Tatsache, dass Asr1p ursprünglich in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem Nukleoporin Nup116p gefunden wurde (Bailer, unveröffentlichte Daten), deuteten darauf hin, dass Asr1p in Kontakt mit der nukleocytoplasmatischen Transportmaschinerie stehen könnte. Tatsächlich stellte sich heraus, dass das unter Normalbedingungen cytoplasmatische Asr1p konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern „shuttelt“. Hierbei liegt das Gleichgewicht auf Seiten des Exports (Betz *et al.*, 2004). Obwohl Asr1p kein klassisches Kernlokalisierungssignal (Nuclear localization signal, NLS) aufweist, konnte ein Bereich eingegrenzt werden, der nukleären Import vermittelt (etwa As 258 – 293; Betz, 2005). In einem weiteren Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit Asr1p als Fänger wurde die C-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit Rpb1p der RNA Polymerase II als Interaktionspartner identifiziert (Betz, 2005). Dieser Befund wurde durch *in vitro* Bindeversuche mit synthetischen CTD-Heptamer-Sequenzen verifiziert (Betz, 2005) und die CTD-bindende Region innerhalb Asr1p auf die As 233 – 310 eingegrenzt (Fries, 2005). Asr1p könnte somit an der Transkriptionsregulation spezifischer Gene beteiligt sein, wobei die RNA Polymerase II finaler Effektor einer alkoholinduzierten

Signaltransduktionskaskade sein könnte. Eine schematische Darstellung von Asr1p und seiner Domänen ist in Abbildung 1 zu sehen.



**Abb. 1 Schematische Darstellung von Asr1p und seiner Domänen**

Die RING- und PHD-Finger-Domänen sind gelb, die Kernexportsignale violett, die CTD-bindende Region dunkelblau und das Kernlokalisierungssignal rot dargestellt.

## II.2. Das Ubiquitin-Proteasom System

Eukaryontische Zellen tragen fast die gesamten genetischen Informationen, die für den Bauplan eines Organismus notwendig sind, in ihrem Zellkern. Um gezielt auf äußere Einflüsse und wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren, bzw. um sich zu spezialisieren, darf jedoch nicht jedes Gen zu jedem Zeitpunkt und in jedem Gewebe exprimiert werden. Dies stellen die Zellen sicher, indem sie sich komplexer Mechanismen zur Regulation der Proteinexpression bedienen. Diese können auf unterschiedlichen Ebenen ablaufen: auf Transkriptionsebene, bei der RNA Prozessierung und -Stabilität, auf Translationsebene oder auch bei der Halbwertszeit von Proteinen. Im Laufe der Evolution haben Zellen deshalb speziell bei der Regulation des ersten Schrittes – der Transkription – zahlreiche Kontroll-Mechanismen entwickelt. Die Regulation der Transkription ist somit überaus wichtig für die Entwicklung und Lebensfähigkeit von Organismen und zudem ein Prozess, der gut verstanden sein will.

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass auch ein Mechanismus, den man ursprünglich nicht mit der Regulation der Proteinexpression in Verbindung gebracht hat, dabei eine wichtige Rolle spielen kann: die Ubiquitinierung von Proteinen. Diese posttranslationale Modifikation kann die Transkription von Genen, bzw. die Stabilität von Proteinen sowohl proteolytisch als auch nicht-proteolytisch beeinflussen (Muratani und Tansey, 2003; Conaway *et al.*, 2002). Sie kann – wie auch Phosphorylierung, Methylierung, Glykosylierung oder Acetylierung – die Lokalisation, die Aktivität, das Bindungsverhalten oder die Halbwertszeit von Proteinen beeinflussen und dadurch Einfluss auf unzählige zelluläre Prozesse nehmen.

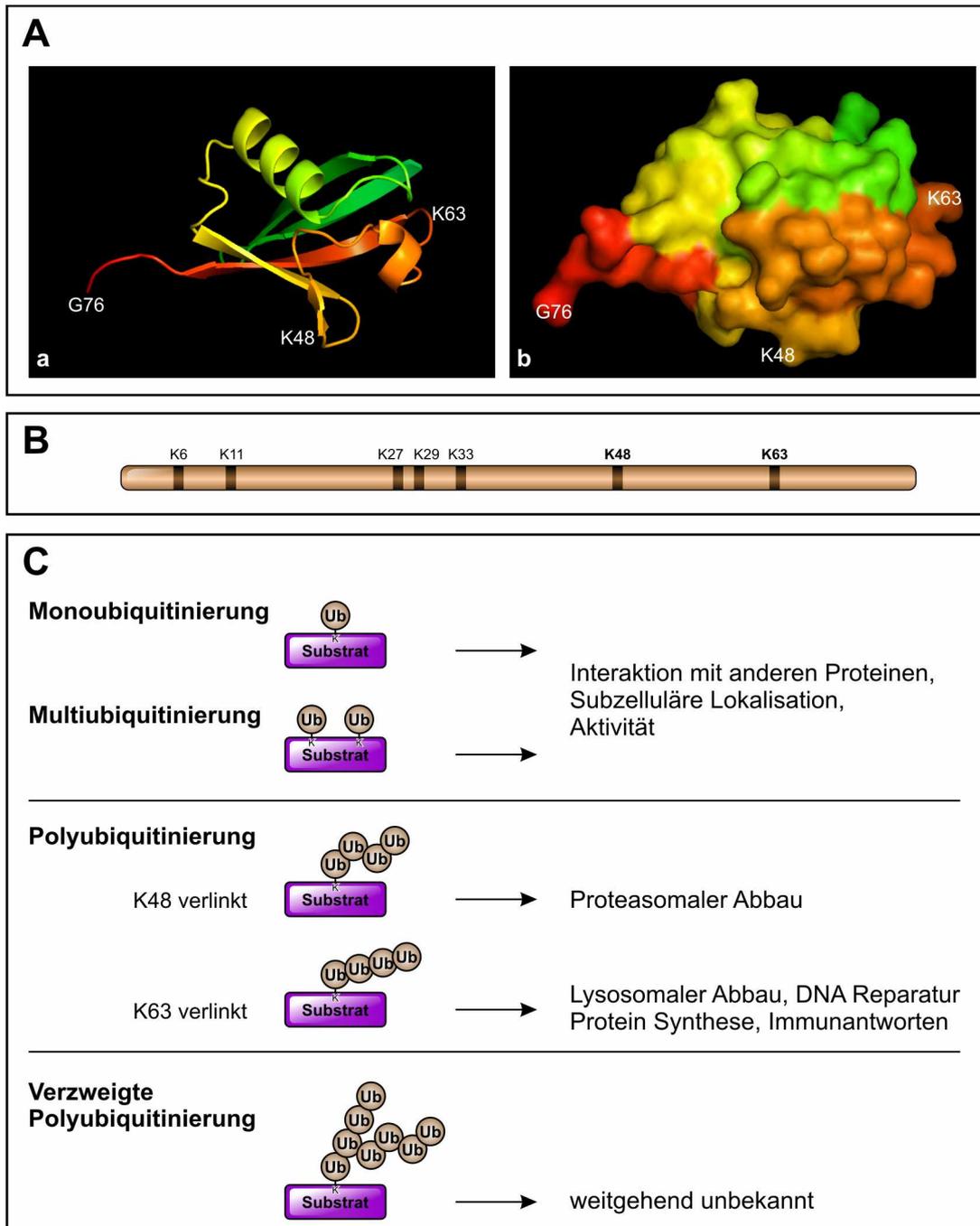
### **II.2.1. Ubiquitin**

Ubiquitin ist ein essentielles, 76 Aminosäuren großes Polypeptid, das wie der Name vermuten lässt, ubiquitär in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Es ist evolutionär stark konserviert, so unterscheidet sich Ubiquitin aus Hefe mit dem aus Menschen nur in drei Aminosäuren. Ubiquitin weist eine globuläre Struktur auf, bei der lediglich die letzten vier Aminosäuren herausragen (Abb. 2A). Es kann einzeln oder als Polyubiquitin-Kette kovalent an Lysin-Reste von Ziel-Proteinen konjugiert werden. Proteine, die durch eine Kette von mindestens vier Ubiquitinen markiert sind, werden in der Regel durch das 26S-Proteasom abgebaut. Proteine, an die einzelne Ubiquitine geknüpft sind, werden oft in ihrer Funktion verändert und beeinflussen diverse zelluläre Prozesse. Ubiquitin wird zuerst als inaktive Vorstufe synthetisiert. Diese muss zuerst an ihrer C-terminalen Region prozessiert werden, um das Glycin 76 (G76) zu exponieren, welches als Konjugationsstelle dient (Kerscher *et al.*, 2006).

### **II.2.2. Ubiquitinierung von Proteinen**

Um spezifische Signale zu erzeugen und an Effektoren weiterzuleiten, bedienen sich Zellen bei unzähligen Mechanismen der posttranslationalen Modifikation von Proteinen (Woelk *et al.*, 2007). Eine dieser Modifikationen ist die Ubiquitinierung von Proteinen. Darunter versteht man die kovalente Verknüpfung von Ubiquitin oder Ubiquitin-Ketten an Zielproteine. Hierbei wird Ubiquitin durch eine Isopeptid-Bindung mittels seines C-terminalen Glycin-Restes (G76) (Abb. 2A) mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Zielproteins verknüpft. Diese Bindung kann auch zwischen Ubiquitin-Molekülen erfolgen, was zur Bildung von Ubiquitin-Ketten führt.

Ubiquitinierung ist eine posttranslationale und reversible Modifikation. Sie wurde ursprünglich als ein Mechanismus beschrieben, der Proteine für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Heute weiß man, dass sie auch an unzähligen nicht-proteolytischen, zellulären Prozessen beteiligt ist, so z.B. Transkription, DNA Reparatur, Signaltransduktion und Proliferation. So kann Ubiquitin Einfluss auf die Lokalisation, die Aktivität, die Struktur eines Proteins und auf dessen Interaktion mit Bindepartnern nehmen (Woelk *et al.*, 2007). Man kann grob drei Arten von Ubiquitinierung unterscheiden: Mono- oder Multiubiquitinierung, Polyubiquitinierung, und die verzweigte Ubiquitinierung („branched ubiquitination“) (Abb. 2C).



**Abb. 2 Ubiquitin und Arten der Ubiquitinierung**

(A) Tertiärstruktur von Ubiquitin dargestellt als Bändermodell (a) und Oberflächenstruktur (b). Das C-terminale Glycin (G76) und die beiden funktionalen Lysin-Reste (K48 und K63) sind gekennzeichnet. Erstellt mit PyMOL v1.1 (PDB ID: 1UBQ).

(B) Verteilung der Lysin-Reste innerhalb von Ubiquitin.

(C) Darstellung unterschiedlicher Ubiquitin-Modifikationen und ihrer Funktionen.

- Bei der **Mono-** bzw. **Multiubiquitinierung** wird ein einzelner Ubiquitin-Rest auf ein bzw. mehrere Lysine des Zielproteins übertragen. Proteine die mono- bzw. multiubiquitiniert sind, werden üblicherweise nicht dem proteasomalen Abbau zugeführt, sondern variieren die Funktion des Zielproteins und regulieren somit zelluläre Prozesse (Woelk *et al.*, 2007).

- Ubiquitin selbst hat sieben Lysin-Reste, die als Akzeptor für die Verknüpfung mit weiteren Ubiquitin-Resten dienen können (Abb. 2B). Bei der **Polyubiquitinierung** werden Ubiquitin-Ketten, bestehend aus mindestens vier Ubiquitin-Resten, an das Zielprotein geknüpft. Diese Ketten können durch verschiedene Lysine des Ubiquitins verknüpft sein. Sind die Ubiquitin-Reste über Lysin 48 (K48) verlinkt, dient sie als Markierung für den proteasomalen Abbau. Eine Verlinkung durch andere Lysine (z.B. K63) reguliert in der Regel die Funktion und Verteilung der Proteine. K63 verlinkte Ubiquitin-Ketten erzeugen Signale, die eine Rolle bei der DNA-Reparatur, der transkriptionellen Regulation, der Endozytose und der Aktivierung von Protein-Kinasen spielen (Olzmann *et al.*, 2007; Woelk *et al.*, 2007). K6, K11, K27, K29 und K33 verlinkte Ubiquitin-Ketten tauchen *in vivo* zwar auf, über deren Funktion ist allerdings kaum etwas bekannt (Woelk *et al.*, 2007).
- Auch über die Funktion der **verzweigten („branched“) Ubiquitinierung** ist nicht viel bekannt. Hierbei tritt eine Verzweigung der Ubiquitin-Ketten auf, da die Ubiquitine untereinander über verschiedene Lysin-Reste miteinander verknüpft sein können. Diese Modifikation dient wahrscheinlich nicht der proteasomalen Degradation (Kim *et al.*, 2007).

An der Ubiquitinierung sind im Wesentlichen drei Enzyme beteiligt: das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2s) und Ubiquitin-Ligasen (E3s).

### II.2.3. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1)

In fast allen Organismen, so auch beim Menschen und der Bäckerhefe, existiert nur ein einziges, essentielles Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1 (UBA1 der Hefe). Die Aktivierung des Ubiquitins beginnt mit der Bindung von MgATP und Ubiquitin an E1, woraus eine Ubiquitin-Adenylat Vorstufe entsteht. Diese fungiert wiederum als Ubiquitin-Donor für ein Cystein im aktiven Zentrum des E1s. So trägt jedes voll beladene E1 zwei, über deren C-Termini verknüpfte, Ubiquitin-Reste: einen als Thiolester, einen als Adenylat. Man nimmt an, dass die Bindung von ATP an E1 dessen Konformation und somit dessen Affinität für Ubiquitin beeinflusst. Das so aktivierte Ubiquitin kann nun auf ein E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym transferiert werden (Nalepa *et al.*, 2006; Pickart, 2001). Der Mechanismus der Protein-Ubiquitinierung ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

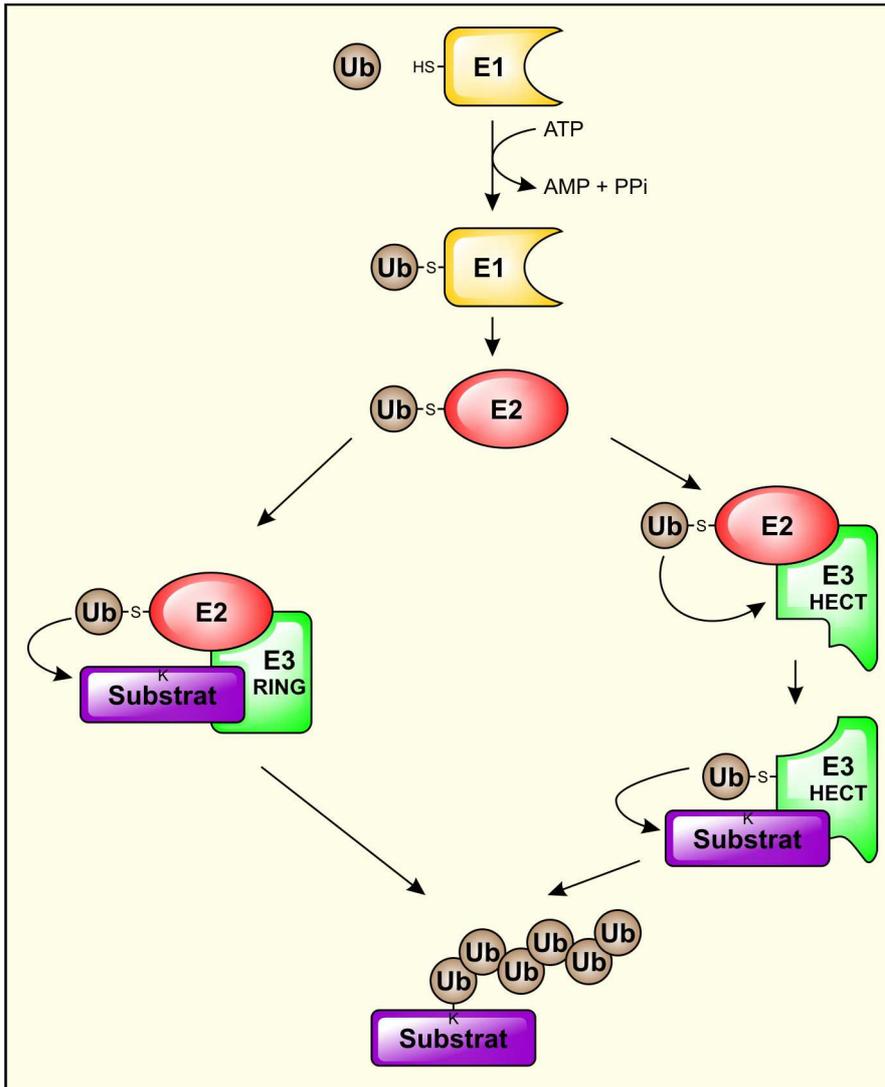
## II.2.4. Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)

Anders als bei den Ubiquitin-aktivierenden Enzymen existieren in allen eukaryontischen Organismen mehrere E2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme. So sind in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cer.*) elf E2s bekannt, in höheren Eukaryonten existieren noch zusätzliche Isoformen (Glickman und Ciechanover, 2002). Während bei den E1 Enzymen kaum etwas über den Zusammenhang von Struktur und Funktion bekannt ist, besitzen alle E2s eine etwa 150 Aminosäuren lange, konservierte Domäne. Sie unterscheiden sich jedoch durch UBC Domänen, die zur Bindung an spezifische E3 Ubiquitin-Ligasen benötigt werden. So sind sie trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit in unterschiedliche biologische Prozesse eingebunden (Pickart, 2001). In Tabelle 1 sind die E2 Enzyme der Bäckerhefe und die beteiligten Prozesse aufgelistet.

**Tabelle 1** *S. cer.* E2 Enzyme und die biologischen Prozesse, die sie beeinflussen

E2	Funktion
Ubc1p	Vesikel Biogenese, ER-assozierte Protein Degradation
Ubc2p (Rad6p)	Postreplikatorische DNA-Reparatur, Sporulation, Telomer silencing, N-end rule pathway
Ubc3p (Cdc34p)	Zellzyklus, G1/S Übergang
Ubc4p, Ubc5p	Degradation von kurzlebigen und abnormalen Proteinen, Antwort auf DNA-Schaden, Endozytose, zelluläre Stressantwort
Ubc6p	ER-assozierte Protein Degradation
Ubc7p	ER-assozierte Protein Degradation, Chromatin Organisation
Ubc8p	negative Gluconeogenese-Regulation
Ubc10p (Pas2p)	Peroxisom Biogenese und –Matrix Import
Ubc11p	unbekannt
Ubc13p	Postreplikative DNA Reparatur, K63 verlinkte Ubiquitin Ketten

E2 Enzyme dienen als Akzeptoren für das an E1 gebundene, aktivierte Ubiquitin. Dieses wird durch eine Thiolester Bindung kovalent über seinen C-terminalen Glycin-Rest (G76) an das aktive Zentrum eines E2 Enzyms gebunden. E2 Enzyme interagieren typischerweise mit einer Vielzahl verschiedener E3 Ligasen. Man glaubt, dass die Art der Ubiquitin-Verknüpfung (z.B. K48- oder K63-verknüpft) abhängig ist von den beteiligten E2 Enzymen (Christensen *et al.*, 2007).



**Abb. 3 Mechanismus der Ubiquitinierung**

Schematische Darstellung der Ubiquitinierung von Proteinen. Drei wesentliche Proteine sind zur Ubiquitinierung von Substraten notwendig: das E1 Ubiquitin-aktivierende Enzym, E2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme und E3 Ubiquitin Ligasen.

### II.2.5. Ubiquitin-Ligasen (E3)

Während bei *S. cer.* und auch beim Menschen eine kleine, definierte Anzahl unterschiedlicher E2 Enzyme existiert, gibt es unzählige E3 Ubiquitin-Ligasen. Somit kann jedes E2 mit einer Vielzahl an E3s interagieren. Hierbei sind die E3 Enzyme maßgebend für die Spezifität der Reaktion und verantwortlich für die Rekrutierung der Substrate. Es werden grob zwei Klassen von Ubiquitin Ligasen unterschieden, E3 HECT-domain Ligasen und E3 RING-Finger Ligasen.

**E3 HECT-domain Ligasen** sind in allen eukaryontischen Organismen anzutreffen. Sie sind definiert durch eine 350 Aminosäuren lange HECT-Domäne (homologous to E6-AP carboxy-terminus). Inmitten der HECT-Domäne befindet sich ein konservierter Cystein-Rest, an den Ubiquitin durch eine Thiolester Bindung verknüpft werden kann. Der variable N-terminale Bereich fungiert in der Regel als Binderegion für Substrate, während die C-terminale HECT-Domäne am direkten Transfer des gebundenen Ubiquitins auf das Substrat beteiligt ist (Glickman und Ciechanover, 2002; Pickart, 2001).

Außer einer Rolle bei der Dimerisierung war lange Zeit keine spezifische Funktion von RING-Finger Proteinen bekannt. Seit einigen Jahren haben jedoch diverse Publikationen zu der Erkenntnis geführt, dass RING-Finger Proteine eine wichtige Rolle beim Transfer von Ubiquitin auf heterologe Substrate und auch auf sich selbst übernehmen. RING-Finger sind Zink-bindende Domänen mit einem definierten Oktett an Cystein- und Histidin-Resten. Man unterscheidet RING-H2 Domänen (C3H2C3) und RING-HC Domänen (C3HC4). Im Gegensatz zu E3 HECT-domain Ligasen bindet Ubiquitin nicht direkt an **E3 RING-Finger Ligasen**. Sie initiieren lediglich den Transfer vom E2 Enzym direkt aufs Substrat. Dazu bilden sie einen Komplex mit dem entsprechenden E2 Enzym und dem Substrat. Die Bindung an E2 wird hierbei durch den RING-Finger ausgeführt, während die Bindung an das Substrat mittels variabler Bereiche vollzogen wird (Glickman und Ciechanover, 2002; Pickart, 2001). Man kann zwei Gruppen von RING-Finger E3 Ligase unterscheiden: die, die aus einer einzigen UE bestehen (single subunit) und die, die aus mehreren UE bestehen (multi subunit complexes) (Kinyamu *et al.*, 2005).

### II.2.6. Polyubiquitinierungs-Faktoren (E4)

Während im Normalfall je ein E1, E2 und E3 Enzym ausreichend für eine Polyubiquitinierung ist, werden in wenigen Fällen zusätzlich E4 Polyubiquitinierungs-Faktoren benötigt, die die Verlängerung einer Ubiquitin-Kette katalysieren. So bindet das E4 Enzym UDF2 der Hefe an oligoubiquitinierte Substrate und forciert in Zusammenarbeit mit E1, E2 und E3 Enzymen deren Polyubiquitinierung (Jackson *et al.*, 2000; Hoppe, 2005; Koegl *et al.*, 1999).

### **II.2.7. Regulation der Ubiquitinierung**

Die Funktion von E3 Enzymen muss natürlich reguliert werden, um beispielsweise eine übermäßige Degradation von Proteinen zu vermeiden. So können E3 Ligasen selbst durch Ubiquitinierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Die einfachste Möglichkeit ist hierbei die Markierung der E3 Enzyme zur Erkennung durch das Proteasom. Ein Großteil der E3 Ubiquitin Ligasen katalysiert deshalb ihre Autoubiquitinierung zusätzlich zur Ubiquitinierung ihrer Substrate. Somit führen sie sich selbst dem proteasomalen Abbau zu (Woelk *et al.*, 2007). E3 Ligasen regulieren sich gegenseitig, indem abzubauen E3 Ligasen Substrate für andere E3 Ligasen werden. Eine weitere Regulation geschieht auf nicht-destruktive Weise. So wurde beschrieben, dass für die Funktionalität der E3 Ligase Ring1B deren Ubiquitinierung notwendig ist. Bei der HECT E3 Ligase Nedd4 ist die Ubiquitinierung zur Erkennung ihrer Substrate notwendig (Woelk *et al.*, 2007). Neben der Ubiquitinierung gibt es weitere posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität von E3 Ubiquitin Ligasen regulieren können. So spielt auch die Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Auch die Modifikation mit dem „small ubiquitin-like modifier“ SUMO ist an der Regulation der E3 Ubiquitin Ligasen beteiligt (Glickman und Ciechanover, 2002; Joazeiro *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000).

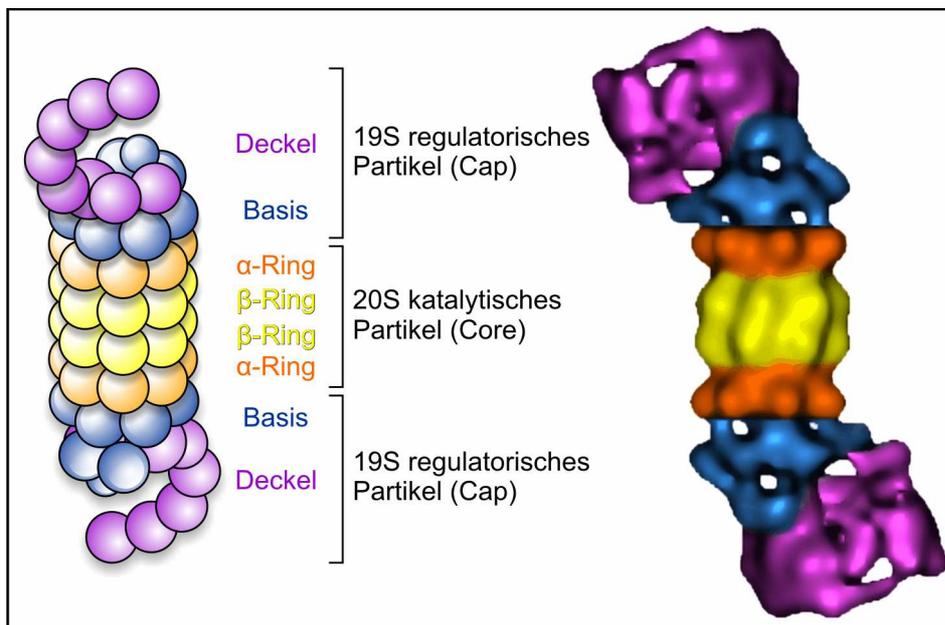
### **II.2.8. Ubiquitin-bindende Proteine**

Um eine Ubiquitinierung an Effektorproteine weiterzuleiten, müssen diese die Ubiquitinierung erkennen. Dazu besitzen sie in der Regel Ubiquitin-bindende Domänen (UBDs). So erkennen Proteine der 19S proteasomalen Untereinheit Polyubiquitin-Ketten auf Substraten und führen diese dem Proteasom zur Degradation zu (Lahm *et al.*, 2002).

### **II.2.9. Das Proteasom System**

Das Proteasom Holoenzym – auch 26S Proteasom genannt – ist ein etwa 2,5 MDa großer Protein-Komplex, der sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma wirkt. Grob gesehen besteht es aus einem 20S Kern-Partikel und zwei 19S regulatorischen Partikeln. Der 20S Kern-Partikel weist die Struktur eines Fasses auf und besitzt im zentralen Kanal mehrere Protease-Zentren. Er setzt sich aus vier Ringen zusammen, die aus jeweils 7 Untereinheiten

bestehen. Die beiden inneren Ringe bestehen aus  $\beta$ -Untereinheiten und besitzen im Inneren mehrere katalytische Zentren. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus  $\alpha$ -Untereinheiten und knüpfen an die 19S Partikel an. Diese „Kappen“ regulieren den Zugang von Substraten auf beiden Seiten des Kern-Partikels und führen diese nach Entfaltung in den Kern-Partikel ein (Glickman und Ciechanover, 2002; Jackson *et al.*, 2000; Voges *et al.*, 1999). Neben dem Abbau von abnormalen, inkorrekt gefalteten Proteinen ist die Regulation zellulärer Prozesse, z. B. des Zellzyklus, eine zentrale Aufgabe des Proteasoms. Hier reguliert es durch Abbau die Konzentration der einzelnen Cycline in jeder Phase des Zellzyklus (Reed, 2003). In Abbildung 4 ist der Aufbau des 26S Proteasoms schematisch gezeigt.



**Abb. 4**      **Struktur des 26S Proteasoms**

Schematische (links) und elektronenmikroskopische Darstellung (rechts, modifiziert nach Voges *et al.*, 1999). Die 19S regulatorische UE und die 20S katalytische UE – bestehend aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ringen – sind markiert.

### II.3.      SUMOylierung

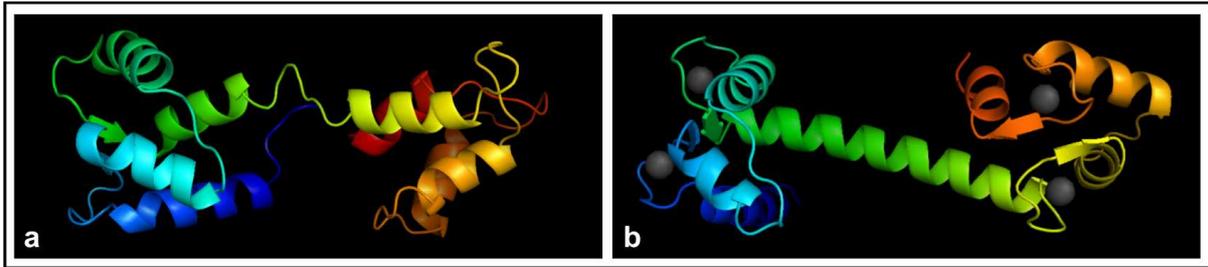
Neben der Ubiquitinierung gibt es weitere wichtige posttranslationale Modifikationen. Ein Prozess, der dem der Ubiquitinierung sehr ähnlich ist, ist die SUMOylierung von Proteinen. SUMO (small ubiquitin-like modifier) gehört zu den Ubiquitin ähnlichen Proteinen (Ubiquitin-like proteins, Ubls). Der Mechanismus der SUMOylierung ist dem der Ubiquitinierung sehr ähnlich. SUMO bindet mittels seines C-terminalen Glycin-Restes an ein E1 SUMO-aktivierendes Enzym (Aos1p/Uba1p der Hefe). Dieses transferiert das aktivierte SUMO auf

ein E2 SUMO-konjugierendes Enzym. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung ist hier in der Hefe nur ein einziges SUMO E2 Enzym bekannt, Ubc9p. Mit Hilfe einer von mehreren E3 SUMO Ligasen wird SUMO auf einen Lysin-Rest eines Substrates übertragen (Johnson, 2004). Anders als bei der Ubiquitinierung markiert SUMO Proteine nicht für den proteolytischen Abbau durch das Proteasom. SUMO variiert vielmehr die Aktivität seiner Substrate. So kann es die subzelluläre Lokalisation oder die Interaktion mit Bindepartnern beeinflussen. Viele Proteine, die SUMOyliert werden sind nukleäre Proteine, die an Transkription, Chromatinstruktur oder DNA Reparatur beteiligt sind. So reguliert SUMO in den meisten Fällen Protein-Protein Interaktionen und die Lokalisation von Proteinen (Gill, 2004).

### II.4. Calmodulin

In allen eukaryontischen Zellen wird die Konzentration an freiem Calcium im Cytosol aktiv sehr gering gehalten, obwohl sich an Plasmamembran oder intrazellulären Membranen ein sehr starker Gradient bilden kann. Nichts desto trotz spielt Calcium eine wichtige Rolle als „second messenger“ (sekundärer Botenstoff) in vielen Signaltransduktions-Prozessen (Cunningham und Fink, 1994).

Calmodulin (Calcium modulated protein) ist ein kleines  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, das ubiquitär in allen Eukaryonten vertreten ist und evolutionär stark konserviert vorliegt. Aufgrund seiner Fähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden kann es schon bei leichtem Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dieses „Signal“ an Effektorproteine weiterleiten, die selbst nicht in der Lage sind,  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden. Calmodulin besitzt vier „Helix-Loop-Helix“ EF-Hand Strukturen, zwei N-terminale und zwei C-terminale, von denen jede ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion binden kann (Abb. 5) (Houdusse *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 1980). Hefe Calmodulin (Cmd1p) unterscheidet sich vom Calmodulin der Vertebraten: es trägt eine Mutation in der C-terminalen EF-Hand, so dass Hefe Calmodulin nur drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden kann (Geiser *et al.*, 1991). Bei normalen cytosolischen Calcium-Konzentrationen liegt Calmodulin größtenteils in seiner ungebundenen Form als Apo-Calmodulin vor. Hierbei sind die beiden N-terminalen EF-Hand Strukturen durch eine flexible Linker-Region von den beiden C-terminalen EF-Händen getrennt. Bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf etwa  $10^{-5}$  M bindet Calmodulin  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und erfährt dadurch eine Änderung seiner Konformation, wobei es eine „Hantel“-Form ausbildet und hydrophobe Domänen exponiert werden, die basische, amphipathische  $\alpha$ -Helices binden. Somit kann Calmodulin sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Interaktoren binden (Ohya und Botstein, 1994; Zielinski, 1998; Cyert, 2001).



**Abb. 5 Struktur von Calmodulin**

Bändermodell von Apo-Calmodulin (a) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form von Calmodulin (b). Die grauen Kugeln stellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar. Erstellt mit PyMOL v1.1 (PDP ID: a) 1CFD, b) 1CLL).

Die Calmodulin-Binderegionen von Zielproteinen weisen oftmals sehr geringe Sequenzhomologie auf. Viele bekannte Calmodulin-bindende Proteine weisen jedoch eine etwa 16 – 35 As lange basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix auf. Auf einer Seite der Helix häufen sich hierbei hydrophobe Reste, während auf der gegenüberliegenden Seite positive Reste vermehrt sind (Zhou *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2004; Trost *et al.*, 2001). Dennoch konnten einige Sequenz-Motive, welche Calmodulin-Bindung vermitteln, identifiziert werden. Das **IQ-Motiv** wurde erstmals in Myosinen charakterisiert (Cheney und Mooseker, 1992). Die meisten IQ-Motive binden unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin. Sie besitzen die Konsensus-Sequenz [F/I/L/V]-Q- $x_3$ -[R/K]-G- $x_3$ -[R/K]- $x_2$ -[FILVWY] (Luo *et al.*, 2005). Das **1-8-14 Motiv** besteht generell aus zwei großen hydrophoben Aminosäuren, die durch 12 beliebige Aminosäuren getrennt sind, wobei sich an Position 8 oftmals ein hydrophober Rest befindet. Die Konsensus-Sequenz lautet: [F/I/L/V/W]- $x_6$ -[F/A/I/L/V/W] $x_5$ -[F/I/L/V/W] (Ahn *et al.*, 2004; Rhoads und Friedberg, 1997). Das **1-5-10 Motiv** besteht aus zwei großen hydrophoben Aminosäuren, die durch 8 andere getrennt sind, wobei sich an Position 5 oftmals ein hydrophober Rest befindet:  $x_3$ -[F/I/L/V/W]- $x_4$ -[F/A/I/L/V/W]- $x_4$ -[F/I/L/V/W] (Ahn *et al.*, 2004; Rhoads und Friedberg, 1997).

Calmodulin kann somit äußere Signale, die zu einem Calcium-Influx ins Cytosol führen, weiterleiten. Dazu bindet es in seiner Calcium-gebundenen Form an eine Reihe von Effektorproteinen. Einige Interaktoren kann Calmodulin auch unabhängig von Calcium in seiner Apo-Form binden. Calmodulin ist somit an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert.

## II.5. Die RNA Polymerase II Transkriptionsmaschinerie

Komponenten der RNA Polymerase II (RNAPII) Transkriptionsmaschinerie können Effektoren am Ende einer Signaltransduktionskaskade darstellen. Äußere Einflüsse können

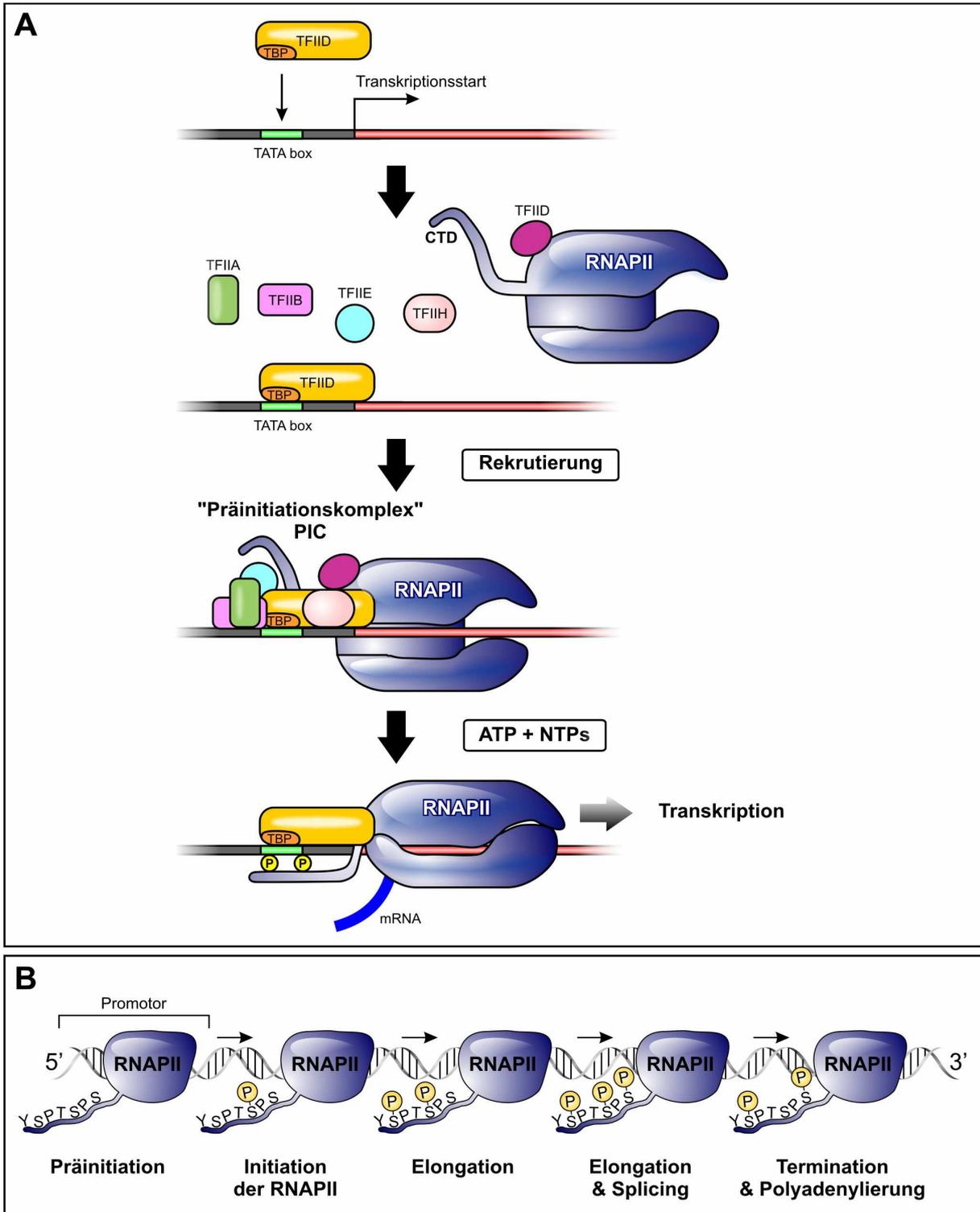
somit direkt auf die differentielle Expression spezifischer Gene Einfluss nehmen. Die Proteinexpression kann hierbei auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden. Die erste Ebene ist die Regulation durch Variation der Chromatinstruktur. Das Euchromatin ist hierbei für Komponenten der Transkriptions-Maschinerie zugänglich. Das stärker kondensierte Heterochromatin bietet der Transkriptionsmaschinerie keine Möglichkeit zur Protein-Expression. Die nächste Ebene ist die Regulation der Transkription. Hier kann die Initiation der Transkription, die Prozessierung der Transkripte, deren Transport oder deren Stabilität beeinflusst werden. Auch auf Translationsebene kann die Expression von Proteinen beeinflusst werden. Letztendlich beeinflussen posttranslationale Modifikationen die Funktion, die Topogenese und die Stabilität vieler Proteine (Smale *et al.*, 2003).

Während in Prokaryonten nur eine einzige RNA Polymerase existiert, die für die Synthese aller RNA Moleküle verantwortlich ist, treten in Eukaryonten drei unterschiedliche RNA Polymerasen auf. Die RNA Polymerase I, die sich in den Nucleoli befindet, synthetisiert Vorstufen ribosomaler RNA (rRNA). Die RNA Polymerase II (RNAPII) synthetisiert im Zellkern Vorstufen Protein-kodierender messenger RNAs (mRNAs). Die RNA Polymerase III ist v.a. für die Synthese von transfer-RNAs (tRNAs), von 5S rRNA und anderer kleiner RNAs verantwortlich. Zentraler Bestandteil bei der Transkription Protein-kodierender Gene ist der RNA Polymerase II Protein-Komplex (Egloff und Murphy, 2008). Die RNA Polymerase II der Bäckerhefe besteht aus 12 Untereinheiten, die Molekulargewichte von 220 kDa bis 6 kDa besitzen (Woychik und Hampsey, 2002). Fünf dieser 12 Untereinheiten (Rpb5p, Rpb6p, Rpb8p, Rpb10p und Rpb12p) existieren sowohl in der RNA Polymerase I und II als auch III (Singh *et al.*, 2004). Die mit 220 kDa größte Untereinheit Rpb1p besitzt eine zwischen Hefe und Säugern hoch konservierte C-terminale Domäne (CTD). Diese essentielle Struktur besteht aus sich wiederholenden Heptamer-Peptiden der Konsensussequenz  $Y^1S^2P^3T^4S^5P^6S^7$  (Hahn, 2004). In *S. cer.* wiederholen sich diese Heptamere 27 mal, bei Säugern sogar 52 mal (Corden, 1990). Unzählige Proteine binden an die CTD und nehmen dadurch Einfluss auf die Regulation der Transkription, die mRNA Prozessierung oder die Umstrukturierung des Chromatins (Gu und Lima, 2005; Bird *et al.*, 2004; Goldstrohm *et al.*, 2001; Morillon *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003).

Die RNAPII ist selbst nicht in der Lage, Promotorstrukturen oder den Transkriptionsstart zu erkennen. Dazu benötigt sie allgemeine Transkriptionsfaktoren (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH). Im Initialschritt muss zuerst der Kern-Promotor erkannt werden, der stromaufwärts des zu transkribierenden Gens liegt. In den meisten Fällen enthält dieser ein sog. TATA Element (Butler und Kadonaga, 2002). Das TATA Binding Protein (TBP) – eine Untereinheit von TFIID – erkennt im ersten Schritt das TATA Element und bindet daran (Abb.

6A). Im folgenden Schritt bindet der Transkriptionsfaktor TFIIB. Der TFIIB-TFIID-DNA Komplex kann durch Bindung von TFIIA stabilisiert werden. Ursprünglich wurde TFIIA als essentieller, allgemeiner Transkriptionsfaktor identifiziert, genauere Analysen ließen jedoch schnell auf eine Funktion als Co-Aktivator schließen (Nikolov und Burley, 1997). Anschließend wird ein Komplex aus TFIIIF und der RNAPII rekrutiert, dem die Transkriptionsfaktoren TFIIIE und TFIIH folgen. Damit ist der Präinitiationskomplex (PIC) gebildet. TFIIH besitzt als einziger Transkriptionsfaktor enzymatische Funktionen: DNA-Helikase Aktivität und CTD-Kinase Aktivität (Myer und Young, 1998). TFIIIE stimuliert die DNA-Helikase Aktivität von TFIIH, wodurch der „offene Komplex“ mit Transkriptions-„Blase“ gebildet wird. Auch die CTD-Kinase Funktion von TFIIH wird durch TFIIIE aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung der CTD und damit assoziiert zum Start des Elongationsprozesses. Die Phosphorylierung der CTD kann an verschiedenen Positionen der CTD-Heptamere erfolgen. So können sowohl Serin 2 (Ser2), Serin 5 (Ser5) und Serin 7 (Ser7) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen sind wichtig für die Regulation der Transkription. Die unphosphorylierte Form der RNAPII (RNAPIIa) wird zum Präinitiationskomplex rekrutiert (Abb. 6B). Phosphorylierung an Ser5 gleich nach der Initiation resultiert in der Rekrutierung von 5'-Capping Enzymen zur initiierten RNAPII. Zusätzliche Phosphorylierung an Ser2 führt zur Elongation und RNA-Prozessierung. Auch Ser7 wird im Laufe der Elongation phosphoryliert, über die Funktion ist jedoch nicht viel bekannt. Zum 5' Ende hin wird Ser2 dephosphoryliert, was zur Abspaltung und Polyadenylierung der mRNA, sowie zur Termination der Transkription führt. In Folge wird die RNA Polymerase II auch an Ser2 und Ser7 dephosphoryliert und dadurch recycelt. Danach steht sie für einen neuen Transkriptionszyklus bereit. Die Funktion der RNA Polymerase II wird jedoch nicht alleine durch unterschiedliche Phosphorylierungszustände der CTD reguliert. Auch Glykosylierung und Prolin-Isomerisierung sind Teil des dynamischen CTD-Codes (Egloff und Murphy, 2008).

Neben den allgemeinen Transkriptionsfaktoren spielen auch spezifische Faktoren eine Rolle bei der Regulation der Transkription. Aktivatoren bzw. Repressoren binden an Cis-regulatorische Elemente der DNA (z.B. Enhancer oder Silencer) und steuern dadurch spezifisch die Expression bestimmter Gene. Auch der Mediator-Komplex als Co-Aktivator ist *in vivo* essentiell für die Initiation der Transkription. Er ermöglicht Aktivatoren mit der RNAPII zu kommunizieren. Chromatin remodeling Faktoren können ebenfalls notwendig sein, um die DNA für die RNAPII zugänglich zu machen (Kornberg, 2007; Nikolov und Burley, 1997).



**Abb. 6 Mechanismus der Transkription**

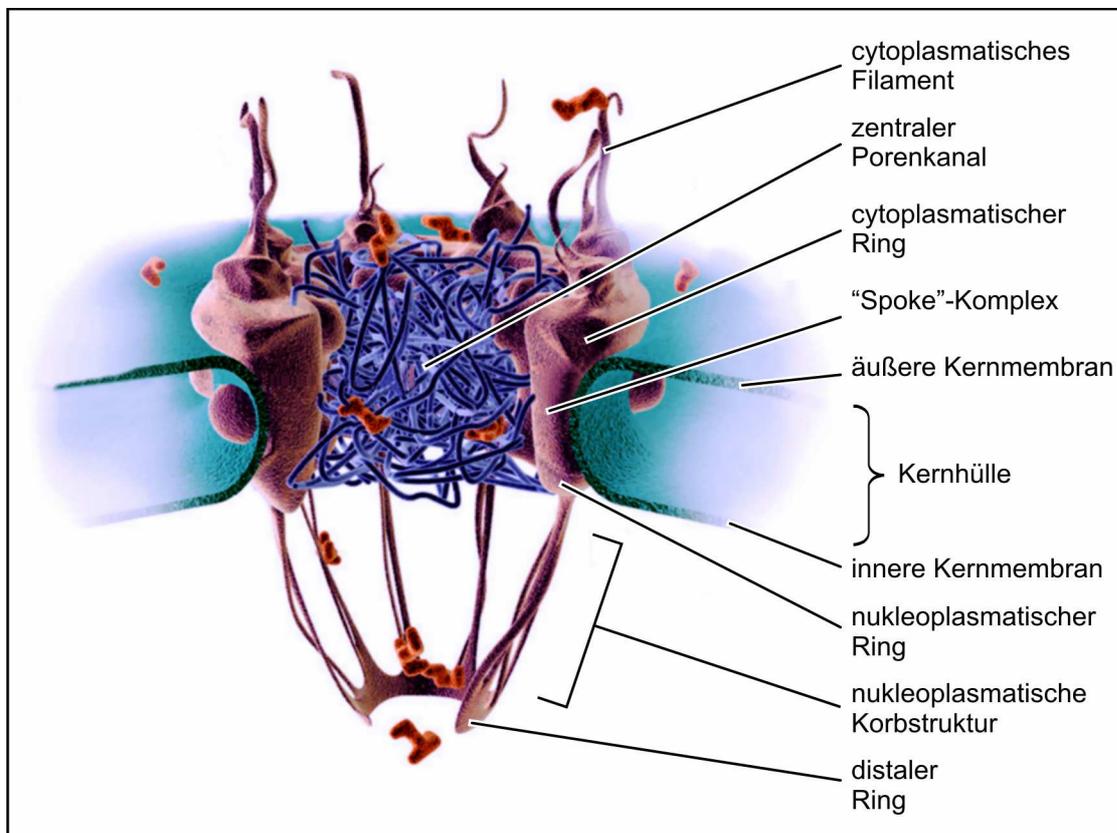
(A) Der Ablauf der Transkriptionsinitiation der RNAPII ist zusammen mit den beteiligten allgemeinen Transkriptionsfaktoren dargestellt.

(B) Die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände der RNAPII und die zugehörigen Abschnitte der Transkription sind schematisch dargestellt.

## II.6. Der nukleocytoplasmatische Transport

### II.6.1. Die Kernpore

Die Komponenten der RNAPII Transkriptionsmaschinerie sind im Zellkern tätig. Nach ihrer Biosynthese werden sie daher ins Nukleoplasma transportiert. Dieser Transport erfolgt über evolutionär konservierte Kernporenkomplexe (Nuclear Pore Complex, NPC). Sie gehören zu den größten makromolekularen Komplexen in Zellen. Die Kernporenkomplexe der Hefe sind etwa 50 MDa groß und bestehen aus mehrfachen Kopien von etwa 30 unterschiedlichen Proteinen (Nukleoporine), insgesamt 456 Proteine (Alber *et al.*, 2007).



**Abb. 7** Schematische Darstellung einer Kernpore

Darstellung der Struktur eines Kernporenkomplexes (modifiziert nach Patel *et al.*, 2007).

NPCs sind in die Kernmembran integriert und verbinden durch einen wässrigen Kanal Cytoplasma und Nukleoplasma. Dieser zentrale Porenkanal wird von 8 „Speichen“ umgeben, die den oktagonalen „Spoke“-Komplex bilden. Im Innern des Kanals, sowie auf der cytoplasmatischen wie auch nukleoplasmatischen Seite, befinden sich flexible filamentöse Phenylalanin-Glycin (FG) Nukleoporine. Sie bilden die Bindungsstellen für Transportfaktoren.

Auf der nukleoplasmatischen Seite bilden sie eine Korbstruktur aus (Alber *et al.*, 2007). Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 40 kDa können die Kernporen nur durch aktive Transportprozesse durchqueren, während kleinere Proteine auch passiv durch freie Diffusion durch die Kernporen transloziert werden. Ein effizienter, zielgerichteter Transport ist jedoch auch für kleine Moleküle nur durch aktiven Transport möglich (Schlenstedt *et al.*, 1997). Der Aufbau einer Kernpore ist in Abbildung 7 gezeigt.

## II.6.2. Die Familie der Karyopherine

Jede eukaryontische Zelle muss den rapiden Transport von Proteinen und RNAs durch NPCs in den Zellkern und aus dem Zellkern bewerkstelligen. Dazu bedienen sie sich der Mitglieder der Karyopherin-Familie. Diese sind evolutionär hoch konservierte Rezeptoren, die Import- oder Exportsignale ihrer Substrate erkennen. Je nachdem ob diese Rezeptoren nukleären Import oder Export vermitteln, werden sie auch Importine oder Exportine genannt. Während in Säugern über 20 Karyopherine bekannt sind, existieren in *S. cer.* lediglich 14 (Tab. 2) (Pemberton und Paschal, 2005). Davon vermitteln elf nukleären Import, vier nukleären Export. Msn5p kann hierbei sowohl Kernimport als auch Kernexport vermitteln (Ström *et al.*, 2001).

**Tabelle 2** *S. cer.* Karyopherine und ihre Substrate

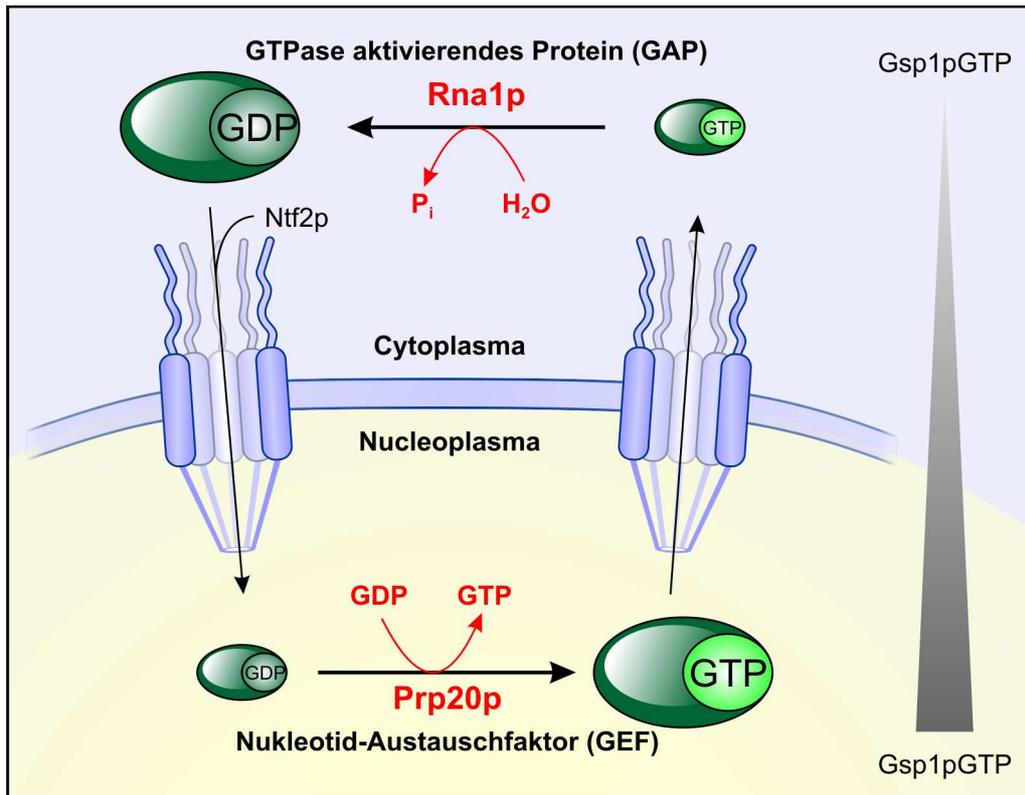
	Karyopherine	Funktion
Importine	Kap95p	unzählige Substrate mit klassischem NLS (über Imp $\alpha$ /Srp1p)
	Kap104p	mRNA Binde-Proteine Hab2p / Hrp1p
	Mtr10p / Kap111p	mRNA Binde-Proteine Npl3p / Hrp1p
	Kap123p	ribosomale Proteine, Histone
	Pse1p / Kap121p	ribosomale Proteine, Histone, TF Pho4p
	Kap114p	Allg. TF TBP, Histone, Nap1p
	Nmd5p / Kap119p	Transkriptions-Elongationsfaktor TFIIIS, Hog1p
	Sxm1p / Kap108p	Ribosomale Proteine, RNA Binde-Protein Lhp1p
	Pdr6p / Kap122p	TFIIA
	Kap120p	Rpf1p
	Msn5p	Replikationsprotein A (RPA)

<b>Exportine</b>	Xpo1p / Crm1p	NES-Substrate
	Los1p	tRNAs
	Msn5p	Pho4p, Mig1p, Far1p, Ste5p
	Cse1p	Importin $\alpha$ /Srp1p

Um nukleocytoplasmatische Transportprozesse zu vermitteln, müssen die Karyopherine gewisse „Target“-Sequenzen ihrer Substrate erkennen. Kernlokalisierungssignale (NLS, nuclear localization signal) werden von Importinen, Kernexportssignale (NES, nuclear export signal) von Exportinen erkannt. Die Charakterisierung des NLS des T-Antigens von Simian Virus 40 (SV40) resultierte in der Definition des klassischen NLS, das aus einer Abfolge von basischen As der Konsensussequenz PKKKRKV besteht (Eguchi *et al.*, 2005). Substrate mit klassischem NLS werden von Importin  $\beta$  (Kap95p der Hefe) über das Adaptorprotein Importin  $\alpha$  (Srp1p der Hefe) gebunden und in den Zellkern importiert (Eguchi *et al.*, 2005). NES-Sequenzen sind in der Regel Leucin-reiche Sequenzen, an die das Exportin Xpo1p bindet (Maurer *et al.*, 2001).

### II.6.3. Der RanGTPase Zyklus

Die grundlegende Kraft für alle Transportvorgänge in und aus dem Zellkern ist die Existenz eines Gradienten der kleinen GTPase Ran (Gsp1p der Hefe). Diese liegt in zwei Zustandsformen vor, einer GTP- und einer GDP-gebundenen Form. Ran reguliert die Zusammensetzung von Import- und Export-Komplexen in Abhängigkeit seiner Zustandsform. Die GDP-gebundene Form überwiegt im Cytoplasma, während die GTP-gebundene Form im Nukleoplasma vorherrscht (Abb. 8). An der Aufrechterhaltung dieses Gradienten sind mehrere Proteine beteiligt. NTF2 (Ntf2p der Hefe) bindet RanGDP im Cytoplasma und transportiert es entlang der Kernporen in den Zellkern. Dort setzt es RanGDP frei und kehrt zurück ins Cytoplasma. RanGDP wird im Nukleus durch den Guanin Nukleotid-Austauschfaktor RanGEF (Prp20p der Hefe) in RanGTP überführt. RanGTP kann den Zellkern durch Export-Komplexe wieder verlassen. Im Zytoplasma aktiviert das GTPase aktivierende Protein RanGAP (Rna1p der Hefe) die intrinsische GTPase Aktivität von Ran, wodurch das Ran-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. So sorgen RanGEF und RanGAP für eine hohe RanGTP-Konzentration im Zellkern und für eine geringe RanGTP-Konzentration im Cytoplasma (Pemberton und Paschal, 2005).



**Abb. 8 Regulation des Gsp1pGTP/GDP-Gradienten**

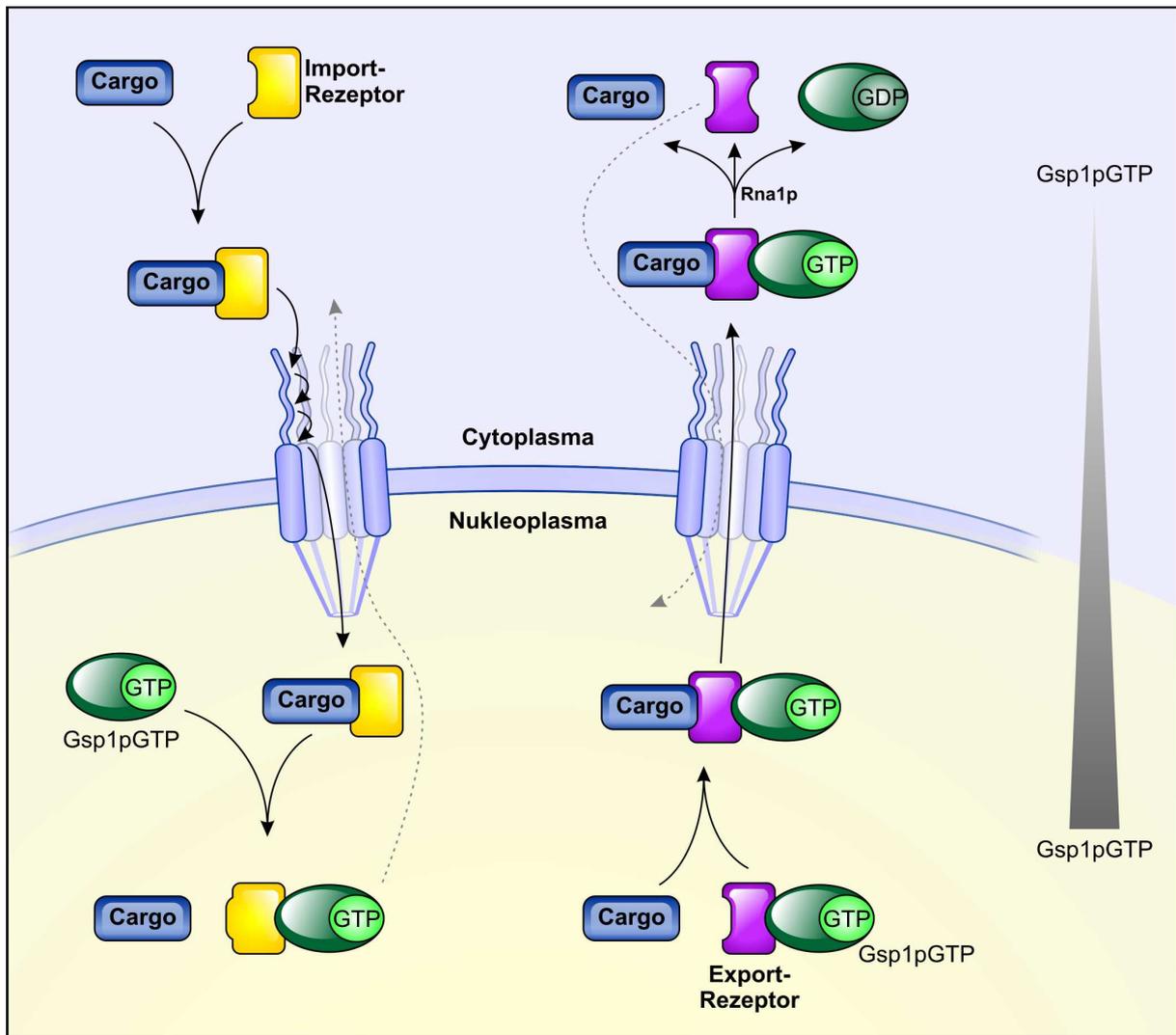
Die Rolle von Ran (Gsp1p der Hefe) bei nukleocytoplasmatischen Transportprozessen. Gsp1p ist grün dargestellt.

#### II.6.4. Mechanismen des nukleären Imports und Exports

Sollen Proteine in den Nukleus transportiert werden, benötigen sie in der Regel ein NLS. Dieses Signal wird von Rezeptoren der  $\beta$ -Importin-Familie spezifisch erkannt und gebunden. Der resultierende Komplex aus Importrezeptor und Importsubstrat wird über Phenylalanin-Glycin (FG)-Regionen von Kernporenproteinen durch die Kernpore ins Nucleoplasma transloziert, wo Gsp1pGTP an den Importkomplex bindet. Dadurch kommt es zur Ablösung des Komplexes von der Kernpore und zur Freisetzung des Importsubstrates ins Nucleoplasma. Der neu entstandene Komplex aus Importrezeptor und Gsp1pGTP wird wieder durch Kernporen ins Cytoplasma exportiert, wo das Gsp1p-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird (s. Abschnitt II.6.3). Der Komplex aus Importin und Gsp1pGDP dissoziiert und der Importrezeptor steht wieder für den Kernimport von Substraten bereit (Pemberton und Paschal, 2005; Rout *et al.*, 2001).

Proteine, die aus dem Zellkern ins Cytoplasma transloziert werden sollen, beherbergen in der Regel ein NES. Dazu bildet sich ein trimerer Komplex aus Exportsubstrat, Exportrezeptor

und Gsp1pGTP. Dieser Komplex wird entlang einer Kernpore ins Cytoplasma transloziert, wo das Gsp1p-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Es erfolgt die Dissoziation des trimeren Komplexes und somit die Freisetzung des Exportsubstrates ins Cytoplasma. Der Exportrezeptor kann erneut in den Zellkern importiert werden, wo er für neue Exportprozesse bereit steht. In Abbildung 9 sind der nukleäre Import und Export schematisch dargestellt (Pemberton und Paschal, 2005).



**Abb. 9 Schematische Darstellung der nukleocytoplasmatischen Transportprozesse durch Kernporen**

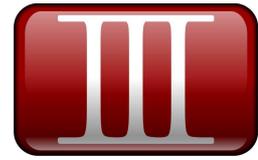
Mechanismen des nukleären Imports (links) und des nukleären Exports (rechts) durch Kernporen-Komplexe.

## **II.7. Zielsetzung**

Obwohl alle Befunde darauf hindeuten, dass Asr1p an einer alkoholinduzierten Stressantwort bzw. an der Transkriptionsregulation spezifischer Gene beteiligt ist, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, welche physiologische Funktion Asr1p ausübt. Es wurde gezeigt, dass Asr1p in Abhängigkeit von aliphatischen Alkoholen im Zellkern akkumuliert, und dass es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt. Außerdem wurde gezeigt, dass Asr1p direkt mit der RNAPII Transkriptionsmaschinerie, nämlich der CTD der größten Untereinheit Rpb1p, interagiert. Der Zweck für die Kernakkumulation und für die Interaktion mit der RNAPII war jedoch unbekannt. In erster Linie sollte deshalb analysiert werden, welche Funktion Asr1p ausübt und inwiefern diese Funktion an einer alkoholinduzierten Stressantwort bzw. an der Transkriptionsregulation beteiligt sein könnte. Dazu sollten u.a. neue Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert werden. Diese sollten weitere Hinweise auf die Funktion von Asr1p geben.

Da Asr1p konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern shuttelt und bei Alkoholstress seine subzelluläre Lokalisation ändert, wobei es reversibel im Zellkern akkumuliert, lag es nahe, den Mechanismus seines Kernimports näher zu analysieren. So sollten die am Kernimport beteiligten Importrezeptoren identifiziert, und das Asr1p Kernlokalisierungssignal näher charakterisiert werden.

## **III. Material und Methoden**



### **III.1. Material**

#### **III.1.1. Geräte**

Autoklav – Systec, Wetzlar

Brutschränke – diverse Hersteller

COREX Glas-Zentrifugenröhrchen – DuPont Instruments, Wilmington, USA

Dounce Homogenisator: Dounce Tissue Grinders, 40 ml – Wheaton, Millville NJ, USA

Elektrophoresekammern für Agarosegele – Werkstatt Med. Biochemie, Homburg

Elektroporator Gene Pulser Xcell – Bio-Rad, München

Eismaschine Scotsman AF 20 – Enodis Deutschland GmbH

Erlenmeyerkolben – Fisherbrand

Expositionskassette für Western Blots – Siemens AG, München

Expositionskassette & Storage Phosphor Screen – Amersham Biosciences, Freiburg

Feinwaagen – Sartorius, Göttingen; Kern & Sohn GmbH, Balingen

Geldokumentationssystem Gel Doc™ – Bio-Rad, München

Geltrockner – Fröbel Labortechnik, Lindau

Gilson Pipetten – Abimed, Göttingen

Inkubationsschüttler Innova 44 & Refrigerated 44R – New Brunswick Scientific, Nürtingen

Kühlfalle Refrigerated Condensation Trap RT 100 – GMI Inc., Minnesota, USA

Kühlzentrifuge Avanti® J20XP – Beckman Coulter, München

Kühlzentrifuge Jouan CR3i – Thermo Electron Corporation, St. Johann, Österreich

Magnetrührer – IKA Labortechnik, Staufen

NanoDrop – Thermo Fisher Scientific, Bonn

pH-Meter inoLab pH720 – WTW, Weilheim

Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U mit Digitalkamera DS-5Mc und Software NIS

Elements F2.20 – Nikon, Düsseldorf

Mikrowellenherd Micromaxx – Medion AG, Essen

Milliporewasser-Anlage Milli-Q® - Millipore Corporation, Billerica, USA

Mini-PROTEAN® II Electrophoresis System (Electrophoresis Cell, Glasplatten + Käbme, Gießstand + Gießhalterung) – Bio-Rad, München

PCR Gerät Primus 25 advanced® - Peqlab, Erlangen

PCR Gerät MBS Satellite 0.2G – Thermo Electron Corporation, St. Johann, Österreich

PCR Gerät GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

Quantifizierungssoftware ImageQuant TL 2003 – Amersham Biosciences, Freiburg

Quarzküvette – Hellma, Jena

Reagenzgläser – Schott, Mainz

Rotoren für Avanti® J20XP – Beckman Coulter, München

JA-10 (max. 17.700 x g),

JA-25.50 (max. 74.200 x g)

Rotoren für Jouan CR3i – Thermo Electron Corporation, St. Johann, Österreich

T40 (max. 2.500 x g)

AC2.14 (max. 18.400 x g)

Savant Speed Vac® SC110 – GMI Inc., Minnesota, USA

Scanner UMAX Power Look 1120 – UMAX, Willich

Spannungsversorgung APELEX PS 503 (Agarose Gelelektrophorese) – APELEX, Massy Cedex, Frankreich

Spannungsversorgung PowerPac 300 (SDS Gelelektrophorese ) – Bio-Rad, München

Spektralphotometer Ultrospec™ 3100 *pro* – GE Healthcare, München

Sterilbank – Heraeus, Hanau

Stickstoff-Versorgungsbehälter Apollo® - Cryotherm, Kirchen

Thermomixer® comfort & compact – Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Tiefkühlschrank (-20°C) – Liebherr, Bulle, Schweiz

Tiefkühlschrank HERAfreeze (-80°C) – Thermo Scientific, Waltham, USA

Tischzentrifuge 5415D –Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Dewargefäß – KGW-Isotherm, Karlsruhe

Trockenschrank – Heraeus, Hanau

Typhoon 9410 Imager - GE Healthcare, München

Vakuumpumpe – Vacuubrand, Wertheim

Ultraschallgerät UP 400S – Dr. Hielscher GmbH, Teltow

UV-Tisch – Fröbel, Wasserburg

Vortex Mixer – IKA Labortechnik, Staufen

Wasserbäder, temperierbar – div. Hersteller

Western Blot Apparatur Mini Trans-Blot Cell – Bio-Rad, München

Wippschüttler DRS-12 mit Multilevel-Plattform – LTF Labortechnik GmbH & Co. KG,  
Wasserburg  
XCell ShureLock™ Mini-Cell Elektrophoresekammer – Invitrogen, Karlsruhe  
Zentrifugenbecher (JA-10 und JA-25.50, Polycarbonat) – Beckman, München

#### III.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Agfa, Köln:** Röntgenfilme (Agfa Cronex 5)

**Bio-Rad, München:** Nitrocellulose Membran Trans-Blot®, 0,2 µm;

**Brand, Wertheim:** Halbmikro-Küvetten, 1,5 ml

**Eppendorf, Wesseling-Berzdorf:** Reaktionsgefäße, 1,5 ml + 2 ml; LoBind® Tubes, 0,5 ml

**Greiner bio-one, Nürtingen:** PCR-Reaktionsgefäße; Petrischalen mit Nocken 94 x 16 mm, steril; Zentrifugenröhrchen Falcon™ 15 ml + 50 ml

**Invitrogen, Karlsruhe:** NuPage® Novex® Bis-Tris Gels 4-12%

**Macherey-Nagel, Düren:** NuleoBond PC100 Plasmid Purification Kit

**Marienfeld, Lauda-Königshofen:** Deckgläser 24 x 24 mm; Objektträger 76 x 26 mm

**Nalge Nunc International, Wiesbaden:** sterile Einmal-Impfösen Inoculation Loop

**Nunc, Wiesbaden:** Sterilfiltrationseinheiten Bottle Top-Filter, 150 ml + 500 ml

**Promega, Mannheim:** TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System

**Qiagen, Hilden:** QIAquick® Gel Extraction Kit

**Roth, Karlsruhe:** Pasteurpipetten

**Sarstedt, Nümbrecht:** Einmal-Spitzen

**Schleicher & Schuell, Dassel:** Sterilfilter, 0,2 µm

**Sigma-Aldrich, München:** Costar® Spin-X® Centrifuge Tube Filters

**Stratagene, Cedar Creek, USA:** QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit;  
QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit

**Whatman, Maidstone, UK:** Whatman 3MM-Papier

#### III.1.3. Chemikalien

**Amersham-Buchler, Braunschweig:** [<sup>35</sup>S]-Methionin (1.000 Ci/mmol)

**Bio-Rad, München:** Immun-Star® (GAM) AP Kit

**BostonBiochem Inc., Cambridge, USA:** Energy Regeneration Solution (ERS); Mg-ATP Solution

**Frema Reform, DE-VAU-GE Gesundheitswerk GmbH, Lüneburg:** Magermilchpulver

**GE-Healthcare, Freiburg:** ECL Plus Western Blotting Detection System; GSH Sepharose; IgG Sepharose™ 6 Fast Flow

**Invitrogen, Karlsruhe:** Benchmark™ Protein-Ladder; 100bp DNA-Ladder; Mark12™ Protein-Ladder; Agarose; NuPAGE® LDS Probenpuffer

**Merck, Darmstadt:** Magnesiumsulfat (x 7 H<sub>2</sub>O), SDS

**MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich:** DTT, Glycin

**MBI Fermentas, St. Leon-Rot:** λ-Sty-DNA-Ladder

**New England Biolabs, Frankfurt:** Amylose Resin

**Promega, Mannheim:** RNasin® Ribonuclease Inhibitor

**Qiagen, Hilden:** Nickel-NTA-Agarose

**Remel, Lenexa, USA:** BACTi-Yeast Extract; Casein Pepton (Trypton); Meat Pepton; Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

**Roche Diagnostics, Mannheim:** EDTA-free Protease Inhibitor; Lumilight® Western Blotting Substrate

**Roth, Karlsruhe:** Agar-Agar; Ampicillin; Coomassie Brilliant Blue R250 + G250; Dinatriumhydrogensulfat; HEPES; IPTG; Kaliumacetat; Lithiumacetat; Magnesiumacetat; MOPS; Natriumdihydrogensulfat; PEG 4000; Roti®-Phenol; Rotiphorese Gel 30; TEMED; TritonX-100

**Serva, Heidelberg:** Amoniumpersulfat; Bromphenolblau; Ponceau S; Xylencyanol FF

**Sigma, Taufkirchen:** 3-Aminotriazol; Aminosäuren; BSA; Maus anti-ProteinA-Antikörper; Glukose; Saccharose; Salmonsperm-DNA; Tris

**Sigma-Aldrich, München:** 10x Blocking Buffer; Citronensäure; DAPI; DMSO; Formaldehyd; Glass Beads 525-600 µm; Kanamycin; MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al); Raffinose; Uracil

**VWR, Darmstadt:** Ethanol (100%)

**Zentrales Chemikalienlager, UdS Saarbrücken:** Calciumdichlorid; EDTA; Ethanol (vergällt); Essigsäure; Glycerin; Isopropanol; Kaliumchlorid; Mangandichlorid; Methanol; MOPS; Natriumacetat; Salzsäure

#### III.1.4. Enzyme und Proteine

**BostonBiochem Inc., Cambridge, USA:** Ubch Enzyme Set; Ubch9 human recombinant; Ubch1 (E2-25K), human recombinant; humanes E1 Ubiquitin-aktivierendes Enzym UBE1;

humanes His<sub>6</sub>-Ubiquitin K48R; humanes Ubiquitin K48 only; humanes Ubiquitin K63 only; humanes Ubiquitin no lysines;

**MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich:** ImmunO® Zymolyase 100T + 20T

**MBI Fermentas, St. Leon-Rot:** Restriktionsendonukleasen; T4-DNA-Ligase, *Taq*-DNA-Polymerase

**New England Biolabs, Frankfurt:** Restriktionsendonukleasen

**Qiagen, Hilden:** Proof Start DNA-Polymerase

**Roche Diagnostics, Mannheim:** alkalische Phosphatase aus Kälberdarm; RNase A

### III.1.5. Antikörper

**Tab. 3** In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Typ	Herkunft
<b>Kaninchen PAP (α-Protein A)</b>	1:1.000 WB	polyklonal; Kaninchen-Serum Peroxidase-gekoppelt	DAKO, München
<b>Maus anti-Polyhistidin</b>	1:1.000 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	Sigma-Aldrich, München
<b>8WG16 Maus anti-RNAPII (nonphosphoryliert)</b>	1:500 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	BAbCO, Richmond, USA
<b>H5 Maus anti-RNAPII (Ser2 phosphoryliert)</b>	1:500 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	Covance, Berkeley, USA
<b>H14 Maus anti-RNAPII (Ser5 phosphoryliert)</b>	1:500 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	BAbCO, Richmond, USA
<b>Ziege anti-GST</b>	1:1.000 WB	polyklonal; Ziegen-Serum	Amersham Biosciences, Freiburg
<b>Maus anti-GST</b>	1:1.000 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	Sigma-Aldrich, München
<b>Kaninchen anti-GFP</b>	1:1.000 WB	polyklonal; Kaninchen-Serum	AG Schlenstedt, Universität des Saarlandes
<b>Maus anti-Ubiquitin</b>	1:1.000 WB	monoklonal; Maus Ascides Flüssigkeit	Sigma-Aldrich, München
<b>Kaninchen anti-MBP</b>	1:5.000 WB	polyklonal; Kaninchen-Serum	New England Biolabs, Frankfurt
<b>Kaninchen anti-Cmd1</b>	1:500 WB	polyklonal; Kaninchen-Serum	Brockerhoff und Davis, 1992

<b>Ziege anti-Maus</b>	1:10.000 WB	Peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
<b>Ziege anti-Kaninchen</b>	1:10.000 WB	Peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
<b>Kaninchen anti-Ziege</b>	1:10.000 WB	Peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
<b>Ziege anti-Maus</b>	1:10.000 WB	Alkalische Phosphatase-gekoppelt	Bio-Rad, München

### III.1.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von QIAGEN OPERON GmbH (Köln) bezogen.

**Tab. 4** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
P1	KT-FL-HIII	CCC AAG CTT CAA GGA GTT GAG CC
P6	3-KT-Bam	TTT GGA TCC CTA CTC ATC ATG ACA GTA
P7	5-Cir1_Hind_568	TT TTT AAG CTT AGG AAT TCC ATG ATT TTT
P8	3-Cir1_XhoI	TTT CTC GAG CTA CTC ATC ATG ACA GTA
P12	5-Cir1_Hind_661	TTT AAG CTT ATC CAG ATG CAC GTG CGA
P58	3-IPF_C_548_XI	TTT CTC GAG TTA TTC TAT ATA CTT ATC AA
P88	5-IPF_C_316_HIII	T TTT AAG CTT AGC AAC AAC ACA GTA ATA
P89	3-IPF_MI_534_XI	TTT CTC GAG TTA TGT GAA AAA TTC ATC AA
P91	5-IPF_MI_473_HIII	TTT AAG CTT ATT CAA AAA CAC ATA CGA AA
P94	3-Asr1_BamHI_264_ns	TTT GGA TCC GGC ATC CTT GAA GCG CA
P95	5-Asr1_BamHI_276	TTT GGA TCC TTG TAC CGT CTC TCT GA
P96	3-Asr1_BamHI_242_ns	TT GGA TCC TTT GTG CTT GGC ATT CCG T
P97	3-Asr1_XhoI_272_st	TT CTC GAG CTA TAC TTG CTT GTT GAC GT
P98	3-Asr1_Hind_265-75_Ann	TC GAG CTA CTT GCG GGA TAC TTG CTT GTT GAC

### III. Material und Methoden

		GTG CTT GTA A
P99	3-Asr1_257_P2_A	GAA GCG CAG CAG AGC CAG TGG GTA CCG GTC CAG
P100	5-Asr1_257_P2_A	CTG GAC CGG TAC CCA CTG GCT CTG CTG CGC TTC
P101	3-Asr1_255_P1_A	GAA GCG CAG CAG AGG CAG TGC GTA CCG GTC CAG
P102	5-Asr1_255_P1_A	CTG GAC CGG TAC GCA CTG CCT CTG CTG CGC TTC
P103	5-Asr1_255_P.P_A.A	CTG GAC CGG TAC GCA CTG GCT CTG CTG CGC TTC
P104	3-Asr1_255_P.P_A.A	GAA GCG CAG CAG AGC CAG TGC GTA CCG GTC CAG
P107	5-Asr1_246_H.R_A.A	CTT ATC CAG ATG GCC GTG GCA CGA GCA CTG GAC
P108	3-Asr1_246_H.R_A.A	GTC CAG TGC TCG TGC CAC GGC CAT CTG GAT AAG
P109	5-Asr1_Hind_265-75_Ann	AG CTT TAC AAG CAC GTC AAC AAG CAA GTA TCC CGC AAG TAG C
P111	5-Asr1_251_L.Y_A.A	GTG CGA CGA GCA GCC GAC CGG GCC CCA CTG CCT CTG
P112	3-Asr1_251_L.L_A.A	CAG AGG CAG TGG GGC CCG GTC GGC TGC TCG TCG CAC
P113	5-Asr1_243_IQ_AA	GAT ATC AAG CTT GCC GCA ATG CAC GTG CGA
P114	3-Asr1_243_IQ_AA	TCG CAC GTG CAT TGC GGC AAG CTT GAT ATC
P115	5-Asr1_274_RK_AA	AAG CAA GTA TCC GCC GCG TTG TAC CGT CTC
P116	3-Asr1_274_RK_AA	GAG ACG GTA CAA CGC GGC GGA TAC TTG CTT
P119	5-Asr1_243_PstI	TT CTG CAG ATC CAG ATG CAC GTG CGA
P120	3-Asr1_280_HindIII	T TTT AAG CTT CTA AGA GAG ACG GTA CAA
P124	3-Asr1_XhoI_254	TTT CTC GAG CTA GTA CCG GTC CAG T
P125	3-Asr1_Xho_280	TT CTC GAG CTA AGA GAG ACG GTA CAA
P126	5-Asr1_Hind_250	AAG CTT GCA CTG GAC CGG TAC CCA CT
P131	5-Asr1_263_D.YK_A.AA	CTG CGC TTC AAG GCT GCC GCC GCG CAC GTC AAC AAG
P132	3-Asr1_263_D.YK_A.AA	CTT GTT GAC GTG CGC GGC GGC AGC CTT GAA GCG CAG
P138	5-Asr1_Hind_262-280_Ann	AG CTT AAG GAT GCC TAC AAG CAC GTC AAC AAC CAA GTA TCC CGC AAG TTG TAC CGT CTC

### III. Material und Methoden

		TCT TAG C
P139	3-Asr1_XhoI_262-280 Ann	TC GAG CTA AGA GAG ACG GTA CAA CTT GCG GGA TAC TTG CTT GTT GAC GTG CTT GTA GGC ATC CTT A
P150	5-YER139c_PstI	TT CTG CAG ATG GCG ACG ATT GAA GAT A
P151	3-YER139c_XhoI_3UTR	TTT CTC GAG ATT AAA TAC TTG TTG ATT TT
P171	5-Asr1_273_SR_AA	AAC AAG CAA GTA GCC GCC AAG TTG TAC CGT
P172	3-Asr1_273_SR_AA	ACG GTA CAA CTT GGC GGC TAC TTG CTT GTT
P174	3-Asr1_PstI_stop	TT CTG CAG CTACTC ATC ATG ACA GTA
P189	5-KT-1147_Nco	CAT GCC ATG GGC AGG AAT TCC ATG A
P190	5-Asr1_292_DSL_AAA_neu	GAC CAG TAC GAT TAC GCC GCT GCA GCC CGA ACT GGA GTG
P198	5-Cmd1_NcoI	TTT TCC ATG GCG TCC TCC AAT CTT A
P199	3-Cmd1_BamHI_3-UTR	TTT GGA TCC ATG TTG TTC CTC AAG AA
P200	3-Asr1_292_DSL_AAA_neu	CAC TCC AGT TCG GGC TGC AGC GGC GTA ATC GTA CTG GTC
P232	5-Asr1_BamHI_212	T TTT GGA TCC AGG AAT TCC ATG ATT TTT
P233	5-Asr1_BamHI	TTT GGA TCC CAA GGA GTT GAG CCA A
P234	3-Asr1_3UTR_HindIII	TT AAG CTT TAT TCA GTC GGA ACA ATT GGT A
P235	5-Asr1_C.H>S.S(Ring1)	TGT TTG AAC GTT TCC GGG AGT AAA TTC CAC TTA
P236	3-Asr1_C.H>S.S(Ring1)	TAA GTG GAA TTT ACT CCC GGA AAC GTT CAA ACA
P237	5-Asr1_C.C>S.S(Ring2)	TTA AGC CTG TAT TCC CAA GAC TCC GAA GCA ATA TAT
P238	3-Asr1_C.C>S.S(Ring2)	ATA TAT TGC TTC GGA GTC TTG GGA ATA CAG GCT TAA
P268	5-Cmd1_K22>A	GCC CTC TTT GAT GCA GAT AAC AAT GGC
P269	3-Cmd1_K22>A	GCC ATT GTT ATC TGC ATC AAA GAG GGC
P274	5-Cmd1_K95>A	AAA GTA TTC GAT GCG AAC GGT GAT GGT
P275	3-Cmd1_K95>A	ACC ATC ACC GTT CGC ATC GAA TAC TTT
P278	5-Cmd1_K91>Aauf_wt	CTA GAA GCT TTT GCA GTA TTC GAT AAG
P279	3-Cmd1_K91>Aauf_wt	CTT ATC GAA TAC TGC AAA AGC TTC TAG

### III.1.7. Vektoren

**Tab. 5** In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Nr.	Marker	Beschreibung	Quelle
#556	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS315-pNOP-PROTA	Laborkollektion
#557	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS315-pNOP-GFP	Laborkollektion
#1192	KAN <sup>r</sup>	pET9d-GST	Laborkollektion
SM197	AMP <sup>r</sup>	pBS-ASR1	Laborkollektion
SM632	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-PROTA-ASR1 As 2-310	Laborkollektion
SM635	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GFP-ASR1	Laborkollektion
SM643	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-PROTA-ASR1 As 212-310	Laborkollektion
SM656	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-PROTA-ASR1 As 2-211	Laborkollektion
SM1019	KAN <sup>r</sup> TRP1	pGBKT7	Laborkollektion
SM1020	AMP <sup>r</sup> LEU2	pGADT7	Laborkollektion
SM1059	KAN <sup>r</sup> TRP1	pGBKT7-ASR1	Laborkollektion
SM1105	AMP <sup>r</sup> TRP1	pAS2-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 2-211	Laborkollektion
SM1147	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6HIS-U <sub>L</sub> 31	Laborkollektion
SM1228	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP- GFP-β-GAL-ASR1 As 212-310	Laborkollektion
SM1249	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GFP-β-GAL	Laborkollektion
SM1277	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP	Laborkollektion
SM1279	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 212-310	Laborkollektion
SM1297	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 224-310	Laborkollektion
SM1298	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 233-310	Laborkollektion

III. Material und Methoden

SM1321	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-C.alb ALC1	Laborkollektion
SM1373	KAN <sup>r</sup> TRP1	pGBKT7-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 212-310	Laborkollektion
SM1393	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS315- pGAL-GST-GFP-ASR1 As 212-310	Laborkollektion
SM1436	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293	Laborkollektion
SM1466	AMP <sup>r</sup> LEU2	pGAD-GAL4-AD-RPB1-CTD	Laborkollektion
SM1493	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pGAL-GST-GFP-ASR1 As 243-293 Vektor: SM1436 SacI/NcoI Insert: SM1393 SacI/NcoI	diese Arbeit
SM1526	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-C.alb ALC1 As 316-548 Vektor: SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von SM1321 mit P88 + P58 HindIII/XhoI	Laborkollektion
SM1527	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-C.alb ALC1 As 473-534 Vektor: SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von SM1321 mit P91 + P89 HindIII/XhoI	Laborkollektion
SM1528	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-280 Vektor: SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von 635 mit P12 + P125	diese Arbeit
SM1529	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 I243A/Q244A Mutagenese von SM1436 mit P113 + P114	diese Arbeit
SM1530	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 H246A/R248A Mutagenese von SM1436 mit P107 + P108	diese Arbeit
SM1531	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 P255A/P257A Mutagenese von SM1436 mit P103 + P104	diese Arbeit
SM1531a	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 P255A Mutagenese von SM1436 mit P102 + P101	diese Arbeit
SM1531b	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 P257A Mutagenese von SM1436 mit P100 + P99	diese Arbeit
SM1531c	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 D263A/Y265A/K266A Mutagenese von SM1436 mit P131 + P132	diese Arbeit
SM1531d	AMP <sup>r</sup>	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293	diese Arbeit

III. Material und Methoden

	LEU2	S273A/R274A Mutagenese von SM1436 mit P171 + P172	
SM1531e	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 R274A/K275A Mutagenese von SM1436 mit P115 + P116	diese Arbeit
SM1532	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-293 L251A/Y254A Mutagenese von SM1436 mit P111 + P112	diese Arbeit
SM1533	AMP <sup>r</sup>	pMAL-c	New England Biolabs Inc.
SM1534	AMP <sup>r</sup>	pMAL-c-ASR1 As 243-280 Vektor:SM1533 PstI/HindIII Insert: PCR von SM635 mit P119 + P120 PstI/HindIII	diese Arbeit
SM1538	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-254 Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von 635 mit P12 + P124	diese Arbeit
SM1617	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 250-280 Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von 635 mit P126 + P125	diese Arbeit
SM1619	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 262-280 Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: Annealing von P138 + P139	diese Arbeit
SM1627	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS315-pNOP-PROTA-RTR1 Vektor:#556 PstI/XhoI Insert: PCR aus gDNA YSM85 mit P150 + P151 PstI/XhoI	diese Arbeit
SM1628	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS315-pNOP-GFP-RTR1 Vektor:#557 PstI/XhoI Insert: PCR aus gDNA YSM85 mit P150 + P151 PstI/XhoI	diese Arbeit
SM1678	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP- GFP-β-GAL-ASR1 As 243-280 Vektor:SM1228 HindIII/XhoI Insert: SM1528 HindIII/XhoI	diese Arbeit
SM1679	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As [1-264] + [276-310] (ASR1 Δ As 265-275) Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von SM635 mit P1 + P94 HindIII/BamHI PCR von SM635 mit P95 + P8	diese Arbeit
SM1680	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As [1-242] + [276-310] (ASR1 Δ As 243-275) Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR aus SM635 mit P1 + P96 HindIII/BamHI	diese Arbeit

### III. Material und Methoden

		PCR von SM635 mit P95 + P8 BamHI/XhoI	
SM1681	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 243-272 Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: PCR von 635 mit P12 + P97	diese Arbeit
SM1682	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-GST-GFP-ASR1 As 265-275 Vektor:SM1277 HindIII/XhoI Insert: Annealing von P109 + P98	diese Arbeit
SM1759	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 Vektor:SM1147 NcoI/BamHI Insert: PCR aus gDNA YSM85 mit P198 + P199 NcoI/BamHI	diese Arbeit
SM1761	AMP <sup>r</sup> TRP1	pAS2-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 212-310 Vektor:SM1105 NcoI/BamHI Insert: PCR von SM1763 mit P189 + P6	diese Arbeit
SM1762	AMP <sup>r</sup> LEU2	pRS425-pNOP-PROTA-ASR1 As 212-310 D292A/S293A/L294A Vektor:SM1763 HindIII/XhoI Insert: PCR von SM1763 mit P7 + P8	diese Arbeit
SM1763	AMP <sup>r</sup>	pBS-ASR1 D292A/S293A/L294A Mutagenese von SM197 mit P190 + P200	diese Arbeit
SM1793	AMP <sup>r</sup>	pMAL-c-ASR1 Vektor:SM1534 BamHI/HindIII Insert: PCR von SM635 mit P233 + P234 BamHI/HindIII	diese Arbeit
SM1795	AMP <sup>r</sup>	pMAL-c-ASR1 C45S/H47S Mutagenese von SM1793 mit P235 + P236	diese Arbeit
SM1797	AMP <sup>r</sup>	pMAL-c-ASR1 C158S/C161S Mutagenese von SM1793 mit P237 + P238	diese Arbeit
SM1780	KAN <sup>r</sup> TRP1	pGBKT7-ASR1 As 212-242 + 276-310 (ASR1 Δ As 243-275) Vektor:SM1019 NcoI/PstI Insert: PCR von SM1680 mit P189 + 174 NcoI/PstI	diese Arbeit
SM1799	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 K22A Mutagenese von SM1759 mit P268 + P269	diese Arbeit
SM1802	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 K95A Mutagenese von SM1759 mit P274 + P275	diese Arbeit
SM1803	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 K22A/K95A Mutagenese von SM1799 mit P274 + P275	diese Arbeit
SM1804	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 K91A Mutagenese von SM1759 mit P278 + P279	diese Arbeit
SM1805	KAN <sup>r</sup>	pET9d-6His-CMD1 K22A/K91A Mutagenese von SM1799 mit P278 + P279	diese Arbeit

pGS390	AMP <sup>r</sup>	pGEX-5G-GST-SRP1	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998
pGS395	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-CSE1	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998
pGS459	AMP <sup>r</sup>	pQE90-SRP1	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998
pGS468	AMP <sup>r</sup>	pQE9-GSP1 Q71L	Maurer <i>et al.</i> , 2001
pGS509	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-XPO1	Fries <i>et al.</i> , 2007
pGS882	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-TEV-MTR10	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS962	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-TEV-KAP95	Maurer <i>et al.</i> , 2001
pGS985	AMP <sup>r</sup>	pQE70-T7-HTA1	Greiner <i>et al.</i> , 2004
pGS1007	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-TEV-PSE1	Fries <i>et al.</i> , 2007
pGS1010	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-TEV-KAP104	Maurer <i>et al.</i> , 2001
pGS1092	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-TEV-KAP123	Fries <i>et al.</i> , 2007
pGS1095	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-MSN5	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1104	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-NMD5	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1124	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-PDR6	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1188	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-KAP114	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1235	AMP <sup>r</sup>	pGEX-5G-GST-KAP120	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1295	AMP <sup>r</sup>	pGEX-4T-GST-SXM1	Caesar <i>et al.</i> , 2006
pGS1834	AMP <sup>r</sup>	pGEX-GST-CMD1	AG Schlenstedt, Universität des Saarlandes

## III.2. Organismen

### III.2.1. Bakterienstämme

**Tab. 6** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Nr. Bezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> JM101	<i>F'</i> traD36 <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>proB</i> <sup>+</sup> <i>laqlq lacZ</i> ΔM15/ <i>supE thi-1</i> ( <i>lac-proAB</i> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>F'</i> <i>supE44</i> Δ ( <i>lacU169</i> (Φ80d <i>lacZ</i> M15) <i>hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> )	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	B <i>F'</i> <i>dcm ompT hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal λ</i> (DE3)	Studier <i>et al.</i> , 1986
<i>Escherichia coli</i> K12 ER2508	<i>F'</i> <i>ara-14 leuB6 fhuA2</i> Δ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>lacY1 lon::miniTn10</i> (Tet <sup>R</sup> ) <i>glnV44 galK2 rpsL20</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>xyl-5 mtl-5</i> Δ( <i>malB</i> ) <i>zjc::Tn5</i> (Kan <sup>R</sup> ) Δ( <i>mcrC-mrr</i> ) <sub>HB101</sub>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lac<sup>f</sup>Z</i> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene, Cedar Creek
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lac<sup>f</sup>Z</i> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene, Cedar Creek

### III.2.2. Hefestämme

**Tab. 7** In dieser Arbeit verwendete Hefestämme

Nr.	Bezeichnung	Genotyp	Quelle
YSM304	<i>RS453n</i>	<i>MAT α ade2, his3, leu2, trp1, ura3</i>	Betz <i>et al.</i> , 2004
YSM326	<i>xpo1-1</i>	<i>Mat a ura3, trp1, his3, leu2, ade2, can1, xpo1::kanMX pASZ11-xpo1-1</i>	Künzler <i>et al.</i> , 2000
YSM330	<i>pse1-1</i>	<i>PSY580 Mat a ura3, leu2, trp1, GAL, pse1::HIS3 + pRS306-pse1-1</i>	Seedorf und Silver, 1997
YSM332	<i>kap123Δ</i>	<i>W303 Mat a ura3, leu2, trp1, GAL, kap123::HIS3</i>	Seedorf und Silver, 1997
YSM338	<i>pse1-1/kap123Δ</i>	<i>PSY580 Mat a, ura3, leu2, trp1, GAL, kap123::HIS3</i>	Seedorf und Silver, 1997

III. Material und Methoden

YSM344	<i>asr1Δ</i>	<i>Mat α, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, asr1::HIS3</i>	Betz <i>et al.</i> , 2004
YSM575	AH109	<i>MAT a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub><sup>-</sup>, GAL1<sub>TATA</sub><sup>-</sup>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub><sup>-</sup> GAL2<sub>TATA</sub><sup>-</sup>, ADE2 URA3::MEL1<sub>UAS</sub><sup>-</sup> MEL1<sub>TATA</sub><sup>-</sup>-lacZ, MEL1</i>	BD Biosciences
YSM586	<i>rtr1Δ</i>	BY4741; <i>Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YER139c::kanMX4</i>	EUROSCARF, Frankfurt
GSY170	W303	<i>Mat a ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 ade2-1 his3-11, 15 can1-100</i>	G. Fink
GSY501	<i>kap114Δ</i>	<i>Mat α ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap114::TRP1</i>	Greiner <i>et al.</i> , 2004
GSY517	<i>kap114Δ/ kap120Δ</i>	<i>Mat α ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap114::LEU2, kap120::TRP1</i>	Caesar <i>et al.</i> , 2006
GSY519	<i>kap114Δ/ sxm1Δ</i>	<i>Mat α ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap114::LEU2, sxm1::HIS3</i>	Fries <i>et al.</i> , 2007
GSY 533	<i>kap114Δ/ nmd5Δ/ sxm1Δ</i>	<i>Mat α ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap114::LEU2, nmd5::TRP1, sxm1::HIS3</i>	Fries <i>et al.</i> , 2007
GSY 537	<i>sxm1Δ/ nmd5Δ/ kap120Δ</i>	<i>Mat α ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, sxm1::HIS3, nmd5::TRP1, kap120::URA3</i>	Fries <i>et al.</i> , 2007
GSY 839	<i>kap114Δ/ kap123Δ</i>	<i>Mat α ura3, leu2, his3, trp1, kap123::TRP1, kap114::LEU2</i>	Greiner <i>et al.</i> , 2004
GSY 843	<i>pse1-1/ kap114Δ</i>	<i>Mat a ura3, leu2, trp1, pse1-1, kap114::LEU2</i>	Greiner <i>et al.</i> , 2004
GSY 970	<i>pse1-1/ kap104Δ</i>	<i>Mat a ura3, leu2, trp1, pse1-1, kap104::TRP1</i>	Greiner <i>et al.</i> , 2004
GSY 1095	<i>rs11-1</i>	<i>Mat a ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 ade2-1 his3-11, 15 can1-100, rna1-1, 2μ URA3 ADE3 RNA1, rs11-1</i>	Koepp <i>et al.</i> , 1996

### III.3 Kultivierung und Nährmedien

#### III.3.1. Kultivierung von Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB-Medium) oder NZY<sup>+</sup>-Medium wurde autoklaviert und nach Abkühlen unter 60°C je nach Selektionsanforderung mit adäquaten Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin) supplementiert. Zur Kultivierung von Bakterien wurde das Medium mit Zellen einer Plattenkultur oder mit einer Flüssig-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 U/min) inkubiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Agar-Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 60°C, wurde je nach Selektionsanforderung mit adäquaten Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin) supplementiert. Es wurden etwa 20 ml in sterile 9,4 cm Petrischalen gegossen.

##### Luria-Broth-Medium:

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 7,2	

##### NZY<sup>+</sup>-Medium:

10 g	NZ Amin (Casein Hydrolysat)
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
12,5 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
12,5 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
10 ml	2 M Glucose
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 7,5	

Alle Antibiotika wurden als 1.000 x Stocklösung angesetzt und sterilfiltriert. Die Stocklösungen wurden aliquotiert und die Aliquots bei -20°C gelagert.

1.000 x Ampicillin: 100 mg/ml (Endkonzentration: 100 µg/ml)

1.000 x Kanamycin: 25 mg/ml (Endkonzentration: 25 µg/ml)

#### III.3.2. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Je nach Anforderung wurde YPD-Medium (Yeast Pepton Dextrose), SDC-„Dropout“-Medium (Synthetic Dextrose Complete) oder Raffinose-Selektivmedium hergestellt und autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurde es mit Hefezellen einer Plattenkultur oder einer Flüssig-Vorkultur angeimpft und für etwa 16 h unter Schütteln (180 U/min) bei 30 °C inkubiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Agar-Agar zugesetzt.

**YPD-Medium:  
(Yeast Pepton Dextrose)**

10 g	Hefeextrakt
20 g	Pepton
20 g	Glucose
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 5,5	

**SDC-„Dropout“-Medium:  
(Synthetic Dextrose Complete)**

20 g	Glucose
6,75 g	yeast nitrogen base w/o amino acids
2 g	complete supplement mixture –leu –trp –his –ade –ura (CSM-5)
je 10 ml	100 x Aminosäure/Nukleinbase-Stammlösung (Leu, Trp, His, Ade, Ura)
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 5,5	

**Raffinose-Selektivmedium:**

20 g	Raffinose
6,75 g	yeast nitrogen base w/o amino acids
2 g	complete supplement mixture –leu –trp –his –ade –ura (CSM-5)
je 10 ml	100 x Aminosäure/Nukleinbase-Stammlösung (Leu, Trp, His, Ade, Ura)
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 5,5	

Den Selektivmedien wurden jeweils die benötigte Menge an 100 x konzentrierter Aminosäure-/Nukleinbase-Stammlösung zugesetzt, um das entsprechende „Dropout“-Medium zu erhalten. Diese Stammlösungen wurden gemäß Tabelle 8 angesetzt und sterilfiltriert.

**Tab. 8** Konzentrationen der 100 x Aminosäure-/Nukleinbase-Stammlösungen

Aminosäure/ Nukleinbase	Konzentration [g/200ml]	Konzentration [µM]
L-Leucin	2,63	100
L-Tryptophan	1,64	40
L-Histidin	4,20	100
L-Adenin	1,10	30
L-Adenin	1,10	30
L-Uracil	0,45	20

### III.4. Zellbiologische Methoden

#### III.4.1. Transformationsmethoden

##### III.4.1.1. Präparation $\text{CaCl}_2$ kompetenter *E. coli* - Zellen

(Methode nach Hanahan, 1983)

20 ml TYM-Medium wurden in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 50  $\mu\text{l}$  einer entsprechenden Übernachtskultur von *E. coli* - Zellen angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (200 U/min) inkubiert, bis die Kultur eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bis 0,8 erreicht hatte. Dann wurde mit TYM-Medium auf 100 ml aufgefüllt und in einem 2000 ml-Erlenmeyerkolben erneut bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Nach Zugabe von 400 ml TYM-Medium wurde nochmals bei 37 °C unter Schütteln inkubiert bis die Bakterienkultur eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 erreicht hatte. Im Anschluss daran wurde die Kultur durch Schwenken in einem NaCl/Eiswasserbad rasch abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4.000 x g und 4 °C geerntet (J-20XP, Rotor JA10). Das Bakterienpellet wurde sorgsam in 100 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert und erneut bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TfBII-Puffer aufgenommen und sofort in 500 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterienzellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

##### TYM-Medium:

2 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
2 g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
ad 1 l	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
⇒ pH 7,2	

##### TfBI-Puffer:

30 mM	Kaliumacetat
50 mM	$\text{MnCl}_2$
100 mM	KCl
10 mM	$\text{CaCl}_2$
15 % (v/v)	Glycerin

##### TfBII-Puffer:

10 mM	Na-MOPS, pH 7,0
75 mM	$\text{CaCl}_2$
10 mM	KCl
15 % (v/v)	Glycerin

### **III.4.1.2. Transformation CaCl<sub>2</sub> kompetenter *E. coli* - Zellen**

Aliquots der bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (1 µg einer Midi-Präparation, 5 µg einer Mini-Präparation oder 20 µl eines Ligationsansatzes) wurde zu jeweils 100 µl der kompetenten Bakterien gegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C und erneut eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz eine Stunde lang bei 37 °C unter Schütteln (Eppendorf Thermomixer comfort, 700 U/min) inkubiert. Der Ansatz wurde pelletiert (1 min, 5.000 x g) und das Pellet in 80 µl LB-Medium aufgenommen und mittels Einmal-Impföse auf einer entsprechenden LB-Agar-Selektivplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **III.4.1.3. Präparation elektrokompenter *E. coli* - Zellen**

In einem 2000 ml-Kolben wurden 400 ml LB-Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur der entsprechenden Bakterienzellen angeimpft und unter Schütteln (200 U/min) bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 kultiviert. Im Anschluss daran wurde die Kultur für 30 min rasch in einem NaCl/Eiswasserbad abgekühlt und für 15 min bei 2.000 x g und 4 °C geerntet (J-20XP, Rotor JA10). Das Zellpellet wurde auf Eis in 400 ml eiskaltem, sterilem Wasser aufgenommen und erneut für 15 min bei 2.000 x g und 4 °C pelletiert. Danach wurde das Zellpellet in 20 ml einer eiskalten, 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert und erneut für 15 min bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Bakterienpellet in 2 ml der eiskalten, 10%-igen Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots von 40 µl Bakteriensuspension in Eppendorf-Reagenzgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die Aliquots dann bei -80 °C gelagert.

### **III.4.1.4. Transformation elektrokompenter *E. coli* - Zellen (Elektrotransformation)**

Es wurden je 40 µl elektrokompenter *E. coli* - Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µg der zu transformierenden DNA bzw. 1 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Der

Transformationsansatz wurde in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2mm, BioRad) überführt. Die Elektroporation wurde mit einem GenePulser (BioRad) bei 2.5 kV, 400  $\Omega$  und 25  $\mu$ F durchgeführt. Der Inhalt der Elektroporationsküvette wurde im Anschluss rasch in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium (37°C) überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (Eppendorf Thermomixer comfort, 700 U/min) inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 3,5 min bei 4.000 x g geerntet, in 100  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und schließlich auf LB-Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### III.4.1.5. Herstellung Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen erfolgte nach einer abgewandelten Methode nach Ito *et al.* (1983). 50 ml der entsprechenden Hefekultur wurden bei 30 °C unter Schütteln (180 U/min) bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 – 1,0 kultiviert. Pro Transformationsansatz wurden dann vier OD<sub>600</sub> für fünf Minuten bei 1.600 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml Tris/HCl (10 mM, pH 7,4) resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 1.600 x g pelletiert. Das Hefepellet wurde dann in 10 ml LiT mit 100  $\mu$ l DTT (1 M Lösung) aufgenommen und für 40 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut für fünf Minuten bei 1.600 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 150  $\mu$ l LiT pro Transformationsansatz aufgenommen und bis zu seiner Weiterverarbeitung für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert.

**LiT-Puffer:**  
**(Lithiumacetat-Tris)**

100 mM	Lithiumacetat
10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
⇒ autoklaviert	

#### III.4.1.6. Transformation Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen

Je Transformationsansatz wurden 5  $\mu$ l Heringsspermien-DNA (Carrier), 1  $\mu$ g DNA einer Midi-Präparation (bzw. 4  $\mu$ g DNA einer Mini-Präparation) und 150  $\mu$ l der Lithiumacetat-kompetenten Hefezellen in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Ansätze wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss daran wurden je 300  $\mu$ l PEG-LiT zugegeben und erneut für zehn Minuten auf dem Drehrad inkubiert. Nun wurden die Ansätze mit 15  $\mu$ l DMSO versetzt und für drei Minuten bei

42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, wobei die DNA in die Hefezellen aufgenommen wurde. Danach wurden rasch 500 µl Tris/HCl (10 mM, pH 7,4) zugegeben und für fünf Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µl abgenommen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert und auf adäquaten SDC-Selektivplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für etwa drei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

**PEG-LiT:**

2 g	Polyethylenglycol 4000
2 ml	LiT
⇒ autoklaviert	

Zur **Herstellung der „Carrier“-DNA** wurden 10 mg/ml „Salmonsperm“-DNA (Sigma) in TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst. Anschließend wurde die DNA durch Ultraschall-Behandlung in etwa 2 kbp große Stücke fragmentiert. Hierbei wurde die DNA nach jeder Beschallung durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Im Anschluss wurde die DNA durch Inkubation bei 98°C und darauf folgendem Abkühlen auf Eis denaturiert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

## **III.5. Molekularbiologische Methoden**

### **III.5.1. Isolierung von DNA**

#### **III.5.1.1. Plasmid-DNA-Mini-Präparation aus Bakterienzellen**

Mit Hilfe dieser Methode können analytische Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* - Zellen isoliert werden. Die Plasmid-DNA wird nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durch Aufschluss, Denaturierung der Bakterienproteine und anschließender Präzipitation aus den Bakterienzellen isoliert. Die hierzu verwendeten Puffer (S1, S2, S3) wurden dem Nucleobond® PC100 Kit von Macherey-Nagel entnommen.

2 ml der Plasmid-DNA tragenden Bakterienkultur wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 U/min) in LB-Selektivmedium kultiviert. 1,5 ml der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 3,5 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer S1 resuspendiert. Zu der Suspension wurden 150 µl Puffer S2 (Lysepuffer) gegeben. Um sicherzustellen, dass die Zelllyse vollständig abläuft, wurde der Ansatz für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Klärung des Ansatzes wurden

150 µl Puffer S3 zugegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Dabei sollte eine weiße Ausflockung auftreten, die auf denaturierte Proteine mit daran assoziierter genomischer DNA zurückzuführen ist. Im Anschluss wurde für 15 min bei 16.400 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 300 µl Isopropanol zugegeben um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 16.400 x g wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 16.400 x g wurde der Überstand erneut vorsichtig abgenommen, das DNA-Pellet für fünf Minuten in einer SpeedVac (GMI) getrocknet und schließlich in 40 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

**Puffer S1:  
(Resuspensionspuffer)**

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

**Puffer S2:  
(Lysepuffer)**

200 mM	NaOH
1 % (w/v)	SDS

**Puffer S3:  
(Neutralisationspuffer)**

2,8 M	Kaliumacetat
⇒ pH 5,1	

#### III.5.1.2. Plasmid-DNA-Midi-Präparation aus Bakterienzellen

Präparative Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Nucleobond® PC100 Kits von Macherey-Nagel aus Bakterienzellen isoliert. Hierzu wurden 50 ml der Plasmid-DNA tragenden Bakterienkultur in LB-Selektivmedium über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden für 20 min bei 4.000 x g geerntet und das Zellpellet in 4 ml Puffer S1 und 10 µl RNase A (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Es wurden 4 ml Puffer S2 (Lysepuffer) zugegeben und der Ansatz wurde mehrmals vorsichtig invertiert und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei es zur Zelllyse kam und der Ansatz klar und viskos wurde. Anschließend wurden 4 ml Puffer S3 (Neutralisationspuffer) zugegeben, mehrmals invertiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei fielen Proteine und daran assoziierte genomische DNA aus. Währenddessen wurde eine Nucleobond® AX100 Säule mit 2,5 ml Puffer N2 (Äquilibrierungspuffer) äquilibriert. Das bakterielle Lysat wurde filtriert und das Filtrat wurde auf die AX100 Säule geladen, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Die Säule wurde mit 10 ml Puffer N3 (Waschpuffer) gewaschen und die gebundene Plasmid-DNA schließlich mit 5 ml Puffer N5 (Elutionspuffer) eluiert. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Die Lösung wurde für 30 min bei

15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 150 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **III.5.1.3. Isolierung genomischer DNA aus Hefe**

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen wurden 5 ml einer Übernachtskultur für fünf Minuten bei 1.500 x g zentrifugiert. Nachdem das Pellet einmal mit Wasser gewaschen wurde, wurde es in 200 µl Puffer Lys (1% (w/v) SDS; 2% (v/v) Triton X-100; 0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µl Glas Beads wurden zugegeben. Der Ansatz wurde fünf Minuten lang stark gevortext. Im Anschluss wurden 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA) zugegeben und für fünf Minuten bei 16.100 x g zentrifugiert. Der Überstand (wässrige Phase) wurde danach zu 400 µl Chloroform gegeben und gemischt. Es wurde erneut für fünf Minuten bei 16.100 x g zentrifugiert. Der Überstand (wässrige Phase) wurde nun zu 1 ml 100% Ethanol gegeben und gemischt. Nun wurde für 20 min bei 16.100 x g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, und das Pellet in 800 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### **III.5.2. Bestimmung der DNA-Konzentration**

DNA- und RNA-Basen weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Diese Tatsache kann man sich zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades von DNA zu Nutze machen. Die Absorption einer 1:100 verdünnten DNA-Lösung wurde bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette im Spektralphotometer (Pharmacia Biotech) gemessen. Aus der Beziehung  $1 \text{ OD}_{260}$  entspricht 50 µg dsDNA/µl bei einem Zentimeter Schichtdicke (Sambrook und Gething, 1989) konnte die DNA-Konzentration der Lösung ermittelt werden. Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  stellt ein Maß für die Reinheit der DNA dar und sollte zwischen 1,8 – 1,95 liegen. Niedrigere Werte lassen auf Verunreinigung durch Proteine, höhere Werte auf Verunreinigung durch RNA oder auf Denaturierung der DNA schließen.

Alternativ wurde die OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> einer unverdünnten DNA-Lösung, sowie ihr Quotient mittels einer NanoDrop Apparatur (Thermo Fisher Scientific) ermittelt und ausgewertet.

### III.5.3. Restriktionsverdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Hydrolyse von DNA wurden kommerziell erhältliche Typ II-Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die kurze Sequenzen innerhalb der DNA erkennen und sie durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen schneiden. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß der Herstellerangaben eingehalten. Die zu hydrolysierende DNA wurde bei 37 °C mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, Restriktionspuffer und den entsprechenden Endonukleasen inkubiert. Kontrollverdau von Mini-Präparationen wurden wie folgt pipettiert:

**Kontrollverdau von DNA-Mini-Präparationen:**

3 µg	DNA (Mini-Präparation)
2 µl	10 x Restriktionspuffer
3 U	je Restriktionsendonuklease
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Der Ansatz wurde für 35 min bei 37°C inkubiert und anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Zur präparativen Restriktion von Plasmiden wurde der Ansatz wie folgt pipettiert:

**Präparativer Verdau von DNA-Midi-Präparationen:**

7 µg	DNA (Midi-Präparation)
8 µl	10 x Restriktionspuffer
20 U	je Restriktionsendonuklease
ad 80 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Der Ansatz wurde für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel präpariert.

### III.5.4. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Plasmide, die durch Endonukleasen linearisiert worden sind, tragen an ihren freien 5'-Enden eine Phosphatgruppe. Um eine intramolekulare Religation des Plasmids zu vermeiden,

wurden die Phosphatreste mittels der alkalinen Phosphatase Calf Intestinal (CIAP) entfernt. Hierzu wurde zu 80 µl eines präparativen Verdauung 1 U CIAP (MBI Fermentas) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der CIAP erfolgte durch 15 minütige Inkubation bei 85 °C. Alternativ wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Fragmente mittels Gel-Extraction-Kit (Qiagen) isoliert.

#### **III.5.5. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten durch die horizontale Agarose-Gelelektrophorese macht man sich das unterschiedliche Migrationsverhalten der Fragmente in einem Gel zu Nutze. Hierbei werden diese aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrates in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Niedermolekulare Fragmente durchwandern das Gel schneller als höhermolekulare. Dem Gel wird der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA-Fragmente bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 243 nm sichtbar zu machen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarosegele der Konzentration 1,0 % (w/v) bis 2,0 % (w/v) angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 7,2; 1 mM EDTA) suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung unter 60°C wurden 10 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben, anschließend wurde die Lösung in eine Gelform mit Taschenkamm (Taschengröße analytisches Gel: 30 µl, präparatives Gel: 120 µl) gegossen. Nach vollständiger Auspolymerisation des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer, die mit TAE-Puffer gefüllt wurde, gelegt. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 6 x DNA-Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF; 40 % (w/v) Saccharose) versetzt, auf der Kathodenseite in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von konstant 120 V aufgetrennt. Um eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurde parallel zu den Proben auch ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Je nach Fragmentgrößen wurde hierzu die 100 bp Leiter (Invitrogen) oder der λ-Sty-DNA-Standard (MBI Fermentas) verwendet. Die Visualisierung der DNA-Proben erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Bio-Rad).

### **III.5.6. DNA-Präparation aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen. Dieses Kit ermöglicht die Präparation von 70 bp bis 10 kbp großen DNA-Fragmenten. Bei der Präparation bindet die DNA in Gegenwart chaotroper Salze an eine Silika-Matrix. Die Elution erfolgt dann bei niedrigen Salzkonzentrationen. Nach horizontaler Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Banden auf einem UV-Tisch visualisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Massen der Gelstücke bestimmt. Die Gelstücke wurden für 10 min bei 50 °C in 300 µl Puffer QG pro 100 mg Masse inkubiert, bis sich die Gelstücke vollständig gelöst hatten. Bei DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp oder größer als 4 kbp waren, wurden 100 µl Isopropanol pro 100 µg Gel hinzu pipettiert. Die Ansätze wurden auf QIAquick Zentrifugationssäulchen aufgetragen und für eine Minute bei 15.700 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Danach wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zur vollständigen Entfernung des Puffers erneut für eine Minute bei 15.700 x g zentrifugiert. Die an die Silika-Matrix gebundene DNA wurde für eine Minute mit Puffer EB inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für eine Minute bei 15.700 x g in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

### **III.5.7. DNA-Präparation durch Fällung mit Natriumacetat und Ethanol**

Das „QIAquick Gel Extraction Kit“ ermöglicht lediglich eine Präparation von DNA-Fragmenten, die größer als 70 bp sind. Für kleinere Fragmente musste eine andere Methode gewählt werden. Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die entsprechenden Gelbanden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach dem Auftauen wurden die Gelstücke in Spin-X Zentrifugenfilter (Costar) überführt und für 30 min bei 15.700 x g zentrifugiert. Das Eluat der Zentrifugation wurde mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (100%) aufgenommen und für 30 min bei -80 °C inkubiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei 15.700 x g und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und in 30 µl Tris-HCl-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen.

### III.5.8. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) erlaubt es, spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren (Mullis *et al.*, 1987). Zentrale Komponente ist hierbei eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine komplementäre Kopie zu einem Template-Strang erzeugen kann. Das in der Regel doppelsträngige DNA-Template muss dazu erst bei 95°C denaturiert werden. Deshalb ist der Einsatz einer temperaturbeständigen Polymerase wichtig. Ursprünglich bediente man sich deshalb der aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnenen *Taq*-Polymerase. Aufgrund ihrer fehlenden Korrekturlesefunktion und daraus resultierenden hohen Fehlerraten wurde im Zuge dieser Arbeit überwiegend die „ProofStart“-Polymerase (Qiagen) eingesetzt. Ihre Korrekturlesefunktion erkennt und ersetzt fehlerhafte Nukleotide. Da Polymerasen für ihre Funktion ein freies 3'-OH Ende benötigen, setzt man in der Reaktion Primer ein. Diese Oligonukleotide sind komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Oftmals sind sie so designed, dass ihr 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle aufweist, damit die PCR-Produkte in einen entsprechenden Vektor inkloniert werden können. Nach erfolgter Denaturierung der Template-DNA wird die Temperatur abgesenkt, so dass die Primer sich an die Template-DNA anlagern können (Annealing). Nun steht der Polymerase eine freie 3'-OH Gruppe zur Verfügung, so dass sie einen komplementären Strang synthetisieren kann (Elongation). Die „ProofStart“-Polymerase hat ihre größte Aktivität bei 72°C. Diese Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wurden in 30 – 35 Zyklen wiederholt, was in einer 10<sup>6</sup> fachen Amplifikation der Template-DNA resultiert. PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema pipettiert:

**PCR-Ansatz:**

0,5 µl	5'-Primer (250 µM)
0,5 µl	3' Primer (250 µM)
10 µl	10 x PCR-Puffer
8 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1 µl	DNA-Template (10 ng/µl)
0,7 µl	„ProofStart“-Polymerase (2,5 U/µl)
79,3 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

**PCR-Programm:**

30-35 Zyklen	}	95 °C	5 min	Aktivierung „ProofStart“
		94 °C	1 min	Denaturierung
		48 °C-63 °C	1 min	Primer Annealing
		72 °C	1 min	Elongation
			/800 bp	
		72 °C	10 min	terminale Elongation

### III.5.9. Reinigung von PCR-Produkten

Um nach einer PCR Template-DNA, Primer, dNTPs und die Polymerase wieder zu entfernen, wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und wie zuvor beschrieben mittel „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aus dem Gel präpariert.

### III.5.10. Annealing von kurzen Oligonukleotiden

Zur Klonierung kurzer DNA-Fragmente in Vektoren wurde nicht mit der PCR-Technik gearbeitet, sondern zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide wurden direkt in einer Annealing-Reaktion eingesetzt. Hierbei kann man sich durch entsprechendes Primer-Design den Verdau durch Restriktionsenzyme ersparen. Zur Annealing-Reaktion wurden die komplementären Oligonukleotide in equimolarer Konzentration in Annealing-Puffer gelöst, auf 95 °C erhitzt und über einen Zeitraum von einer Stunde langsam auf RT abgekühlt. Diese Reaktion wurde direkt für die Ligation von DNA-Fragmenten eingesetzt.

#### Annealing-Puffer:

10 mM	Tris
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA
⇒ pH 7,5	

### III.5.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Um durch Restriktion hergestellte DNA-Fragmente oder PCR-Produkte in einen identisch geschnittenen Vektor zu klonieren, müssen die Enden von Fragment und Vektor kovalent miteinander verknüpft werden. Die T4 DNA-Ligase verbindet 3'-OH Gruppen mit 5'-Phosphatgruppen in Abhängigkeit von ATP. Die Konzentrationen von DNA-Fragmenten und linearisierten Vektoren wurden durch gelelektrophoretische Analyse kleiner Aliquots abgeschätzt. Für eine effiziente Ligation sollte das molare Verhältnis von „Insert“ zu Vektor etwa 5:1 bis 10:1 betragen. Der Ligationsansatz wurde folgendermaßen pipettiert:

**Ligationsansatz:**

x µg	linearisierte Vektor-DNA
y µg	„Insert“-DNA
3 µl	10 x Ligationspuffer
0,4 U	T4 DNA-Ligase
ad 30 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

**III.5.12. Zielgerichtete Mutagenese von Vektoren**

Um gezielt Mutationen in die Nukleinsäuresequenz von Genen einzuführen, wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) oder für große Vektoren das „QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) eingesetzt. Hierzu designed man zwei komplementäre Primer, die beide die gewünschte Mutation tragen und die komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen des Vektors sind. Nach der Denaturierung des Template-Plasmids lagern sich die Mutation-tragenden Primer an die zu ihnen komplementäre Sequenz des Plasmids an. In einer Polymerase-Reaktion amplifiziert die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase ausgehend von den 3'-OH Enden der Primer das gesamte Plasmid. Die methylierte parentale DNA, die keine Mutation enthält, wird durch *DpnI* verdaut und die neu synthetisierte DNA mit der gewünschten Mutation wird in XL1-Blue superkompetente (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit) oder XL10-Gold ultrakompetente Bakterienzellen (QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit) transformiert. Die zielgerichtete Mutagenese wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde wie folgt pipettiert.

**Mutagenese-Ansatz:**

0,5 µl	10 x Reaktionspuffer
50 ng	dsDNA Template
125 ng	5'-Primer
125 ng	3'-Primer
1 µl	dNTP Mix
3 µl	QuikSolution *
1 µl	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

\* nur für das QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit

**PCR-Programm:**

Punktmutation: 12 Zyklen  
 Austausch einer As: 16 Zyklen  
 Austausch mehrerer As oder Insertion: 18 Zyklen

95 °C	30 s
-----	
95 °C	30 s
55 °C	1 min
68 °C	1 min / 1.000 bp

Nach der PCR wurde 1  $\mu\text{l}$  *DpnI* direkt in den Ansatz pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die parentale, methylierte DNA zu verdauen. Zur Transformation wurden XL1-Blue superkompetente oder XL10-Gold ultrakompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu\text{l}$  des *DpnI* behandelten Ansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Nun wurden 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtes NZY<sup>+</sup>-Medium zugegeben und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (250 U/min) inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf entsprechende LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Kolonien in Flüssigmedium kultiviert und eine DNA-Mini-Präparation durchgeführt.

#### **III.5.13. Sequenzierung von DNA**

Um die Korrektheit der Nukleinsäuresequenz von Plasmiden zu überprüfen, bzw. um zu überprüfen ob eine Mutagenese erfolgreich war, wurden alle klonierten Vektoren vom Institut für Immunologie und Genetik, Dr. Thiele, Kaiserslautern sequenziert.

### **III.6. Biochemische Methoden**

#### **III.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE stellt eine Möglichkeit dar, Proteine in einer Probe in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts zu trennen (Laemmli, 1970). Dazu werden die aufzutrennenden Protein-Proben für fünf Minuten bei 98°C in einem speziellen Puffer, dem Laemmli Probenpuffer, inkubiert. Das in dem Probenpuffer enthaltene DTT (Dithiothreitol) weist reduzierende Eigenschaften auf und spaltet die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) spaltet nicht kovalente Bindungen der Proteine. Da es ein anionisches Detergenz ist verleiht es den Proteinen zudem eine gleichmäßige negative Ladung. Diese Tatsache erlaubt nun die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Hierbei durchwandern hochmolekulare Proteine die Poren eines Gels langsamer, als niedermolekulare Proteine. Nach der Auftrennung können die Proteine im Gel durch Färbung mit Coomassie-Brillant-

Blau visualisiert werden oder sie können zur näheren Analyse auf eine Membran geblottet und in einem Western Blot analysiert werden.

**Laemmli Probenpuffer:  
(4x konzentriert)**

13 ml	1M Tris-HCl, pH 6,8
4 g	SDS
20 ml	100% Glycerin
20 mg	Bromphenolblau
ad 90 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
10 ml	1 M DTT

**III.6.1.1. Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden SDS-Polyacrylamid-Gele unterschiedlicher Acrylamid Konzentrationen hergestellt. Die Herstellung eines solchen Geles erfolgte anhand einer Polymerisationsreaktion von Acrylamid. Diese Reaktion läuft als Radikalkettenreaktion ab. APS (Ammoniumpersulfat) dient hierbei als Aktivator, der in Wasser freie Radikale bildet. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) wird zusätzlich zugegeben. Es unterstützt die Bildung freier Radikale und stabilisiert diese. In dieser Arbeit kamen überwiegend diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele zum Einsatz. Diese bestehen aus einem engporigen Trenngel (pH 8,0), das von einem weitporigen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet wurde. Somit laufen die Proben erstmal ins Sammelgel ein und werden am Übergang zum Trenngel zum einen durch den pH Sprung, zum anderen durch die geringere Porengröße fokussiert. Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten gesäubert und entfettet und in einem Gießstand (Bio-Rad) fixiert. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 9 zu sehen.

**Tab. 9** Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Substanz		Trenngel					Sammelgel 5%
		6%	8%	10%	12%	15%	
Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	[ml]	2,0	2,7	3,33	4,0	5,0	0,6
Trenngelpuffer	[ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	--
Sammelgelpuffer	[ml]	--	--	--	--	--	1,0
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	[ml]	5,5	4,8	4,17	3,5	2,5	2,4
10% APS	[µl]	35	35	35	35	35	25
TEMED	[µl]	17	17	17	17	17	25

Nach dem Einfüllen der Trenngel-Lösung wurde diese sofort mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser entfernt, die Sammelgel-Lösung wurde auf das Trenngel aufgetragen und die Probenkämme wurden eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels konnte das Gel wenige Tage bei 4°C feucht gelagert werden.

**Trenngelpuffer:**

181,7 g	Tris
3 g	EDTA
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	⇒ pH 8,8 einstellen mit HCl
4 g	SDS

**Sammelgelpuffer**

60,6 g	Tris
3 g	EDTA
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	⇒ pH 6,8 einstellen mit HCl
4 g	SDS

#### III.6.1.2. Durchführung der SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden Mini-Gelkammern von Bio-Rad verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden zuvor in entsprechender Menge an 4x konzentriertem Laemmli Probenpuffer bei 98°C für fünf Minuten inkubiert, danach auf Eis abgekühlt und für eine Minute bei 16.100 x g abzentrifugiert. Die vorbereiteten SDS-Gele wurden in die Gelkammern eingesetzt und diese wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die vorbereiteten Protein-Proben wurden anschließend in die Taschen der SDS-Gele geladen. Um später das Molekulargewicht einzelner Proteine bestimmen zu können, wurde parallel ein Protein-Größenstandard mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann zunächst bei 15 mA pro Gel, bis die Proben ins Sammelgel eingelaufen waren, danach wurde auf 25 mA pro Gel erhöht. Die SDS-PAGE wurde gestoppt, nachdem die Bromphenolblau Front des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

**SDS-Laufpuffer:  
(5x konzentriert)**

75,5 g	Tris
360 g	Glycin
18,6 g	EDTA
25 g	SDS
ad 5 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

### III.6.1.3. Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

#### Herkömmliche Coomassie Brilliant Blue Färbung

Zur Visualisierung der Proteinbanden in einem SDS-Gel wurden diese mit einer Coomassie Färbelösung inkubiert. Diese enthält u.a. Coomassie® Brilliant Blue R250 und Coomassie® Brilliant Blue G250. Diese Farbstoffe färben Proteine unspezifisch. Nach 20 minütiger Inkubation in der Coomassie Färbelösung wurden die Gele in Entfärber 1 gewaschen, um nicht gebundenes Coomassie Brilliant Blue auszuwaschen. Diese Färbung erlaubt die Detektion von Proteinbanden mit mehr als 100 ng Protein.

#### Coomassie Färbelösung:

0,2 % (w/v)	Coomassie® Brilliant Blue R250
0,005 % (w/v)	Coomassie® Brilliant Blue G250
40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

#### Entfärber 1:

10 % (v/v)	Essigsäure
40 % (v/v)	Methanol
2 % (v/v)	Glycerin

#### Kolloidale Coomassie Brilliant Blue Färbung („Blue Silver“)

Deutlich sensitiver als die herkömmliche Coomassie Färbung ist die kolloidale Coomassie Färbung. So ermöglicht sie die Detektion von etwa fünf mal weniger Protein als die herkömmliche Färbung. Dazu wurden die Gele über Nacht in „Blue Silver“ Lösung inkubiert und am nächsten Tag für zweimal 30 min in Wasser gewaschen. Diese Farbe-Methode wurde für Gele verwendet, die für massenspektrometrische Analysen eingesetzt wurden.

#### „Blue Silver“ Lösung:

0,12 % (w/v)	Coomassie® Brilliant Blue G250
10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
10 % (v/v)	Phosphorsäure
20 % (v/v)	Methanol

### III.6.2. Western Blot

Nachdem Proteine in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, können sie in einem Western Blot immunologisch detektiert werden. Dazu werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Bei diesem Vorgang wird

das SDS von den Proteinen abgewaschen, wodurch sie teilweise renaturieren können. Mit spezifischen Antikörpern ist somit die Detektion bestimmter Proteine möglich.

Im Flüssigtransferverfahren wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine in einer Transferkammer (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dazu wurde ein elektrisches Feld für eine Stunde bei 100 V und 250 mA angelegt. Dies geschah in einer Transferkammer, die mit Transferpuffer gefüllt war. Um einen zu starken Temperaturanstieg zu vermeiden, wurde die Kammer mit Kühlakkus gekühlt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran in Ponceau-Lösung gefärbt, der Größenstandard mit einem Bleistift markiert und wieder in PBS-Puffer entfärbt. Nichtspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation für eine Stunde in Blockierlösung blockiert. Danach wurde die Membran über Nacht mit spezifischen Antikörpern in Blockierlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper entfernt. Es wurde dreimal fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, dann wurde für zwei bis drei Stunden mit Sekundäantikörpern in Blockierlösung inkubiert. Die Sekundäantikörper waren, um eine Detektion zu ermöglichen, an Enzyme gekoppelt (Peroxidase oder alkalische Phosphatase). Nachdem die Sekundäantikörper abgenommen wurden, wurde die Membran erneut für dreimal fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Die Detektion wurde mit Hilfe des ECL Plus- (GE-Healthcare), Lumilight- (Roche) oder Immun-Star-Systems (Bio-Rad) laut Angaben der Hersteller durchgeführt. Alternativ wurde auch mit Hilfe der weniger sensitiven Chloronaphtol-Färbung detektiert. Diese Reaktion wurde durch Waschen in Wasser gestoppt.

**Transferpuffer:  
(5x konzentriert)**

75,75 g	Tris
360 g	Glycin
ad 5 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

**Transferpuffer:  
(1x konzentriert)**

20 % (v/v)	5x Transferpuffer
20 % (v/v)	Methanol

**PBS-Puffer:  
(10x konzentriert)**

90 g	NaCl
3,2 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
17,8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 7,3	

**Blockierlösung:**

5 % (w/v)	Magermilchpulver in PBS-Puffer
-----------	--------------------------------

**Chloronaphtol-Färbelösung:**

10 µl	300 mg/ml 4-Chloro-1-naphtol in Methanol
1 ml	Methanol
9 ml	PBS-Puffer
10 µl	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### III.6.3. Die rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

#### Expression

Zur Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen (GST-, His<sub>6</sub>- oder MBP-Fusionen) wurden Plasmide, die für das entsprechende Fusionsprotein kodieren, in einen geeigneten bakteriellen Expressionsstamm transformiert (BL21(DE3), ER2508 oder JM101). Von einer Übernachtskultur dieser Bakterien in adäquatem LB-Selektionsmedium wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur angeimpft (400 – 800 ml). Die Hauptkultur wurde bei 37°C unter Schütteln (200 U/min) bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 kultiviert, dann wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte je nach Fusionsprotein bei 37°C, 30°C oder RT für drei bis 6 Stunden unter Schütteln (200 U/min). Zur Ernte der Bakterien wurde die Kultur für 15 min bei 3.000 x g und 4°C zentrifugiert (J-20XP). Das Pellet wurde in 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellpellets entweder sofort zur Proteinreinigung eingesetzt oder bei -20°C gelagert. In Tabelle 10 sind die zur Expression verschiedener Fusionsproteine gewählten Bedingungen aufgelistet.

**Tab. 10** Bedingungen für die Expression der verwendeten Fusionsproteine

Fusionsprotein	<i>E. coli</i> Stamm	I n d u k t i o n		
		Dauer	Temp.	IPTG
GST-Fusionsproteine	BL21(DE3)	4 h	30°C	1 mM
His6-Fusionsproteine	BL21(DE3)	4 h	30°C	1 mM
MBP	ER2508	3h	37°C	1 mM
MBP-Fusionsproteine	ER2508	6 h	RT	0,5 mM

#### Aufreinigung

Um die rekombinant exprimierten Fusionsproteine aufzureinigen, wurden die Bakterienpellets in 20 ml Reinigungspuffer (Zusammensetzung variiert) mit Proteaseinhibitor („EDTA-free“ Protease Inhibitor, Roche) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (UP 400S Sonifier, Dr. Hielscher GmbH). Dazu wurde eine Amplitude von 45% gewählt und mit durchgängigem Puls viermal für 30 s sonifiziert. Im Idealfall sah man eine Klärung der Suspension. Im Anschluss wurde für 20 min bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde dann mit einer entsprechenden Matrix für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Für GST-

Fusionsproteine wurden 500 µl Glutathion-Sepharose, für His<sub>6</sub>-Fusionsproteine 400 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose und für MBP-Fusionsproteine 250 µl Amylose-Agarose verwendet. Die Suspension wurde auf eine Säule geladen. Nach dem Durchlauf wurde das Säulenmaterial zweimal mit 10 ml Reinigungspuffer gewaschen. Die Elution GST-getaggtter Proteine erfolgte mit Reinigungspuffer + 10 mM Glutathion in 6 Fraktionen zu je 250 µl. Die Elution His<sub>6</sub>-getaggtter Proteine erfolgte in 4 Fraktionen zu je 250µl mit Reinigungspuffer + 150 mM Imidazol und in 2 Fraktionen zu je 250 µl mit Reinigungspuffer + 500 mM Imidazol. Die Elution MBP-getaggtter Proteine erfolgte mit Reinigungspuffer + 10 mM Maltose in 10 Fraktionen zu je 250 µl. Zur Kontrolle wurde von jeder Fraktion 10 µl in einer SDS-PAGE (s. Abschnitt III.6.1.2.) analysiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gepoolt und in Aliquots bei -80°C gelagert. Die verwendeten Reinigungspuffer setzen sich wie folgt zusammen:

**Reinigungspuffer  
für GST-Fusionsproteine**

20 mM	HEPES
100 mM	Kaliumacetat
2 mM	Magnesiumacetat *
0,1 % (v/v)	Tween 20
10 %	Glycerin
⇒ pH 7,4	

\* Die Aufreinigung von GST-Cmd1p erfolgte in Abwesenheit von Magnesiumacetat

**Reinigungspuffer  
für His<sub>6</sub>-Fusionsproteine**

20 mM	HEPES
100 mM	Kaliumacetat
2 mM	Magnesiumacetat *
20 mM	Imidazol
0,1 % (v/v)	Tween 20
10 %	Glycerin
⇒ pH 7,4	

\* Die Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Cmd1p erfolgte in Abwesenheit von Magnesiumacetat

**Reinigungspuffer  
für MBP-Fusionsproteine**

20 mM	Tris-HCl
200 mM	NaCl
100 µM	ZnSO <sub>4</sub>
⇒ pH 7,4	

### **III.6.4. Synthese und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *Saccharomyces cerevisiae***

#### **III.6.4.1. Hefe-Totallysate**

Um zu analysieren, ob Hefezellen ein spezielles Protein synthetisieren, bzw. ob es in korrekter Länge synthetisiert wird, wurden von diesen Stämmen Hefe-Totallysate angefertigt und analysiert. Dazu wurden 50 ml einer Hefekultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 – 1,2 kultiviert. Zehn OD<sub>600</sub>-Einheiten wurden für fünf Minuten bei 1.500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml Wasser aufgenommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut für fünf Minuten bei 1.000 x g pelletiert. Zur Lyse der Hefezellen wurden je 200 µl 2 x Laemmli Probenpuffer (vorgeheizt) und 100 µl Glas Beads zugegeben und fünf Minuten bei 98°C gekocht. Dann wurden die Proben zehn Sekunden lang gevortext, erneut für fünf Minuten gekocht und wieder zehn Sekunden lang gevortext. Schließlich wurde für zwei Minuten bei 16.100 x g zentrifugiert und der Überstand wurde in einer SDS-PAGE analysiert.

#### **III.6.4.2. Hefe-Sphäroblastierung**

800 ml SDC-„Dropout“-Medium wurden mit den zu sphäroblastierenden Hefekulturen angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2,4 kultiviert. Durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 3.000 x g wurden die Hefezellen geerntet, in Wasser resuspendiert und erneut für zwei Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Nun wurden die Pellets in je 100 ml 100 mM Tris pH 9,4 mit 10 mM DTT resuspendiert und sieben Minuten lang unter leichtem Schütteln (65 U/min) bei RT inkubiert. Danach wurden die Hefezellen durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 3.000 x g pelletiert. Die Pellets wurden vorsichtig in 200 ml des osmotisch stabilen Verdau-Puffers (1,2 M Sorbitol; 20 mM KPi; pH 7,4) resuspendiert und mit 1,4 mg Zymolyase 100T pro Gramm Zellen versetzt. Die Zellwände der Hefen wurden für etwa 25 min bei 30°C verdaut. Zur Kontrolle des Fortschritts der Zymolyase-Reaktion wurden je 100 µl des Verdau-Ansatzes mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bzw. 1 ml 1,2 M Sorbitol gemischt und kurz geschüttelt. Bei ausreichender Sphäroblastierung wird die Zellsuspension in Wasser klar, da die Sphäroblasten hierbei einem osmotischen Druck ausgesetzt sind und platzen. Die Zellsuspension in 1,2 M Sorbitol sollte dagegen unverändert bleiben. Nach ausreichender

Sphäroblastierung wurden die Ansätze für drei Minuten bei 2°C und 1.300 x g zentrifugiert, die Sphäroblastenpellets in 45 ml Verdau-Puffer aufgenommen und erneut für drei Minuten bei 2°C und 1.300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sphäroblastenpellets wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

### III.6.4.3. Affinitätsreinigung von Protein A-Fusionsproteinen aus Hefesphäroblasten

Nach der Präparation der Hefesphäroblasten wurden diese in 35 ml Lysis-Puffer resuspendiert, dem „EDTA-free“ Protease Inhibitor (Roche Diagnostics) zugesetzt wurde. Diese wurden sofort bei 4°C in einem Dounce-Homogenisator durch 10 fache Auf- und Abbewegung homogenisiert. Das Lysat wurde sofort für zehn Minuten bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert (J-20XP). Währenddessen wurde eine Inkubationssäule (Bio-Rad) mit 250 µl IgG-Sepharose pro drei Gramm Zellen beladen. Die Säule wurde nun nacheinander mit 2 ml TST-Puffer, 1 ml Essigsäure (0,5 M; pH 3,4), 1 ml TST-Puffer und erneut 1 ml Essigsäure (0,5 M; pH 3,4) gewaschen. Danach wurde mit TST-Puffer gewaschen, bis der pH-Wert am Säulenausgang etwa 7,4 betrug. Im Anschluss wurde dann der Überstand des zentrifugierten Homogenats nach und nach auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 10 ml Lysis-Puffer und 10 ml TST-Puffer gewaschen. Um Salze auszuwaschen und den pH Wert auf 5 einzustellen, wurde mit 1 ml Ammoniumacetat (5 mM; pH 5,0) gewaschen. Die Elution der ProtA-Fusionsproteine erfolgte denaturierend mit 500 µl Essigsäure (0,5 M; pH 3,4). Das Eluat wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht in einer SpeedVac lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde am nächsten Tag in 50 µl Laemmli Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 98°C inkubiert. Je 5 µl eines Eluates wurden in einer SDS-PAGE analysiert.

**Lysis-Puffer:**

150 mM	KCl
20 mM	Tris-HCl, pH 8,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 % (v/v)	Triton X-100

**TST-Puffer:**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
0,05 % (v/v)	Tween-20

### III.6.5. *In vitro* Synthese von Proteinen

Um Proteine in einem zellfreien System *in vitro* zu synthetisieren und um sie durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin zu markieren, wurde das gekoppelte *in vitro*-Transkriptions- und Translationssystem „TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate“ der Firma Promega verwendet. Dieses System verwendet eine T7 RNA –Polymerase. Hierbei sind Transkription und Translation gekoppelt, so dass sie in einer Reaktion ablaufen. Zur Expression spezifischer Gene wurden diese unter Kontrolle des T7-Promotors in einen Expressionsvektor kloniert. Wichtig für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation war sauberes, RNase-freies Arbeiten. Alle verwendeten Materialien und Lösungen waren aus diesem Grund RNase-frei. Die Reaktionen für die gekoppelte Transkription/Translation wurden laut Herstellerangaben nach folgendem Schema pipettiert:

**TNT Lysat Reaktion:**

12,5 µl	TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate
1 µl	TNT® Reaction Buffer
0,5 µl	TNT® T7 RNA Polymerase
0,5 µl	Amino Acid Mixture, Minus Met, 1 mM
1 µl	[ <sup>35</sup> S]-Methionine (10 mCi/ml)
0,5 µl	RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)
0,5 µg	DNA Template
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Die Reaktion wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert. Die Menge an *in vitro* Translat, das für Bindestudien eingesetzt wurde, wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie abgeschätzt.

Zur Detektion dieser [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteine wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Nach Coomassie Brilliant Blue Färbung wurden die Gele im Geltrockner getrocknet und über Nacht in einer Expositionskassette mit einem „Storage Phosphor Screen“ exponiert. Zur Detektion der Signale wurde der Screen am folgenden Tag in einem Typhoon 9410 Imager (GE Healthcare) im Storage Phosphor Modus analysiert. Zur Quantifizierung der Signale wurde die Software ImageQuant TL 2003 (Amersham Biosciences) verwendet.

### **III.6.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Zur Bestimmung der Konzentration einer Protein-Lösung wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Diese beruht auf der Tatsache, dass sich Coomassie Brilliant Blue G250 an basische As anlagert, wobei sich sein Absorptionsmaximum zu 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). So lassen sich anhand von Eichkurven, die üblicherweise mit BSA (Rinder-Serum-Albumin) angefertigt werden, Proteinkonzentrationen bestimmen, vorausgesetzt der Gehalt an basischen As von Probe und Eich-Protein ähnelt sich. Zur Durchführung wurden Reagenzien von Bio-Rad laut Herstellerangaben verwendet.

### **III.6.7. *In vitro* Untersuchungen zu Protein-Protein Wechselwirkungen**

#### **III.6.7.1. Pulldown-Assay**

Der Pulldown-Assay stellt eine Methode dar, Protein-Protein Interaktionen *in vitro* zu analysieren. Hierzu wird ein Fusionsprotein an eine geeignete Matrix vorgebunden und mit Zelllysat oder einer Proteinlösung inkubiert. Gebundene Proteine können in einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. GST-getaggte Fänger-Proteine wurden an GSH-Sepharose, His<sub>6</sub>-getaggte an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose und MBP-getaggte an Amylose-Agarose vorgebunden.

Zur Verbindung wurden jeweils 5 µg des Fänger-Proteins in 200 µl Reinigungspuffer mit etwa 25 µl der entsprechenden Matrix für 45 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Kontrolle, ob eine Interaktion evtl. auf den „tag“ zurückzuführen ist, wurden GST, His<sub>6</sub> oder MBP auch ohne Fusion vorgebunden. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für eine Minute bei 300 x g abzentrifugiert und dreimal in Reinigungspuffer gewaschen. Nun wurden 5 µg des auf Interaktion zu testenden Proteins (bzw. Zelllysat, *In vitro* Translat) in 200 µl Reinigungspuffer zugegeben und für 45 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für eine Minute bei 300 x g abzentrifugiert und die Matrix wurde dreimal in Reinigungspuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit 30 µl 2x konzentriertem Laemmli Probenpuffer für fünf Minuten bei 98°C eluiert. 10 µl des Eluats wurden für Western Blot Analysen verwendet.

### III.6.7.2. Peptid SPOT Array

Die 1990 erstmals vorgestellte SPOT-Synthese Methode eröffnet die Möglichkeit zahlreiche synthetische Peptide auf eine Membran zu synthetisieren und auf Wechselwirkung mit anderen Proteinen zu testen (Frank, 2002). Mit Hilfe der SPOT Methode sollte auch die Calmodulin-bindende Region innerhalb von Asr1p bestimmt werden. Dazu wurden Asr1p-Peptide von 18 As Länge mit einem Versatz von 3 As nach Angaben des Herstellers auf eine Amino-PEG<sub>500</sub>-UC Membran (Abimed SPOT Synthesizer) synthetisiert. Die Synthese der SPOTs wurde freundlicherweise von Dr. Ronald Frank (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig) durchgeführt.

Zum Blockieren wurde die Membran zuerst für einige Sekunden in Ethanol geschwenkt und anschließend über Nacht bei 4°C in MBS-Lösung blockiert. Es wurden vier identische Membran-Streifen verwendet, von denen jeder 25 unterschiedliche Asr1p Peptide trug. Nach zehnmütigem Waschen in T-TBS Puffer wurde nun für vier Stunden bei RT mit 5 µg/ml GST-Cmd1p oder GST in MBS-Lösung mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> oder 5 mM EGTA inkubiert. Danach wurde dreimal für zehn Minuten mit T-TBS Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden alle Streifen mit Maus anti-GST Antikörpern in MBS-Lösung mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> oder 5 mM EGTA über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten in T-TBS Puffer wurde nun für zwei Stunden bei RT mit alkaliner Phosphatase gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörpern in MBS-Lösung mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> oder 5 mM EGTA inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal für zehn Minuten mit T-TBS Puffer und zweimal für zehn Minuten mit TBS Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde das ImmunStar® GAM-AP Chemilumineszenz Kit (Bio-Rad) laut Angaben des Herstellers eingesetzt.

**TBS Puffer:**

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
25 mM	Tris-HCl
⇒ pH 7,0	

**T-TBS Puffer:**

0,05 % (v/v)	Tween-20 in TBS Puffer
--------------	------------------------

**MBS-Lösung:**

20 ml	10x blocking solution (Sigma-Aldrich)
80 ml	T-TBS Puffer pH 8,0
5 g	Sucrose
⇒ pH 7,6 resultiert	

### III.6.8. *In vitro* Ubiquitinierung von Proteinen

#### III.6.8.1. Test auf Autoubiquitinierung

Da die Mehrzahl aller E3 Ubiquitin Ligasen autoubiquitinierend tätig sind, sollte diese Eigenschaft dazu genutzt werden, herauszufinden ob Asr1p E3 Ligase Aktivität besitzt. Dazu wurde folgende Ubiquitinierungsreaktion pipettiert:

**Test auf Autoubiquitinierung:**

40 mM	Tris-HCl, pH 7,5
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	ATP
3 µl	Energy Regeneration Solution
2 mM	DTT
9 µg	bovines Ubiquitin
25 µM	MG132 Proteasom Inhibitor
1,5 µl	Kaninchen Retikulozyten Lysat (Quelle für E1 und E2)
360 ng	E3 (MBP oder MBP-Asr1p)
ad 30 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Die Reaktion wurde für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ein Pulldown mit Amylose-Agarose. Dazu wurden 25 µl Amylose-Agarose in 140 µl Reinigungspuffer für MBP-Fusionsproteine gegeben und es wurde für 45 min bei 4°C inkubiert. Die Eluate wurden im Western Blot mit anti-MBP- und anti-Ubiquitin-Antikörpern analysiert.

#### III.6.8.2. *In vitro* Rekonstitutions Assay

Um E3 Ubiquitin Ligase Aktivität eindeutig nachzuweisen, reicht der Test auf Autoubiquitinierung alleine nicht aus. Hierzu muss die E3 Aktivität in einem *in vitro* rekonstituierten System mit aufgereinigten Komponenten gezeigt werden. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

***In vitro* Rekonstitutions Assay:**

40 mM	Tris-HCl, pH 7,5
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	ATP
3 µl	Energy Regeneration Solution
2 mM	DTT
9 µg	bovines Ubiquitin
25 µM	MG132 Proteasom Inhibitor
100 ng	E1 UBA1
400 ng	E2
360 ng	E3 MBP-Asr1p
ad 30 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Die Reaktion wurde für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ein Pulldown mit Amylose-Agarose. Dazu wurden 25 µl Amylose-Agarose in 140 µl Reinigungspuffer für MBP-Fusionsproteine gegeben und es wurde für 45 min bei 4°C inkubiert. Die Eluate wurden im Western Blot mit anti-MBP- und anti-Ubiquitin-Antikörpern analysiert.

Wurde ein Protein darauf hin untersucht, ob es ein Substrat für Asr1p darstellt, so wurde zum *in vitro* Rekonstitutions Assay zusätzlich 1 µg dieses Proteins – in dieser Arbeit His<sub>6</sub>-Cmd1p und Mutationen davon – zugegeben. Die Analyse erfolgte in einem Western Blot mit anti-Histidin Antikörpern.

## **III.7. Proteinanalytische Methoden**

### **III.7.1. Massenspektrometrische Analyse**

Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen, sollten neue Interaktionspartner aus dem Eluat einer ProtA-Affinitätsreinigung identifiziert werden. Dazu wurde der *asr1Δ*-Stamm mit Plasmiden transformiert, die für ProtA-Asr1p, ProtA-Asr1p-N und ProtA-Asr1p-C kodieren. Die Stämme wurden in SDC-„Dropout“-Medium kultiviert, geerntet und sphäroblastiert (s. Abschnitt III.6.4.2.). Die Sphäroblasten wurden in einer ProtA-Affinitätsreinigung eingesetzt (s. Abschnitt III.6.4.3.). Die Eluate wurden für zehn Minuten bei 98°C in der entsprechenden Menge NuPAGE® LDS Probenpuffer mit DTT inkubiert und nach dem Abkühlen auf ein NuPage® Novex® Bis-Tris Gel (4-12%) der Firma Invitrogen aufgetragen. Als Proteinstandard wurde die Mark12™ Protein-Leiter (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese fand in einer XCell ShureLock™ Mini-Cell Elektrophoresekammer

(Invitrogen) unter Verwendung von MOPS SDS Laufpuffer statt. Die Gele liefen für etwa eine Stunde bei konstanten 200V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mittels kolloidaler Coomassie Brilliant Blue Lösung gefärbt. Zu analysierende Proteinbanden wurden vorsichtig unter Verwendung eines sterilen Skalpellens ausgeschnitten und in LoBind® Reaktionsgefäße überführt. Sie wurden bei -80°C gelagert und auf Trockeneis zur MALDI Massenspektrometrie verschickt. Diese wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Albert Sickmann an der Universität Würzburg durchgeführt (Sickmann *et al.*, 2002).

**MOPS SDS Laufpuffer:  
(20x konzentriert)**

104,6 g	MOPS
60,6 g	Tris Base
10 g	SDS
3 g	EDTA
ad 500 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
⇒ pH 7,7 resultiert	

## III.8. Mikroskopische Methoden

### III.8.1. *In vivo*-Mikroskopie von Hefezellen

Zur mikroskopischen Untersuchung von Hefezellen, wurden diese bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in YPD- oder SDC-„Dropout“-Medium kultiviert. Von den Kulturen wurden je 5 µl auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Sollte die subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen analysiert werden, wurden die Zellen durch den GFP-Filter des Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Parallel wurden die Zellen mittels Phasenkontrast-Mikroskopie analysiert.

Zur Darstellung des Zellkernes wurden die Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 kultiviert. Dann wurde den Kulturen DAPI (1 mg/ml Stock) bis zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen einmal in PBS-Puffer gewaschen und danach durch Fluoreszenzmikroskopie durch den DAPI-Filter analysiert. Zur Dokumentation wurden die Zellen mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert.

## **Ergebnisse**



### **IV.1. Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Asr1p**

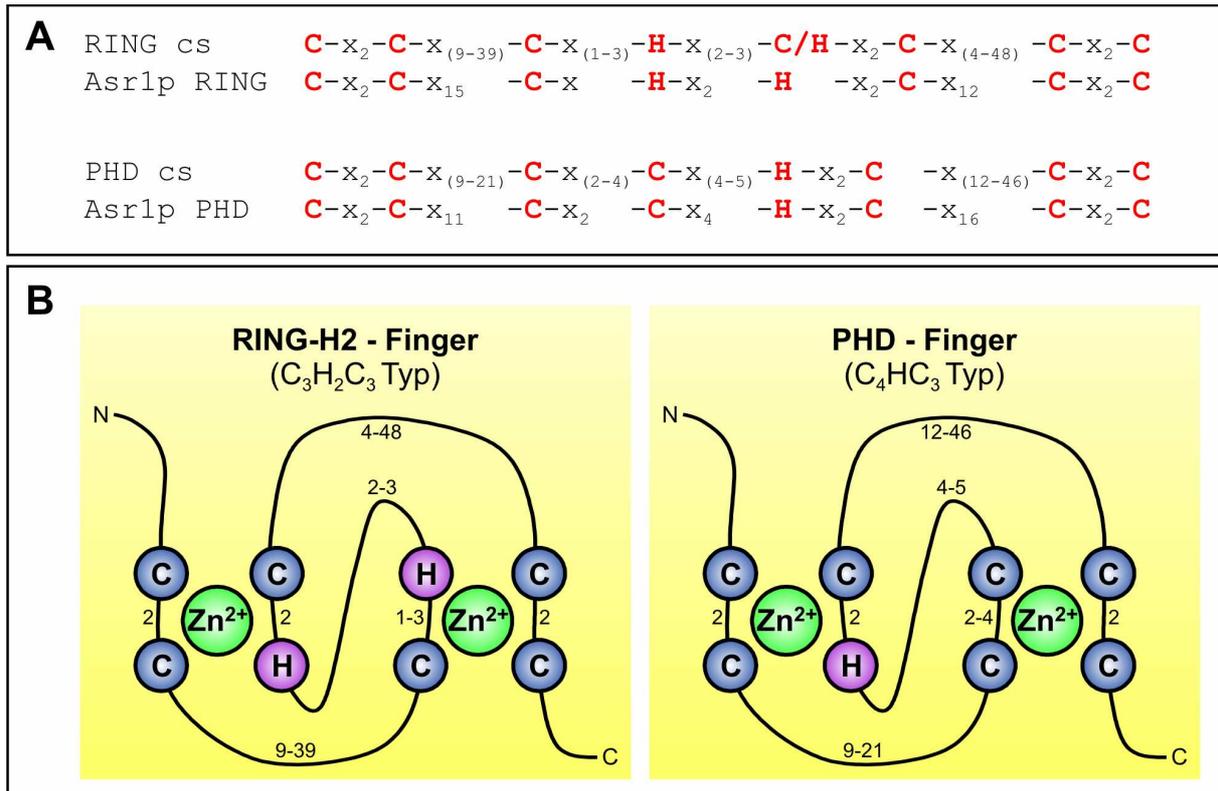
#### **IV.1.1. Asr1p ist ein RING/PHD-Finger Protein**

Die Intention dieser Arbeit war, das noch weitgehend uncharakterisierte Protein Asr1p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cer.*) und einige seiner Interaktionspartner zu analysieren.

Asr1p ist ein etwa 36 kDa großes, nicht-essentielles Protein der Bäckerhefe, das vom hypothetischen ORF *YPR093c* auf Chromosom XVI kodiert wird. Es besteht aus 310 As, wobei die As 1 - 211 als die N-terminale Region, die As 212 – 310 als die C-terminale Region definiert wurden. Primär wurde Asr1p in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit dem Kernporenpotein Nup116p entdeckt (Bailer, unveröffentlichte Daten). Es wurde auch gezeigt, dass Asr1p konstitutiv zwischen Nukleus und Cytoplasma „shuttelt“ und in Kontakt mit der nukleocytoplasmatischen Transportmaschinerie steht (Betz *et al.*, 2004; Fries *et al.*, 2007). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Asr1p mit Untereinheiten der RNA Polymerase II interagiert (Betz 2005; Fries, 2005). Welche Rolle es hierbei spielt, konnte erst am Ende dieser Arbeit teilweise gezeigt werden (Daulny *et al.*, 2008).

Da sich somit die Aufgabenstellung ergab, etwas über seine physiologische Funktion in Erfahrung zu bringen, wurde zu diesem Zweck zuerst mittels NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nach konservierten Domänen gesucht. Es stellte sich heraus, dass Asr1p zwei Zinkfinger-Domänen enthält: eine RING-Finger-Struktur (Really Interesting New Gene), die die Aminosäuren 26 – 69 umfasst und eine PHD-Finger-Struktur (Plant Homeodomain) innerhalb der Aminosäuren 143 – 189. Zinkfinger sind kleine Protein-Domänen, die ein oder mehrere Zink-Ionen mit Hilfe von Cystein- und Histidin-Resten koordinieren und somit ihre Struktur stabilisieren. So koordinieren RING-Finger-Domänen zwei Zink-Ionen in einer „cross brace“ Struktur und besitzen ein Cystein-reiches Sequenz-Motiv, das dem von Zinkfingern sehr ähnlich ist. Es hat die Konsensus-Sequenz **C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>9</sub>**.

<sup>39</sup>-C-X<sub>(1-3)</sub>-H-X<sub>(2-3)</sub>-[C/H]-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(4-48)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C, wobei x jede As sein kann und der Abstand zwischen den Liganden eine wichtige Rolle spielt. Handelt es sich beim fünften Liganden um ein Histidin, spricht man von einem RING-H2-Finger (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub> Typ), ist der fünfte Ligand ein Cystein, nennt man ihn RING-HC-Finger (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> Typ) (Stone *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2004). In Abbildung 10A ist ein Vergleich des Asr1p RING- und des Asr1p PHD-Fingers mit den entsprechenden Konsensussequenzen gezeigt. Die „cross brace“ Struktur eines RING-H2- und eines PHD-Fingers sind schematisch dargestellt (Abb. 10B).



**Abb. 10 Asr1p besitzt eine RING- und eine PHD-Finger Domäne**

**(A)** Alignment des Asr1p RING-Fingers und des PHD-Fingers mit den entsprechenden Konsensussequenzen. Die Zink-koordinierenden Liganden sind rot gehalten.

**(B)** Schematische Darstellung eines RING-H2 Fingers und eines PHD-Fingers. Die Liganden, die für die Koordination der Zink-Ionen verantwortlich sind, sind als blaue (Cystein) bzw. lila Kreise (Histidin) dargestellt. Die angegebenen Zahlen verdeutlichen die Abstände der Liganden.

Anfänglich war die Funktion von RING-Finger-Domänen nicht bekannt. Man wusste, dass sie an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind, und dass sie an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Entwicklung, Apoptose, Onkogenese und virale Replikation beteiligt sind (Dominguez, 2004; Borden, 2000; Borden und Freemont, 1996). 1996 stellte man fest, dass die RING-Domäne von c-Cbl Protein-Protein Interaktionen mit Proteinen des Ubiquitinierungs- und 26S Proteasom-Pathways vermittelt (Joazeiro *et al.*, 1999; Waterman

*et al.*, 1999; Yokouchi *et al.*, 1999). Seitdem wurde eine Vielzahl an RING-Finger-Proteinen mit ähnlicher Funktion identifiziert (Lorick *et al.*, 1999).

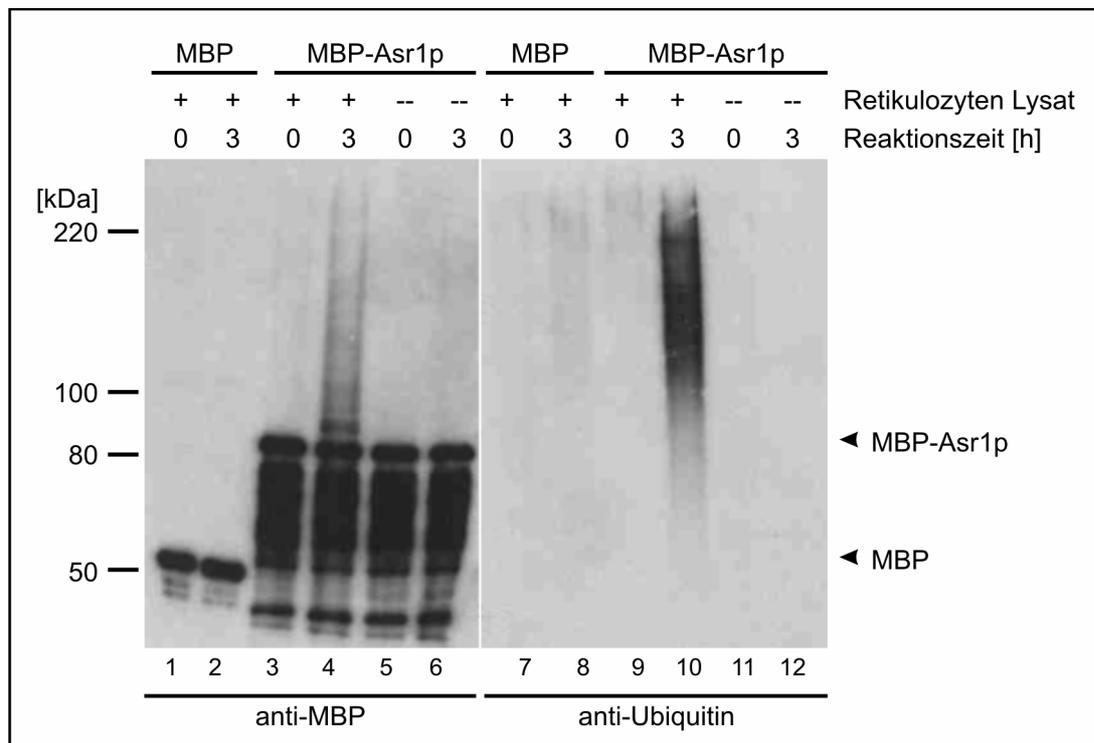
Die „cross-brace“ Struktur kann außer in RING-Domänen auch in PHD-Domänen gefunden werden. Ähnlich wie die RING-Domänen koordinieren PHD-Finger zwei Zink-Ionen in einem Cystein-reichen Sequenz Motiv der Konsensus-Sequenz **C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(9-21)</sub>-C-X<sub>(2-4)</sub>-C-X<sub>(4-5)</sub>-H-X<sub>2</sub>-C-X<sub>(12-46)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C** (Dominguez *et al.*, 2004). Die Funktion von PHD-Domänen ist noch weitgehend unbekannt, sie sind jedoch ebenfalls an Protein-Protein Interaktionen beteiligt (Kalkhoven *et al.*, 2002; Capili *et al.*, 2001).

### **IV.1.2. Asr1p wird *in vitro* durch Zelllysate ubiquitiniert**

Der Befund, dass Asr1p eine RING-Domäne und eine PHD-Domäne besitzt, gab einen ersten Hinweis auf seine physiologische Funktion. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von RING-Finger-Proteinen als E3 Ubiquitin-Ligasen identifiziert (Brooks *et al.*, 2008; Joazeiro *et al.*, 2000). E3 Ubiquitin-Ligasen katalysieren die Ubiquitinierung spezifischer Substrate. Zudem sind sie überwiegend autoubiquitinierend (Chen *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2001) oder sie katalysieren die Ubiquitinierung eines fusionierten MBP-tags, wobei freies MBP nicht ubiquitiniert wird (Nishizawa *et al.*, 2008; Takai *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2001).

Zunächst wurde deshalb untersucht, ob Asr1p autoubiquitinierend aktiv ist. Dazu wurden MBP bzw. MBP-Asr1p im *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm ER2508 (NEB) heterolog exprimiert. Dem Medium wurden 100 µM ZnSO<sub>4</sub> zugefügt, da Zink-Ionen für die korrekte Faltung einiger RING-Finger-Proteine erforderlich sind (Imai *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2003). Die Fusionsproteine wurden affinitätsgereinigt und in einer Ubiquitinierungs-Reaktion mit ATP, Ubiquitin, Proteasom-Inhibitor MG132 und Kaninchen Retikulozytenlysate als Quelle für E1 und E2 für drei Stunden bei 30 °C inkubiert oder sofort weiterverarbeitet. Im Anschluss erfolgte ein „Pull-down“ mit Amylose-Agarose und die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot mit anti-MBP- bzw. anti-Ubiquitin-Antikörpern analysiert (Abb. 11). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Inkubation von MBP-Asr1p mit Retikulozytenlysate nach drei Stunden zum Auftreten langsamer migrierender Produkte geführt hat (Spur 4), die zum Zeitpunkt null der Reaktion nicht vorhanden waren (Spur 3). Bei MBP selbst (Spuren 1 und 2), oder bei Abwesenheit des Retikulozytenlysats (Spuren 5 und 6) traten diese langsamer migrierenden Produkte nicht auf. MBP-Asr1p wurde somit durch das Zelllysate

modifiziert. Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Modifikation um Ubiquitinierung handelt, wurden die Eluate zudem in einem Western Blot mit anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert. Bei MBP-Asr1p wurden nach dreistündiger Inkubation mit dem Zelllysate die langsamer migrierenden Produkte von anti-Ubiquitin-Antikörpern erkannt (Spur 10). Zum Zeitpunkt null der Reaktion traten diese Produkte noch nicht auf (Spur 9). Auch in Abwesenheit von Retikulozytenlysate (Spuren 11 und 12) oder bei MBP selbst (Spuren 7 und 8) wurden keine hochmolekularen Produkte erkannt. Daraus lässt sich schließen, dass MBP-Asr1p durch Zelllysate modifiziert wird, und dass es sich bei dieser Modifikation um eine Ubiquitinierung handelt.



**Abb. 11 Asr1p wird durch Zelllysate ubiquitiniert**

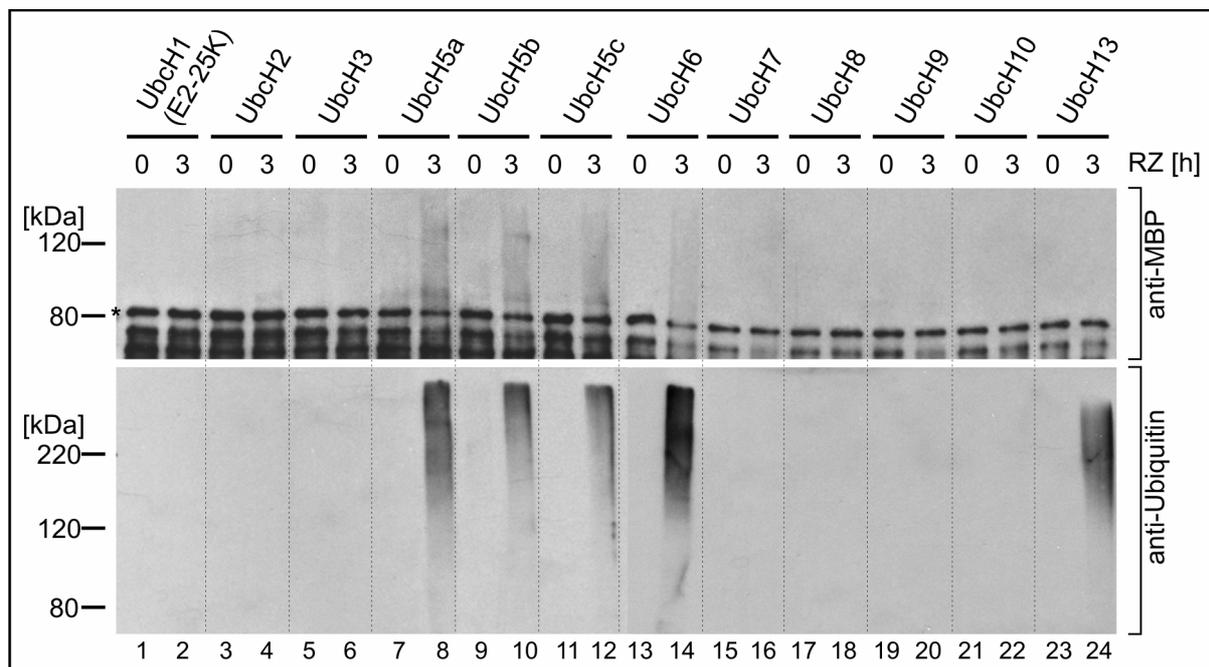
MBP und MBP-Asr1p wurden im *E. coli* Stamm ER2508 heterolog exprimiert, affinitätsgereinigt und in einer Ubiquitinierungs-Reaktion zusammen mit ATP, Ubiquitin, MG132 und Kaninchen Retikulozytenlysate für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend mittels „Pulldown“ mit Amylose-Agarose präzipitiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-MBP- oder anti-Ubiquitin-Antikörpern analysiert.

### IV.1.3. Asr1p ist eine E3 Ubiquitin-Ligase

Der Befund, dass MBP-Asr1p durch Zelllysate ubiquitiniert wird, ist ein Indiz dafür, dass Asr1p – wie die Mehrzahl aller RING-Finger-Proteine – selbst Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzen könnte. Zur Ubiquitinierung von Zielproteinen benötigen E3 Ubiquitin-Ligasen spezifische E2

Ubiquitin-konjugierende Enzyme. Hierbei bringen die E3 Enzyme das Substrat in räumliche Nähe zu den E2 Enzymen und ermöglichen somit den Transfer des aktivierten Ubiquitins. Um eindeutig zu zeigen, dass Asr1p E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität aufweist, wurde nun versucht, seine Autoubiquitinierung in einem rekonstituierten System mit definierten, gereinigten Komponenten zu zeigen.

Dazu wurde MBP-Asr1p mit dem E1 Enzym UBA1, Ubiquitin, MG132 und jeweils einem der E2 Enzyme UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6, UbcH7, UbcH8, UbcH9, UbcH10 oder UbcH13 für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein „Pull-down“ mit Amylose-Agarose durchgeführt, und die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit anti-MBP oder anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert (Abb. 12). Im Western Blot mit anti-MBP Antikörpern waren höhermolekulare Produkte zu beobachten, wenn MBP-Asr1p mit den E2 Enzymen UbcH5a (Spuren 7 und 8), UbcH5b (Spuren 9 und 10), UbcH5c (Spuren 11 und 12) und UbcH6 (Spuren 13 und 14) inkubiert wurde, nicht aber mit den restlichen E2s (Spuren 1 – 6 und 15 – 24). Zur Verifizierung wurde ein Western Blot mit anti-Ubiquitin Antikörpern durchgeführt.



**Abb. 12 Asr1p beherbergt E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität**

MBP-Asr1p wurden im *E. coli* Stamm ER2508 heterolog exprimiert, affinitätsgereinigt und in einem Ubiquitinierungs-Rekonstitutions-Assay zusammen mit ATP, Ubiquitin, MG132 und verschiedenen E2 Enzymen für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend fand ein „Pull-down“ mit Amylose-Agarose statt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit anti-MBP- oder anti-Ubiquitin-Antikörpern analysiert. Der Stern (\*) markiert MBP-Asr1p.

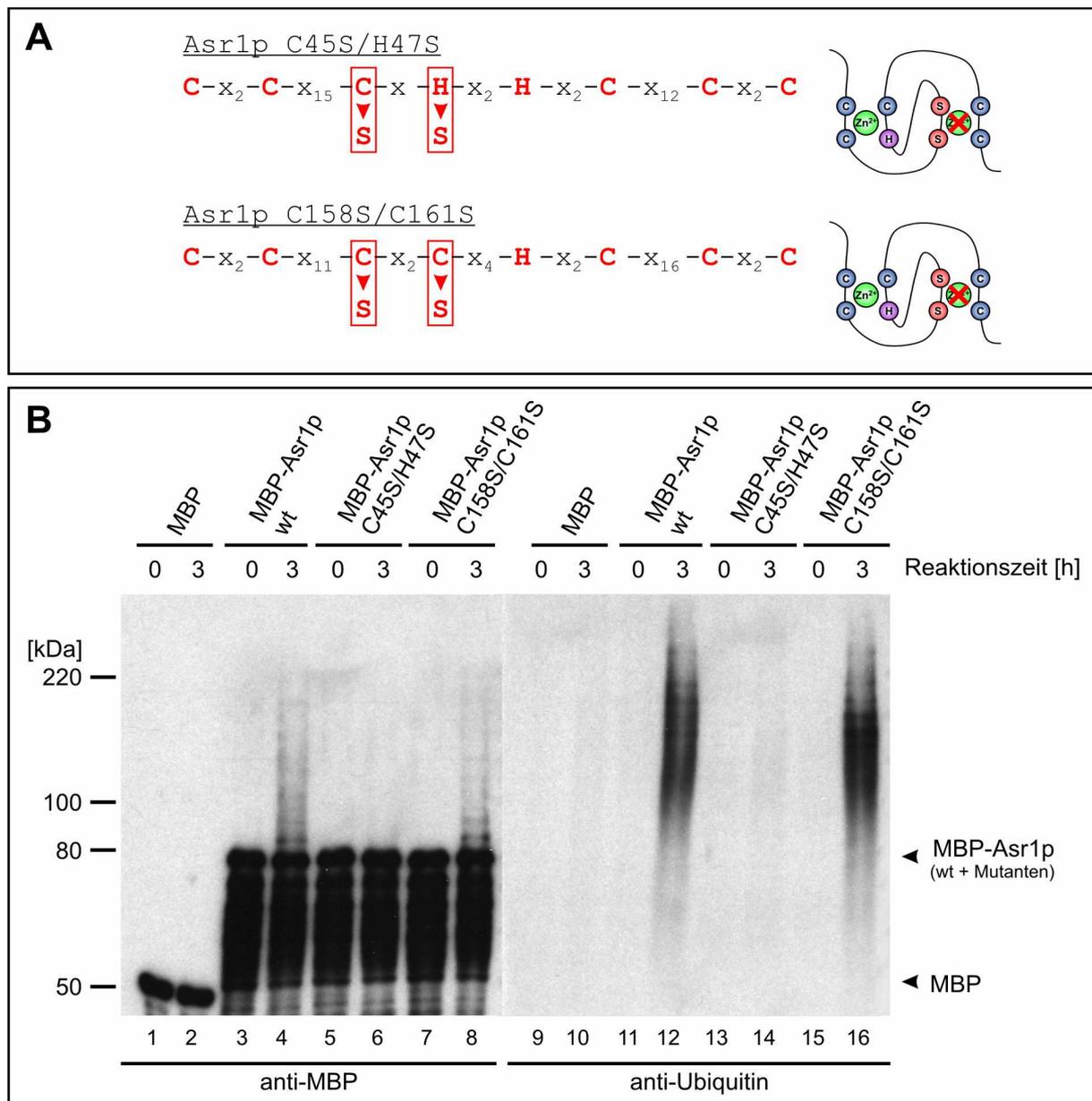
Die vorherigen Resultate konnten bestätigt werden. Langsamer migrierende Produkte wurden in Kooperation mit UbcH5a (Spuren 7 und 8), UbcH5b (Spuren 9 und 10), UbcH5c (Spuren 11 und 12), UbcH6 (Spuren 13 und 14) und zusätzlich mit dem E2 Enzym UbcH13 (Spuren 23 und 24), die im anti-MBP Blot nicht zu sehen waren, gebildet und durch die anti-Ubiquitin Antikörper erkannt. UbcH9 diente in diesem Versuch als Negativkontrolle, da es zwar Homologie zu den anderen E2 Enzymen aufweist, aber spezifisch für die Konjugation des small ubiquitin-like modifiers SUMO an Zielproteine ist. Da in diesem System nur aufgereinigte Komponenten eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass Asr1p selbst E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt, autoubiquitinierend wirkt und in Kooperation mit den E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzymen UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6 und UbcH13 fungiert.

#### **IV.1.4. Die Ubiquitinierung von MBP-Asr1p ist abhängig von der RING-Domäne**

Es wurde gezeigt, dass bei fast allen E3 Ubiquitin-Ligasen die korrekte Topologie der RING-Finger-Domäne zwingend erforderlich ist. Einige E3 Ligasen besitzen statt einer RING-Domäne eine PHD-Domäne, die für die Ligase-Aktivität notwendig ist. Um zu testen, ob bei Asr1p der RING-Finger für die Ligase-Aktivität verantwortlich ist, oder ob sie durch die PHD-Domäne vermittelt wird, wurden die Mutanten pMAL-c-*ASR1* C45S/H47S (RING-Mutante) und pMAL-c-*ASR1* C158S/C161S (PHD-Mutante) mittels des QuikChange® Mutagenesis Kits (Stratagene) erzeugt. Dazu wurden jeweils der dritte und der vierte Zink-koordinierende Ligand gegen Serin ausgetauscht (Abb. 13A). Es wurde bereits gezeigt, dass die Mutation des dritten Liganden bei RING-Finger Proteinen die Koordination der Zink-Ionen und dadurch die korrekte Faltung der RING Domäne verhindert. Dadurch kommt es zur Hemmung der E3 Ligase-Aktivität (Matsuda *et al.*, 2001).

MBP, MBP-Asr1p wt, sowie die beiden Mutanten MBP-Asr1p C45S/H47S und MBP-Asr1p C158S/C161S wurden in einer Ubiquitinierungs-Reaktion zusammen mit ATP, Ubiquitin, dem Proteasom Inhibitor MG132 und Kaninchen Retikulozytenlysate als Quelle für E1 und E2 für null bzw. drei Stunden bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde ein „Pulldown“ mittels Amylose-Agarose durchgeführt und die Eluate in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mittels anti-MBP- oder anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert (Abb. 13B). Wie schon zuvor entstanden bei MBP-Asr1p wt nach dreistündiger Reaktion höhermolekulare Produkte (Spur 4), die zu Beginn der Reaktion noch nicht vorhanden waren (Spur 3). Diese langsamer migrierenden Produkte waren ebenfalls bei der PHD-Mutante MBP-Asr1p

C158S/C161S (Spuren 7 und 8), nicht aber bei der RING-Mutante MBP-Asr1p C45S/H47S (Spuren 5 und 6) nach dreistündiger Inkubation aufgetaucht. MBP selbst wurde in der Reaktion nicht modifiziert (Spuren 1 und 2). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden die Eluate zusätzlich in einem Western Blot mit anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert. Hierbei wurde sowohl bei MBP-Asr1p wt (Spuren 11 und 12), als auch bei der PHD-Mutante MBP-Asr1p C158S/C161 (Spuren 15 und 16) höhermolekulare Produkte erkannt, nicht aber bei der RING-Mutante MBP-Asr1p C45S/H47S (Spuren 13 und 14).



**Abb. 13 Asr1p wird in Abhängigkeit von der RING-Finger Domäne ubiquitiniert**  
**(A)** Schematische Darstellung der in Asr1p eingefügten Mutationen. Die Zink-koordinierenden Liganden sind rot gedruckt. Rechts ist eine grafische Darstellung des RING- bzw. PHD-Fingers. Die eingefügten Mutationen sind als rote Kreise angedeutet.

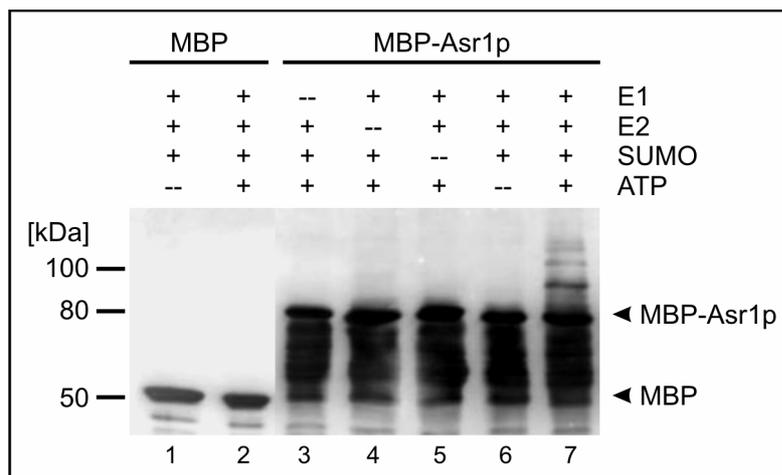
(B) MBP und MBP-Asr1p wurden im *E. coli* Stamm ER2508 heterolog exprimiert, affinitätsgereinigt und in einer Ubiquitinierungs-Reaktion zusammen mit ATP, Ubiquitin, MG132 und definierten E2 Enzymen für null oder drei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend fand ein „Pull-down“ mit Amylose-Agarose statt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit anti-MBP oder anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert.

Dieses Ergebnis bestätigt das vorherige. Deshalb lässt sich daraus schließen, dass die korrekt gefaltete RING-Finger Domäne, nicht aber die PHD-Finger Domäne notwendig ist für die Ubiquitinierung von MBP-Asr1p in Anwesenheit von Zelllysat. Damit ist gezeigt, dass Asr1p autoubiquitinierend wirkt und somit selbst E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt, die von der RING-Domäne abhängig ist. Asr1p ist somit eine neue, uncharakterisierte E3 Ubiquitin-Ligase der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

#### IV.1.5. MBP-Asr1p wird SUMOyliert

Ein Mechanismus, der dem der Ubiquitinierung stark ähnelt, ist die SUMOylierung. SUMO (small ubiquitin-like modifier), ein Protein das zwar nur sehr geringe Sequenz-Homologie zu Ubiquitin aufweist, aber eine fast identische dreidimensionale Struktur besitzt, wird hierbei kovalent und reversibel auf Lysin-Reste von Substraten transferiert. Die SUMOylierung ist im Gegensatz zur Ubiquitinierung keine Markierung für den proteasomalen Abbau, sondern ist an vielen Prozessen beteiligt. So kann sie Einfluss auf Protein-Protein Interaktionen oder die Aktivität von Proteinen ausüben (Gill, 2004; Johnson, 2004). Ubiquitinierung und SUMOylierung sind allerdings keine strikt getrennten Prozesse. So wurde gezeigt, dass SUMO-Gruppen auch als Erkennungssignal für bestimmte E3 Ubiquitin-Ligasen - SUMO-targeted Ubiquitin-Ligases (STUbls) – dienen, die das SUMOylierte Substrat dadurch dem proteasomalen Abbau zuführen. In wenigen Fällen wirkt die SUMOylierung auch der Ubiquitinierung entgegen und stabilisiert Substrate, indem es sie für den Ubiquitin-Proteasom Pathway unzugänglich macht. So reguliert SUMO beispielsweise die Autoubiquitinierung der E3 Ubiquitin-Ligase Mdm2 oder die Ubiquitinierung des NFκB-Inhibitors IκBα (Buschmann *et al.*, 2000; Ulrich, 2005). Da laut Software-Vorhersage (SUMOsp 2.0) auch Asr1p ein putatives SUMOylierungs-Signal enthält, stellte sich die Frage, ob auch hier eine Kommunikation – kooperativ oder antagonistisch - zwischen Ubiquitinierung und SUMOylierung stattfindet. Deshalb sollte experimentell bestimmt werden, ob MBP-Asr1p *in vitro* SUMOyliert wird. Da das E2 Enzym Ubc9p in der Regel direkt an das SUMOylierungs-Signal bindet, ist hierzu eine E3 SUMO-Ligase nicht zwingend notwendig.

Um dies zu untersuchen, wurden heterolog exprimiertes MBP oder MBP-Asr1p in einer SUMOylierungs-Reaktion mit SUMO E1 (Aos1p/Uba2p), SUMO E2 (Ubc9p), SUMO und ATP für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein „Pulldown“ mit Amylose-Agarose durchgeführt und die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-MBP Antikörpern analysiert (Abb. 14). Es ist deutlich zu erkennen, dass in Anwesenheit von E1, E2, SUMO und ATP höhermolekulare Produkte in Form einer Leiter entstanden (Spur 7). Bei Abwesenheit von E1 (Spur 3), E2 (Spur 4), SUMO (Spur 5) oder ATP (Spur 6) blieb MBP-Asr1p unmodifiziert. Auch MBP selbst wurde in der SUMOylierungs-Reaktion nicht modifiziert (Spuren 1 und 2). Somit kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Modifikation um eine Poly-SUMOylierung handelt, die in Abhängigkeit von ATP auftritt. Inwiefern diese Modifikation sich auf Asr1p oder seine Funktion als E3 Ubiquitin-Ligase auswirkt, bleibt zu untersuchen.



**Abb. 14** **Asr1p wird *in vitro* SUMOyliert**

MBP und MBP-Asr1p wurden im *E. coli* Stamm ER2508 heterolog exprimiert, affinitätsgereinigt und in einer SUMOylierungs-Reaktion zusammen mit SUMO E1 (Aos1p/Uba2p), SUMO E2 (Ubc9p), SUMO und ATP für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend fand ein „Pulldown“ mit Amylose-Agarose statt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-MBP Antikörpern analysiert.

## **IV.2. Identifizierung von Substraten der E3 Ubiquitin-Ligase Asr1p**

Nachdem die Frage nach der physiologischen Funktion geklärt, und Asr1p als neue E3 Ubiquitin-Ligase der Bäckerhefe identifiziert war, stellte sich die Frage, an welchen zellulären Prozessen Asr1p beteiligt ist und welche Rolle es hierbei spielt. Um dies zu klären, sollte zuerst analysiert werden, welche Substrate durch Asr1p ubiquitiniert werden.

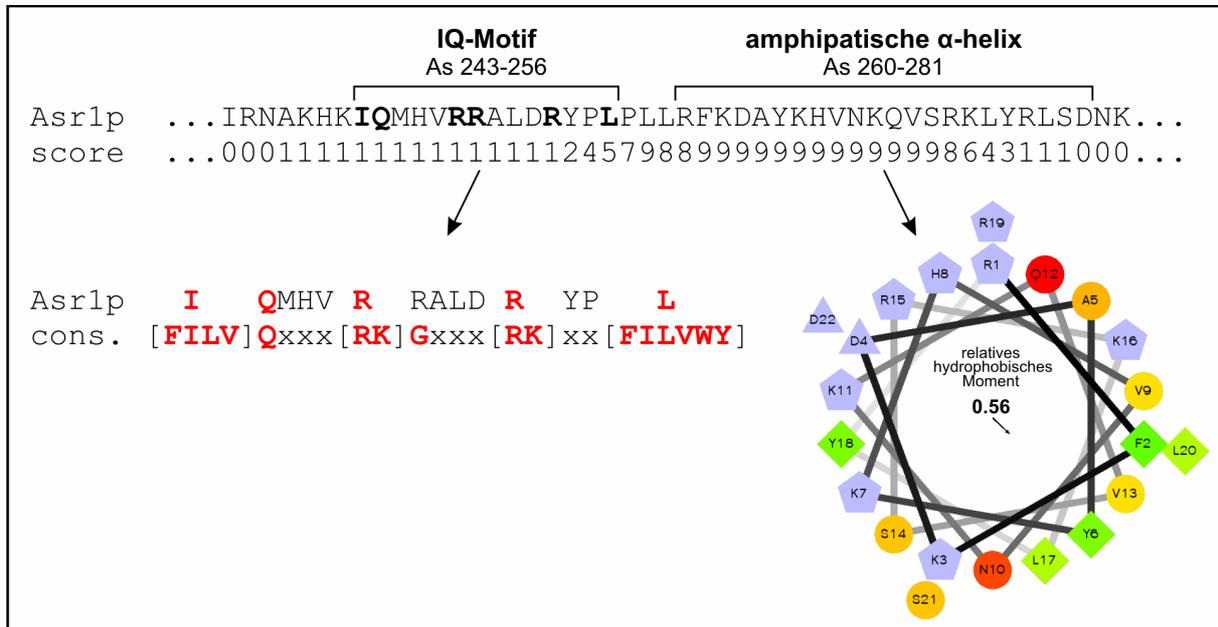
### **IV.2.1. Calmodulin als Substrat für Asr1p**

#### **IV.2.1.1. Asr1p besitzt zwei putative Calmodulin Binderegionen**

Auf der Suche nach potentiellen Substraten in der Bäckerhefe, wurde Asr1p mittels unzähliger Analyse-Tools systematisch analysiert. Die Sequenzanalyse durch das Online-Tool „Calmodulin Target Database“ (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>; Yap *et al.*, 2000) sagte gleich zwei putative, nahe zusammenliegende Calmodulin Binderegionen voraus: Ein IQ-Motiv innerhalb der As 243 – 256 und eine amphipathische  $\alpha$ -Helix innerhalb der As 260 – 281 (Abb. 15).

Das Alignment des putativen IQ-Motivs mit der Konsensussequenz für IQ-Motive zeigt eine hohe Übereinstimmung. Lediglich das Glycin an siebter Stelle der Konsensus-Sequenz stimmt nicht mit dem Asr1p-Motiv überein. Diese Aminosäure liegt jedoch in vielen IQ-Motiven nicht konserviert vor (Rhoads und Friedberg, 1997). Dennoch ist für das IQ-Motiv nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine Calmodulin-Bindung vorhergesagt. Gleich neben dem IQ-Motiv findet sich eine Sequenz, für die eine höhere Wahrscheinlichkeit für Calmodulin-Bindung angegeben ist (score: 6 von 9). Eine Helix-Rad-Projektion (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>) zeigt, dass es sich hierbei um eine basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix handelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich auf einer Seite der Helix überwiegend hydrophobe As befinden, während die andere Seite durch basische As geprägt ist. Ein Maß für die Amphipathie der Helix ist das so genannte relative hydrophobische Moment, das Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, wobei 1 die ideale amphipathische Helix darstellt. Für die vorhergesagte Calmodulin Binderegion (As 260 – 281) ist ein relatives hydrophobisches Moment von 0,56 kalkuliert. Interessant ist auch, dass

beide putative Binderegionen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Ob diese Region innerhalb Asr1p tatsächlich Calmodulin bindet, war somit noch zu zeigen.



**Abb. 15 Asr1p besitzt zwei putative Calmodulin Binderegionen**

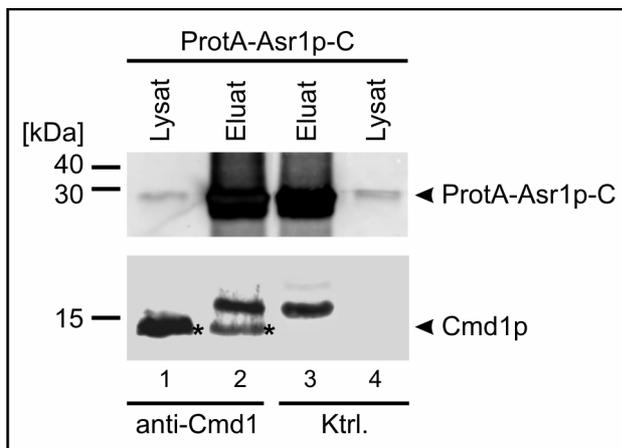
Im oberen Bereich ist die As-Sequenz von Asr1p As 236 – 283 mit den vorhergesagten potentiellen Calmodulin-Binderegionen dargestellt. Darunter links befindet sich das Alignment des Asr1p IQ-Motivs mit der IQ Konsensus-Sequenz. Konservierte As sind in rot gedruckt. Rechts daneben sieht man die Helix-Rad-Projektion der amphipathischen  $\alpha$ -Helix. ◆ = Basische As; ● = hydrophile As; Grün-Gelb-Töne = hydrophobisch.

#### IV.2.1.2. Asr1p bindet *in vivo* an Calmodulin

Nachdem zwei potentielle Calmodulin-bindende Regionen innerhalb von Asr1p vorhergesagt wurden, musste nun experimentell gezeigt werden, dass Calmodulin an Asr1p bindet. Zuerst sollte dies *in vivo* untersucht werden.

Dazu wurde ProtA-Asr1p-C im *asr1Δ* Stamm exprimiert und mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Die Eluate wurden zusammen mit den Lysaten in einer SDS-PAGE und anschließend Western Blot mit anti-Cmd1p Antikörpern bzw. zur Negativkontrolle nur mit den Sekundärantikörpern analysiert (Abb. 16). Cmd1p ist das homologe Protein zu Calmodulin in der Bäckerhefe. In Abbildung 16 ist zu sehen, dass ProtA-Asr1p-C im Lysat vorgefunden wurde (Spuren 1 und 4, oberer Bereich), und dass es nach der Affinitätsreinigung im Eluat deutlich angereichert wurde (Spuren 2 und 3, oberer Bereich). Im Lysat wurde außerdem ein Protein, das bei etwa 15 kDa migriert, spezifisch durch die anti-

Cmd1p Antikörper erkannt (Spur 1, unterer Bereich). Mit diesem Antikörper wurde Calmodulin auch im ProtA-Asr1p-C Eluat erkannt (Spur 2, unterer Bereich). Das Protein ist in der Abbildung durch einen Stern („\*“) gekennzeichnet. Da die konstante Fc-Region der Sekundärantikörper mit ProtA interagieren kann, wurden Lysat und Eluat zur Kontrolle nur mit den Sekundärantikörpern analysiert. Hierbei wurde weder im Lysat noch im Eluat ein Signal auf Höhe von Calmodulin erkannt (Spuren 3 und 4, unterer Bereich). Diese Daten zeigen, dass Asr1p und Calmodulin *in vivo* direkt oder indirekt interagieren, bzw. zusammen in einem Komplex vorliegen. Dieser Befund musste jedoch noch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.



**Abb. 16 Asr1p interagiert mit Cmd1p *in vivo***

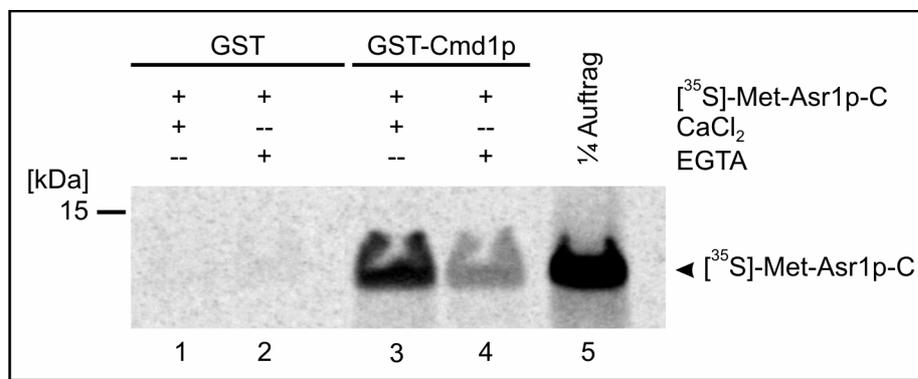
ProtA-Asr1p-C wurde im *asr1Δ* Stamm exprimiert und daraus mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Zelllysate und Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit Kaninchen anti-Cmd1 Antikörpern (Spuren 1 und 2) bzw. nur mit den anti-Kaninchen Sekundärantikörpern (Spuren 3 und 4) analysiert. Der Stern („\*“) markiert Cmd1p.

### IV.2.1.3. Calmodulin bindet direkt an Asr1p-C in Abhängigkeit von Calcium

Die putativen Calmodulin-Binderegionen und die Affinitätsreinigung von Cmd1p mit ProtA-Asr1p-C sind ein Indiz dafür, dass Asr1p direkt an Calmodulin bindet. Da Calmodulin oft in Second-messenger-Systemen involviert ist, in denen es als Sensor für Calcium fungiert, kann es äußere Einflüsse durch Bindung an Effektor-Proteine weitergeben. Hierbei unterscheidet man, ob die Bindung Calcium-abhängig oder Calcium-unabhängig geschieht.

Um zu analysieren, ob Asr1p an Calmodulin bindet, und ob diese Bindung in Abhängigkeit von Calcium geschieht, wurden GST bzw. GST-Cmd1p heterolog in *E. coli* exprimiert und

affinitätsgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden zuerst an Glutathion (GSH)-Sephrose gebunden und anschließend mit radioaktiv markiertem, in Kaninchen Retikulozytenlysat *in vitro*-translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> oder EGTA, einem Calcium-spezifischen Chelator, inkubiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Autoradiogramm analysiert (Abb. 17). Es ist deutlich zu erkennen, dass [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> effizient an GST-Cmd1p bindet (Spur 3), nicht jedoch an GST selbst (Spur 1). In Anwesenheit des Calcium-spezifischen Chelators EGTA wurde die Bindung von [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C an GST-Cmd1p deutlich verringert (Spur 4). Eine Bindung an GST fand auch in Anwesenheit von EGTA nicht statt. Somit wurde gezeigt, dass Asr1p-C an Calmodulin bindet, und dass die Bindung in Abhängigkeit von Calcium-Ionen stattfindet.



**Abb. 17 Asr1p interagiert mit Cmd1p in Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Weise**

GST und GST-Cmd1p wurden im *E. coli* Stamm BL21 heterolog exprimiert und affinitätsgereinigt. Nach Verbindung an GSH-Sephrose wurden sie mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Autoradiografie analysiert.

#### IV.2.1.4. Calmodulin bindet direkt an Asr1p As 243 – 280

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass Asr1p in Abhängigkeit von Calcium an Calmodulin bindet. Nun sollte untersucht werden, ob die Bindung direkt stattfindet, und ob die tatsächliche Binderegion mit den putativen Calmodulin Binderegionen übereinstimmt.

Dazu wurde affinitätsgereinigtes GST bzw. GST-Cmd1p an GSH-Sephrose vorgebunden und mit affinitätsgereinigtem MBP-Asr1p As 243 – 280 in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> oder EGTA inkubiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-MBP Antikörpern analysiert (Abb. 18A). In Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> fand eine deutliche Bindung von MBP-Asr1p As 243 – 280 an GST-Cmd1p (Spur 3), nicht aber an GST selbst

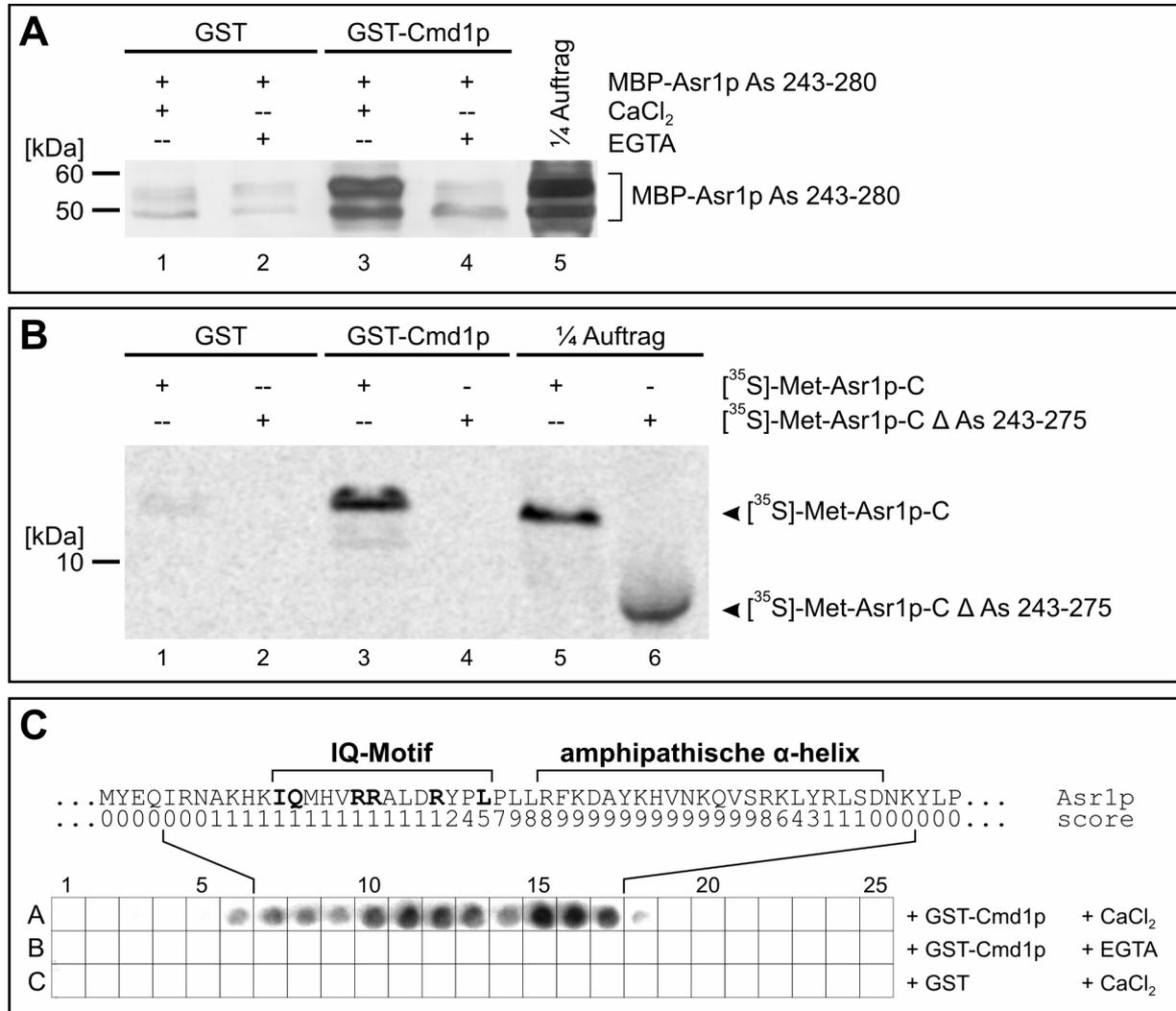
(Spur 1) statt. Wie schon zuvor gezeigt, fand die Interaktion nur in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$ , nicht aber in Anwesenheit von EGTA statt (Spur 4).

Nachdem gezeigt war, dass die Asr1p Reste 243 – 280 ausreichend zur Bindung an Calmodulin sind, stellte sich die Frage, ob sie zur Bindung auch notwendig sind, oder ob es noch weitere Binderegionen innerhalb von Asr1p-C gibt. Dazu wurde [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C oder [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C  $\Delta$  As 243 – 275 mit immobilisiertem GST bzw. GST-Cmd1p inkubiert, und die Eluate in einer SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie analysiert (Abb. 18B). Während die Synthese von [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C und [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C  $\Delta$  As 243 – 275 vergleichbar war (Spuren 5 und 6), kam es zu einer Bindung von [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C an GST-Cmd1p (Spur 3), nicht aber von [ $^{35}\text{S}$ ]-Met-Asr1p-C  $\Delta$  As 243 – 275 (Spur 4). Keines der radioaktiv markierten Proteine wies eine Bindung an GST selbst auf (Spuren 1 und 2).

Um die Calmodulin-bindenden Regionen experimentell genauer zu kartieren, wurde ein Peptid SPOT Array durchgeführt. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Peptid SPOT Arrays durchaus geeignet sind, Calmodulin-bindende Peptide zu identifizieren (Min und Mrksich, 2004; Hultschig *et al.*, 2004; Bosc *et al.*, 2001). Hierzu wurden 18mer Peptide von Asr1p innerhalb der As 218 – 307 mit einem Versatz von je drei As anhand der SPOT-Methode auf Amino-PEG<sub>500</sub>-UC Membranen (Abimed) synthetisiert (Roland Frank, Universität Göttingen). Die Membranen wurden mit GST bzw. GST-Cmd1p in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  oder EGTA inkubiert und mit GST-spezifischen Maus-Antikörpern inkubiert (Abb. 18C). In Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  kam es zu einer schwachen Bindung bei den SPOTs 6 – 10 und einer stärkeren Bindung im Bereich der SPOTs 11 – 17 (Reihe A). In diesen Bereichen befinden sich das IQ-Motiv, bzw. die basisch amphipathische  $\alpha$ -Helix. In Anwesenheit von EGTA konnte kein gebundenes GST-Cmd1p detektiert werden (Reihe B). Auch GST selbst hat nicht an die Peptide gebunden (Reihe C).

Somit wurde gezeigt, dass die Asr1p Reste 243 – 280 ausreichend und notwendig sind für die Bindung an Calmodulin. Bei der Bindung handelt es sich um eine direkte Bindung. Ein Peptid SPOT Array bestätigt die per Sequenz-Analyse gefundenen putativen Calmodulin-Binderegionen – das IQ-Motiv und die basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix. Der Peptid SPOT Array bestätigt auch nochmals, dass eine Bindung nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stattfindet, sowohl im Bereich des IQ-Motivs, als auch im Bereich der amphipathischen  $\alpha$ -Helix. Bei IQ-Motiven ist das erste Isoleucin entscheidend für die Bindung von Calmodulin (Kang *et al.*, 2006; Zühlke *et al.*, 1999). Weder der Austausch I243E noch I243V innerhalb Asr1p As 212 – 310 beeinflusst die Bindung von Calmodulin an Asr1p (Daten nicht gezeigt). Das lässt darauf schließen, dass die basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix entscheidend an der

Calmodulin-Bindung beteiligt ist. Auch der Peptid SPOT Array deutet auf die wichtige Funktion der amphipathischen  $\alpha$ -Helix bei der Calmodulin-Bindung hin.



**Abb. 18 Asr1p As 243 – 280 interagiert direkt mit Calmodulin**

(A) GST und GST-Cmd1p wurden im *E. coli* Stamm BL21 heterolog exprimiert und affinitätsgereinigt. Nach Verbindung an GSH-Sepharose wurden sie mit MBP-Asr1p As 243 – 280 in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> oder EGTA für 45 min bei 4°C inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und nachfolgenden Western Blot mit anti-MBP Antikörpern analysiert.

(B) An GSH-Sepharose vorgebundenen GST bzw. GST-Cmd1p wurde mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C oder [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C  $\Delta$  As 243 - 275 inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Autoradiografie analysiert.

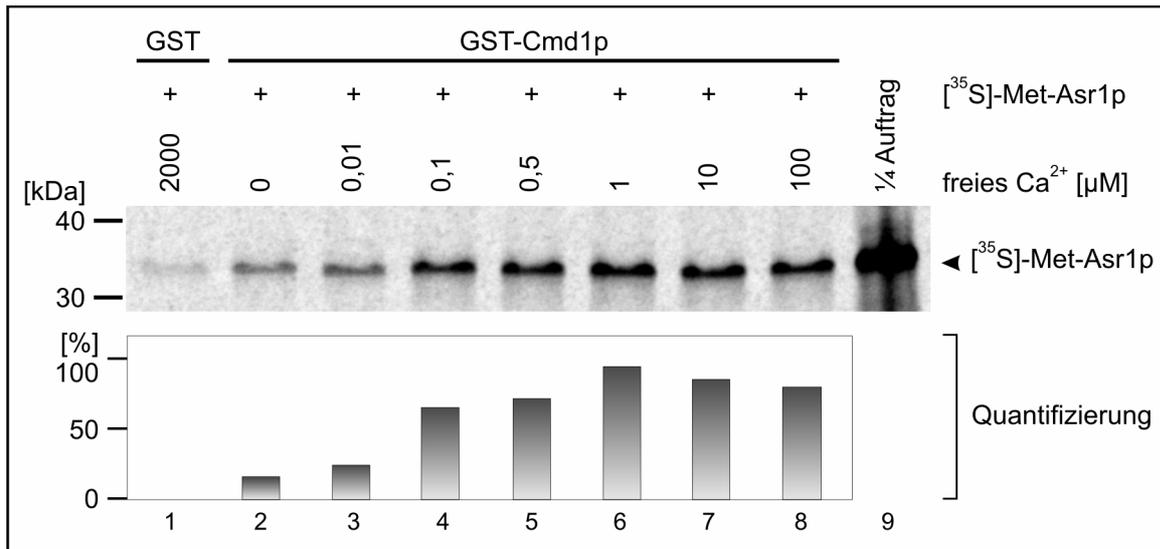
(C) Asr1p 18mer Peptide (im Bereich der As 218 – 307) wurden mit einem Versatz von drei As mittels der SPOT-Methode auf Amino-PEG<sub>500</sub>-UC Membranen (Abimed) synthetisiert. Die Membranen wurden in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> oder EGTA mit GST bzw. GST-Cmd1p inkubiert und mit anti-GST Antikörpern dekoriert. Die Detektion der mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, sekundären anti-Maus Antikörper, erfolgte mit Hilfe des „Immun-Star Goat anti-Mouse (GAM)-AP Detection Kits (Bio-Rad).

#### **IV.2.1.5. Der Effekt der Calcium-Konzentration auf die Interaktion von Asr1p mit Calmodulin**

Die Konzentration an freien, cytoplasmatischen Calcium-Ionen in exponentiell wachsenden Hefezellen beträgt etwa 50 – 200 nM. Bei dieser Konzentration liegt Calmodulin überwiegend in seiner Ca<sup>2+</sup>-freien Form (Apo-Calmodulin) vor (Cyert, 2001). Auf äußere Signale hin kann es zu einem Calcium-Influx kommen, wobei sich die freie, cytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kurzfristig um das 10 – 100x erhöhen kann. In diesem Fall kann Calmodulin vier Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden (Cmd1p nur drei), und es erfährt einen Konformationswechsel, der ihm erlaubt an spezifische Zielproteine zu binden.

Um zu analysieren, bei welchen Calcium-Konzentrationen Calmodulin an Asr1p bindet, wurden GST bzw. GST-Cmd1p an GSH-Sepharose vorgebunden und mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p bei variierenden Calcium-Ionen Konzentrationen inkubiert. Die Konzentration an freien Calcium-Ionen in EGTA-Puffer wurde mit Hilfe des Online-Tools „Ca-EGTA calculator v1.3“ (<http://www.stanford.edu/~cpatton/CaEGTA-TS.htm>) errechnet. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie analysiert. Die Menge an gebundenem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p wurde mittels der Analyse-Software „ImageQuant™ TL 2003“ quantifiziert. In Abbildung 19 ist zu sehen, dass [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p in Abwesenheit von freien Calcium-Ionen nur sehr schwach an GST-Cmd1p bindet (Spur 2). Bei sukzessiver Erhöhung der Konzentration an freien Calcium-Ionen nimmt die Bindung an GST-Cmd1p deutlich zu (Spuren 3 – 8). Ab der Konzentration an freien Calcium-Ionen von 100 - 500 nM wird eine Plateau-Phase erreicht, wobei bei steigender Calcium-Konzentration kein Zuwachs der Asr1p-Bindung verzeichnet werden kann.

So kann man sagen, dass bei Calcium-Konzentrationen bis zu 100 nM nur eine sehr geringfügige Bindung von Asr1p an Calmodulin stattfindet. Darüber hinaus findet eine maximale Bindung bei Konzentrationen von mehr als 500 nM statt. Die physiologische, cytoplasmatische Calcium-Konzentration in der Hefe beträgt etwa 50 – 200 nM. Bei Calcium-Influx kann sie kurzfristig deutlich steigen. Somit findet die Bindung von Asr1p an Calmodulin *in vitro* unter physiologischen Calcium-Konzentrationen statt. Ob eine Interaktion auch ohne Calcium-Influx stattfindet, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, aber die *in vivo* – Ergebnisse deuten darauf hin.



**Abb. 19 Asr1p bindet bei physiologischen Calcium-Konzentrationen an Calmodulin**

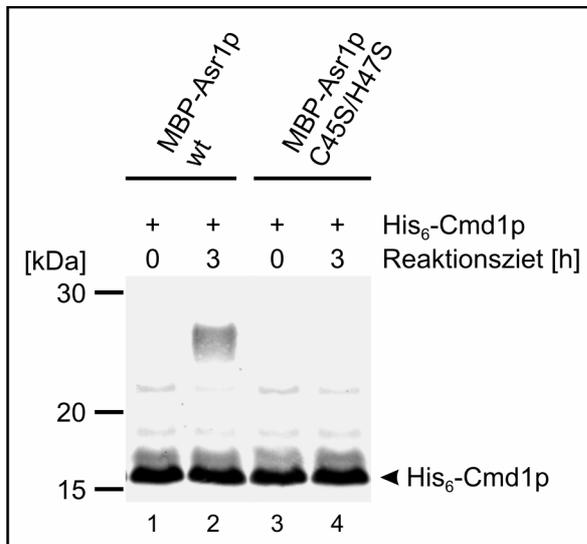
An GSH-Sepharose vorgebundenen GST bzw. GST-Cmd1p wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen an freien Calcium-Ionen mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p inkubiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie analysiert. Die Menge an gebundenem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p wurde durch Quantifizierung ermittelt und dargestellt (ImageQuant TL 2003).

#### IV.2.1.6. Asr1p ist eine Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase (uCaM-Synthetase)

Nachdem Calmodulin als Interaktionspartner von Asr1p identifiziert und die Bindung genauer charakterisiert wurde, stellte sich die Frage, ob Calmodulin ein Substrat für die Asr1p E3 Ubiquitin-Ligase ist. Sowohl bei Säugetieren, als auch bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass Zellextrakte Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Aktivität aufweisen, d. h. dass in Abhängigkeit von Calcium Ubiquitin auf Calmodulin übertragen wird. Das dafür verantwortliche Protein konnte bislang jedoch nicht eindeutig identifiziert werden (Jennissen *et al.*, 1992; Hadas *et al.*, 1993). Da Asr1p E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt und in Abhängigkeit von Calcium an Calmodulin bindet, sollte nun untersucht werden, ob Calmodulin durch Asr1p ubiquitiniert wird.

Dazu wurden MBP-Asr1p bzw. die RING-Finger Mutante MBP-Asr1p C45S/H47S zusammen mit His<sub>6</sub>-Cmd1p, dem E1 Enzym UBA1, dem E2 Enzym UbcH5a, Ubiquitin und ATP in einer Ubiquitinierungs-Reaktion eingesetzt. Im Anschluss an die Reaktion fand ein „Pulldown“ mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose statt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-Cmd1 Antikörpern analysiert (Abb. 20). Nach dreistündiger

Ubiquitinierungs-Reaktion mit wildtypischem MBP-Asr1p trat eine Variante des His<sub>6</sub>-Cmd1p auf (Spur 2), die statt bei 15 kDa (Spur 1) bei etwa 25 kDa migrierte. Das entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von monoubiquitiniertem His<sub>6</sub>-Cmd1p. Wurde die RING-Finger Mutante MBP-Asr1p C45S/H47S eingesetzt, die keine Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt (s. Abschnitt IV.1.4.), migrierte His<sub>6</sub>-Cmd1p bei 15 kDa (Spuren 3 und 4). Somit deutet alles darauf hin, dass Calmodulin von Asr1p mittels dessen RING-Finger-Domäne ubiquitiniert wird. Da nach dreistündiger Ubiquitinierungs-Reaktion eine einzige modifizierte Form des Calmodulins auftrat, kann man davon ausgehen, dass es sich um eine Monoubiquitinierung handelt. Demnach ist Asr1p eine Ubiquityl-Calmodulin Synthetase der Bäckerhefe.



**Abb. 20 Asr1p ist eine Ubiquityl-Calmodulin Synthetase**

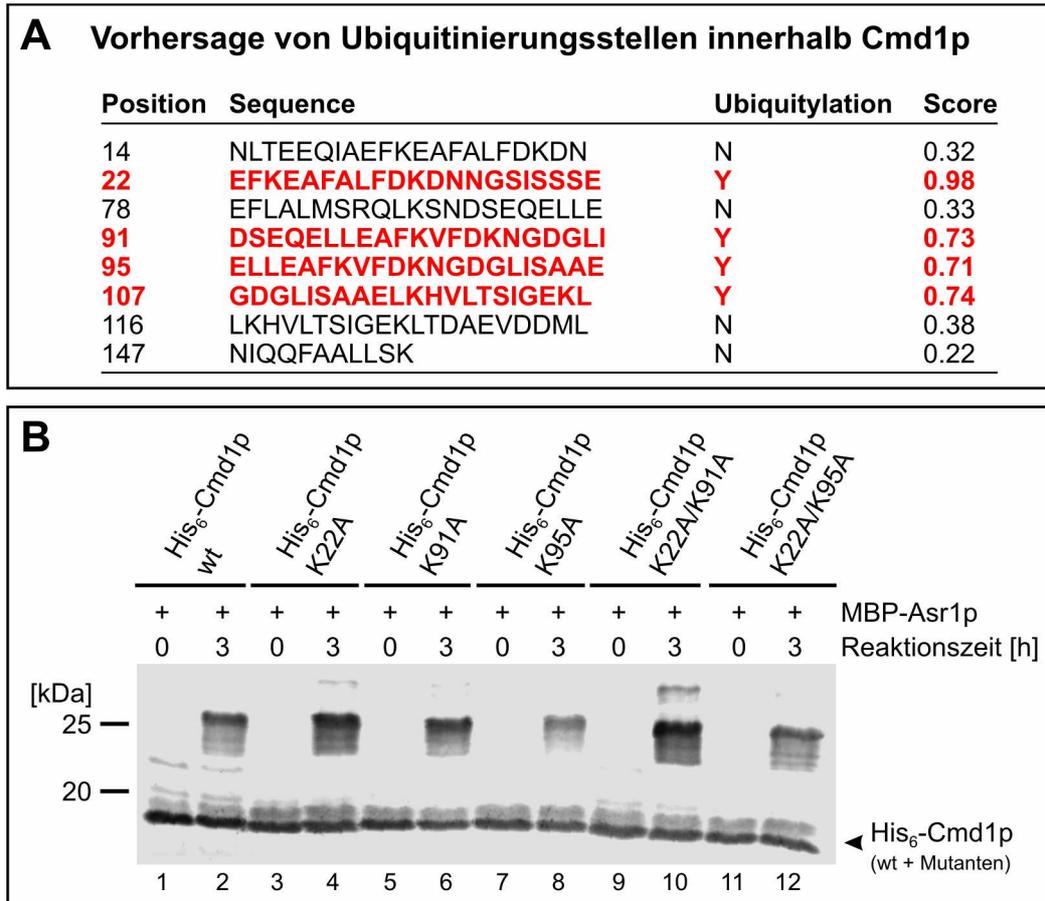
Heterolog exprimiertes und affinitätsgereinigtes MBP-Asr1p bzw. MBP-Asr1p C45S/H47S wurde mit affinitätsgereinigtem His<sub>6</sub>-Cmd1p, UBA1, UbcH5a, Ubiquitin und ATP für drei Stunden bei 30°C in einer Ubiquitinierungs-Reaktion inkubiert. Anschließend wurde ein „Pull-down“ mit Ni-NTA Sepharose durchgeführt und die Eluate in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit Kaninchen anti-Cmd1 Antikörpern analysiert.

#### IV.2.1.7. Calmodulin besitzt vier potentielle Ubiquitinierungsstellen

Asr1p wurde als neue Ubiquityl-Calmodulin Synthetase der Bäckerhefe identifiziert. Calmodulin besitzt zwar acht Lysine, wird aber nur an einem einzigen ubiquitiniert (Ziegenhagen *et al.*, 1990). Markus Laub und seine Arbeitsgruppe konnten 1998 zeigen, dass die Calmodulin-Ubiquitinierungsstelle innerhalb der ersten EF-Hand lokalisiert ist, und dass hierbei Lysin 22 (K22) ubiquitiniert wird (Laub *et al.*, 1998).

Es sollte nun untersucht werden, ob Calmodulin durch Asr1p an Lysin 22 ubiquitiniert wird. Zuerst wurden mit Hilfe des Online-Tools UbiPred (<http://iclab.life.nctu.edu.tw/ubipred/index.php>) putative Ubiquitinierungsstellen innerhalb des Hefe-Homologs Cmd1p vorhergesagt (Abb. 21A). Das Analyse-Werkzeug sagte vier putative Ubiquitinierungsstellen voraus, darunter mit der höchsten Wahrscheinlichkeit von 98% das Lysin 22. Weiterhin wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von 73% Lysin 91, mit einer Wahrscheinlichkeit von 71% Lysin 95 und mit einer Wahrscheinlichkeit von 74% Lysin 107 vorhergesagt. Um experimentell zu testen, welcher Lysin-Rest tatsächlich durch Asr1p ubiquitiniert wird, wurden Plasmide konstruiert, bei denen die potentiellen Ubiquitinierungsstellen mutiert vorlagen. So wurden His<sub>6</sub>-Cmd1p wt, His<sub>6</sub>-Cmd1p K22A, His<sub>6</sub>-Cmd1p K91A, His<sub>6</sub>-Cmd1p K95A, His<sub>6</sub>-Cmd1p K22A/K91A und His<sub>6</sub>-Cmd1p K22A/K95A im *E. coli* Stamm BL21 heterolog exprimiert, affinitätsgereinigt und zusammen mit dem E3 Enzym MBP-Asr1p, dem E2 Enzym UbcH5a, Ubiquitin und ATP in einer Ubiquitinierungs-Reaktion eingesetzt. Anschließend fand ein „Pulldown“ mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose statt und die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-Cmd1 Antikörpern analysiert (Abb. 21B). Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl bei wildtypischem His<sub>6</sub>-Cmd1p (Spur 2), als auch bei allen Mutanten nach dreistündiger Reaktion (Spuren 4, 6, 8, 10 und 12) eine modifizierte Form des His<sub>6</sub>-Cmd1p entsteht, die dem ubiquitinierten Cmd1p entspricht und die zu Beginn der Reaktion nicht vorhanden war (Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11). Die His<sub>6</sub>-Cmd1p-Mutante, bei der Lysin 107 mutiert werden sollte, ließ sich nicht affinitätsreinigen.

Aus diesen Resultaten kann jedoch geschlossen werden, dass Calmodulin durch Asr1p nicht nur an Lysin 22 ubiquitiniert wird. Welcher Rest ubiquitiniert wird, bzw. ob vielleicht auch mehrere Reste ubiquitiniert werden, müsste in Zukunft noch näher untersucht werden. Die Aussage von Laub *et al.* (1998), dass lediglich Lysin 22 ubiquitiniert wird, kann so nicht bestätigt werden. Lysin 22 ist nicht notwendig zur *in vitro*-Ubiquitinierung von Calmodulin.



**Abb. 21 Mutation der potentiellen Cmd1p Ubiquitinierungsstellen**

(A) Vorhersage der potentiellen Cmd1p Ubiquitinierungsstellen mit Hilfe des Online-Tools „UbiPred“ (<http://iclab.life.nctu.edu.tw/ubipred/index.php>). Vorhergesagte Ubiquitinierungsstellen sind rot gedruckt. Der „score“ gibt die voraussichtliche Wahrscheinlichkeit einer Ubiquitinierung an (Werte 0 – 1).

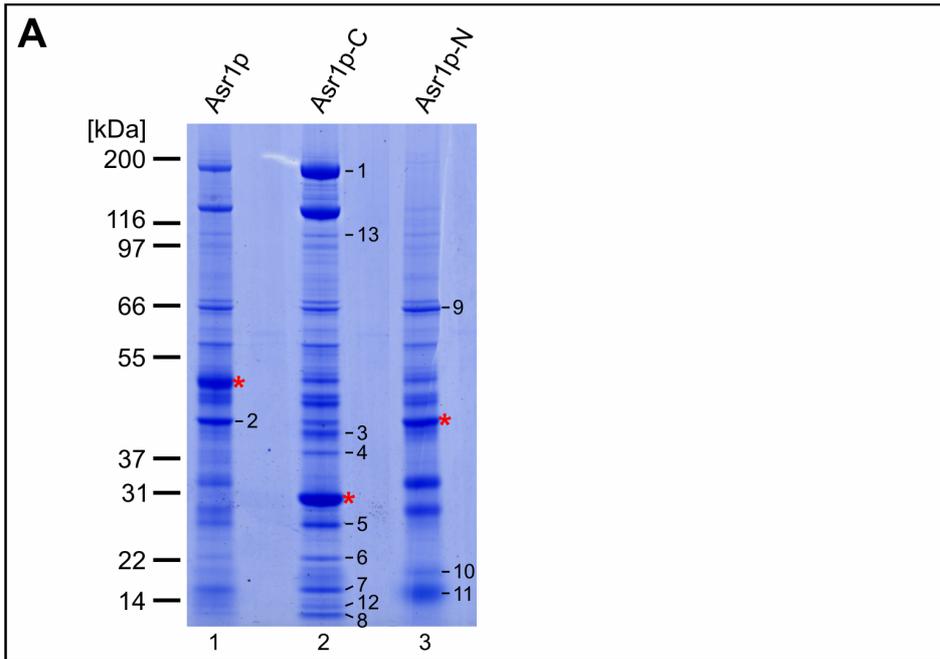
(B) Heterolog exprimiertes und affinitätsgereinigtes His<sub>6</sub>-Cmd1p, bzw. Mutanten bei denen ein oder mehrere Lysine gegen Alanine ausgetauscht wurden, wurden mit affinitätsgereinigtem MBP-Asr1p (E3), UBA1 (E1), UbcH5a (E2), Ubiquitin und ATP für drei Stunden bei 30°C in einer Ubiquitinierungs-Reaktion inkubiert. Anschließend wurde ein „Pulldown“ mit Ni-NTA Sepharose durchgeführt und die Eluate in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit Kaninchen anti-Cmd1 Antikörpern analysiert.

## **IV.2.2. Die RNA Polymerase II als Substrat für Asr1p**

### **IV.2.2.1. Massenspektrometrische Untersuchung zur Identifizierung weiterer Asr1p Substrate**

Nachdem Calmodulin als Substrat für Asr1p identifiziert wurde, sollte nach weiteren Interaktionspartnern von Asr1p gesucht werden. Eine Möglichkeit, dies anzugehen stellt die massenspektrometrische Analyse des aus der Hefe affinitätsgereinigten Proteins Asr1p und dessen co-gereinigter Interaktionspartner dar. Mit Hilfe der Massenspektrometrie können unbekannte Proteine analysiert und identifiziert werden. Dazu werden diese erst mit einer spezifischen Protease verdaut, die entstandenen Peptide im Massenspektrometer ionisiert und anschließend ihre Massen bestimmt. Diese Massen sind für jedes Protein spezifisch. Somit können Proteine mittels Datenbankabgleich identifiziert werden.

Zur Identifikation weiterer Interaktionspartner und somit potentieller Substrate von Asr1p wurden mittels PCR-Amplifikation und anschließender Klonierung Vektoren konstruiert, die für die Fusionsproteine ProtA-Asr1p, ProtA-Asr1p-C und ProtA-Asr1p-N kodieren. Diese wurden anschließend in den *asr1Δ* Stamm transformiert und exprimiert. Die ProtA-Fusionsproteine wurden durch Affinitätsreinigung mittels IgG-Sepharose und anschließender SDS-PAGE analysiert, wobei Proteine im Gel durch kolloidale Coomassie-Färbung detektiert wurden. Im Anschluss wurden spezifische Protein-Banden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (Albert Sickmann, ISAS Dortmund). In Abbildung 22A sieht man das mit kolloidalem Coomassie gefärbte Gel. Darauf sind die Eluate der Affinitätsreinigung von ProtA-Asr1p (Spur 1), ProtA-Asr1p-C (Spur 2) und ProtA-Asr1p-N (Spur 3) zu sehen. Die jeweiligen ProtA-Fusionsproteine sind durch einen roten Stern markiert. Proteinbanden, die ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert wurden, sind durch Zahlen (1 – 13) gekennzeichnet. Hierbei fielen die beiden hochmolekularen Banden in der ProtA-Asr1p und ProtA-Asr1p-C Reinigung (Spuren 1 und 2) im Bereich zwischen 116 und 200 kDa auf, die in der ProtA-Asr1p-N Reinigung (Spur 3) nicht vorhanden waren. Die ausgeschnittenen Protein-Banden wurden durch Albert Sickmann (Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS), Dortmund) massenspektrometrisch analysiert. In Abbildung 22B ist die Auswertung der Massenspektrometrie dargestellt. Die identifizierten, mit ProtA-Asr1p, Asr1p-C und Asr1p-N co-gereinigten Proteine wurden anhand ihrer Funktionen geordnet und ihr Migrationsverhalten im Gel mit ihrem theoretischen Molekulargewicht verglichen. So wurden einige proteasomale Proteine co-gereingt, die allesamt Untereinheiten des 26S Proteasoms sind.



**Abb. 22**  
**Massenspektro-**  
**metrische**  
**Analyse von**  
**Asr1p**

(A) ProtA-Asr1p, Prot-Asr1p-C und ProtA-Asr1p-N wurden im *asr1Δ* Stamm exprimiert und mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweiligen ProtA-Fusionsproteine sind durch einen Stern („\*“) markiert. Einzelne Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Diese Banden sind durch Zahlen (1 – 13) markiert.

(B) Auswertung der Massenspektrometrische Analyse. Die ausgeschnittenen Banden wurden analysiert. Die Funktion, das theoretische Molekulargewicht und die zugehörige Proteinbande sind angegeben.

**B Durch die Massenspektrometrie identifizierte Proteine**

	Protein	Funktion	MW [kDa]	Bande
<b>Proteasomale Proteine</b>	Rpn8p	UE des 26S Proteasoms (19S UE)	38,3	3
	Rpn11p	UE des 26S Proteasoms (19S UE)	34,4	4
	Pre6p	UE des 26S Proteasoms (20S UE)	28,4	5
<b>Ribosomale Proteine</b>	Rpl11ap	Komponente der 60S ribosomalen UE	19,7	6
	Rpl12ap	Komponente der 60S ribosomalen UE	17,8	6
	Rpl12bp	Komponente der 60S ribosomalen UE	17,8	6
	Rps14ap	Komponente der 40S ribosomalen UE	14,5	12
	Rps16ap	Komponente der 40S ribosomalen UE	15,8	7
	Rps20p	Komponente der 40S ribosomalen UE	13,9	7
<b>Transkription</b>	Rpb1p	UE der RNA Polymerase II	191,6	1, 6, 7
	Rpb3p	UE der RNA Polymerase II	35,3	3, 4, 5
	Rpb5p	UE der RNA Polymerase II	25,1	5
	Rpb8p	UE der RNA Polymerase II	16,5	7
	Rpb9p	UE der RNA Polymerase II	14,3	7, 8, 10
	Rpb11p	UE der RNA Polymerase II	13,6	8
	Rtr1p	CTD Phosphatase	26,2	5
<b>Glukose Stoffwechsel</b>	Pdb1p	UE des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes	40	4
	Pdc1p	Pyruvat Decarboxylase, alkohol. Fermentation	61,5	2
	Tdh1p	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	35,8	4, 5, 6, 7
	Tdh3p	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	35,7	4
	Cdc19p	Pyruvatkinasel	54,5	8, 12
<b>Chaperone</b>	Scj1p	DnaJ Homolog	41,5	2
	Ydj1p	Regulation von HSP90 + HSP70 Funktionen	44,7	2
	Ssa1p	Mitglied der HSP70 Familie	69,7	9, 13
	Ssa2p	Mitglied der HSP70 Familie	69,5	9
	Ssb1p	Mitglied der HSP70 Familie	66,6	9
<b>Sonstige</b>	Tsa1p	Thioredoxin Peroxidase	21,4	6
	Sar1p	GTPase	21,4	6
	Leu3p	involviert in Aminosäure-Biosynthese	38,9	2, 10, 11
	Sam2p	S-Adenosylmethionin Synthetase	42,3	2
	Psa1p	GDP-Mannose Pyrophosphorylase	39,6	3

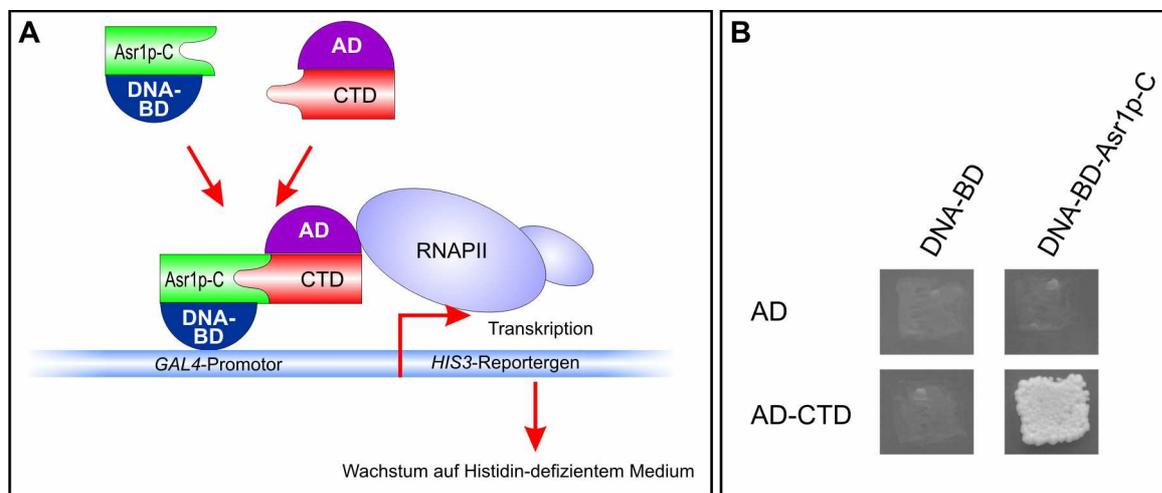
Da Asr1p als E3 Ubiquitin-Ligase am Ubiquitin-Proteasom Pathway beteiligt ist, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Zudem wurden auch etliche ribosomale Untereinheiten identifiziert. Da ribosomale Proteine oft unspezifisch binden („sticky proteins“), ist unklar, ob es sich um spezifische Interaktionen handeln könnte. Protein-Banden, die sowohl in der ProtA-Asr1p, in der ProtA-Asr1p-N, als auch in der ProtA-Asr1p-C Affinitätsreinigung auftreten, stellen wahrscheinlich Proteine dar, die unspezifisch binden. Weiterhin wurden etliche Proteine, die in die Transkription involviert sind, identifiziert. So wurden sechs Untereinheiten der RNA Polymerase II (RNAPII), und eine CTD Phosphatase (Rtr1p) co-gereinigt. Auch etliche Proteine des Glukose-Stoffwechsels wurden durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert. Nicht unerwartet tauchten auch Chaperone und Hitzeschockproteine auf, die in Überexpressionssystemen häufig gebildet werden. Bei der Auswertung fiel besonders auf, dass viele Untereinheiten der RNAPII identifiziert wurden. Die prominente Bande bei etwa 200 kDa wurde als größte Untereinheit (Rpb1p) identifiziert. Bei der Bande bei etwa 140 kDa handelt es sich um die zweitgrößte Untereinheit der RNAPII (Bailer, unveröffentlichte Daten). So stellte sich die Frage, ob Asr1p mit Komponenten der RNAPII-Transkriptionsmaschinerie interagiert.

#### **IV.2.2.2. Die Asr1p C-terminale Region vermittelt die Interaktion mit der RNAPII CTD**

Die massenspektrometrischen Daten wiesen darauf hin, dass Asr1p mit Untereinheiten der RNAPII interagieren könnte. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass die C-terminale Region von Asr1p mit der C-terminalen Domäne von Rpb1p (CTD) interagiert (Betz, 2005; Fries 2005). In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit Asr1p als Fänger wurde die C-terminale Domäne der RNAPII (CTD) gefischt (Bailer, unveröffentlichte Daten).

Um dies zu bestätigen, sollte die Interaktion mit definierten Komponenten im Hefe-Zwei-Hybrid – System rekonstituiert werden. Die Grundlage des in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Hybrid – Systems ist der Transkriptionsfaktor GAL4 und das Reporterogen *HIS3* mit einer stromaufwärts liegenden GAL4-Bindestelle. GAL4 besitzt eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und eine Aktivierungsdomäne (AD). Im Hefestamm AH109 wurden nun die auf Interaktion zu testenden Proteine als Fusionen mit der GAL4-DNA-BD und der GAL4-AD exprimiert. Interagieren die zu testenden Proteine, wird der GAL4 Transkriptionsfaktor rekonstituiert und das *HIS3* Reporterogen wird exprimiert. Dadurch ist ein Wachstum auf Histidin-defizienten Nährmedien möglich (Abb. 23A). Um die Interaktion von Asr1p-C mit der

CTD *in vivo* zu zeigen, wurde der AH109 Hefe-Stamm mit den Fänger- und Beuteplasmiden pGBKT7-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 212 – 310 und pGADT7-GAL4-AD-CTD co-transformiert. Zur Kontrolle auf Autoaktivierung wurden auch die beiden Leervektoren pGBKT7-GAL4-DNA-BD und pGADT7-GAL4-AD, bzw. pGBKT7-GAL4-DNA-BD und pGADT7-GAL4-AD-CTD, sowie pGBKT7-GAL4-DNA-BD und pGADT7-GAL4-AD co-transformiert. Hefezellen, die DNA-BD-Asr1p-C und AD-CTD co-exprimierten, wuchsen auf Histidin-defizientem Medium (Abb. 23B). Eine Autoaktivierung fand nicht statt, da es in Kombination mit den Leerplasmiden pGBKT7-GAL4-DNA-BD und pGADT7-GAL4-AD nicht zum Wachstum auf Histidin-freiem Medium kam. Somit konnte *in vivo* bestätigt werden, dass Asr1p mit der CTD über seine C-terminale Region interagiert.



**Abb. 23 Asr1p-C interagiert *in vivo* mit der CTD**

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid – Systems

(B) Der Hefe-Stamm AH109 wurde mit den Zwei-Hybrid-Plasmiden pGBKT7-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 212 – 310 und pGADT7-GAL4-AD-CTD, bzw. Kombinationen dieser Plasmide mit den Leervektoren pGBKT7-GAL4-DNA-BD und pGADT7-GAL4-AD co-transformiert. Bei Interaktion zweier Proteine wird das Reporter gen *HIS3* exprimiert, welches Wachstum auf Histidin-freiem Medium ermöglicht.

### IV.2.2.3. Vergleich der CTD-bindenden Region von Asr1p mit den Binderegionen anderer CTD-bindender Proteine

Nachdem gezeigt wurde, dass die C-terminale Region von Asr1p die Interaktion mit der CTD vermittelt, wurde die für die Bindung notwendige Region genauer eingegrenzt (Fries, 2005). So wurde gezeigt, dass Asr1p N-terminal bis zur As 233 verkürzt werden konnte, ohne dass die Bindung an die CTD verloren ging. Weitere N-terminale Deletion resultierte in einem Verlust der Bindung. Eine C-terminale Deletion von zehn As führte ebenfalls zum Verlust der

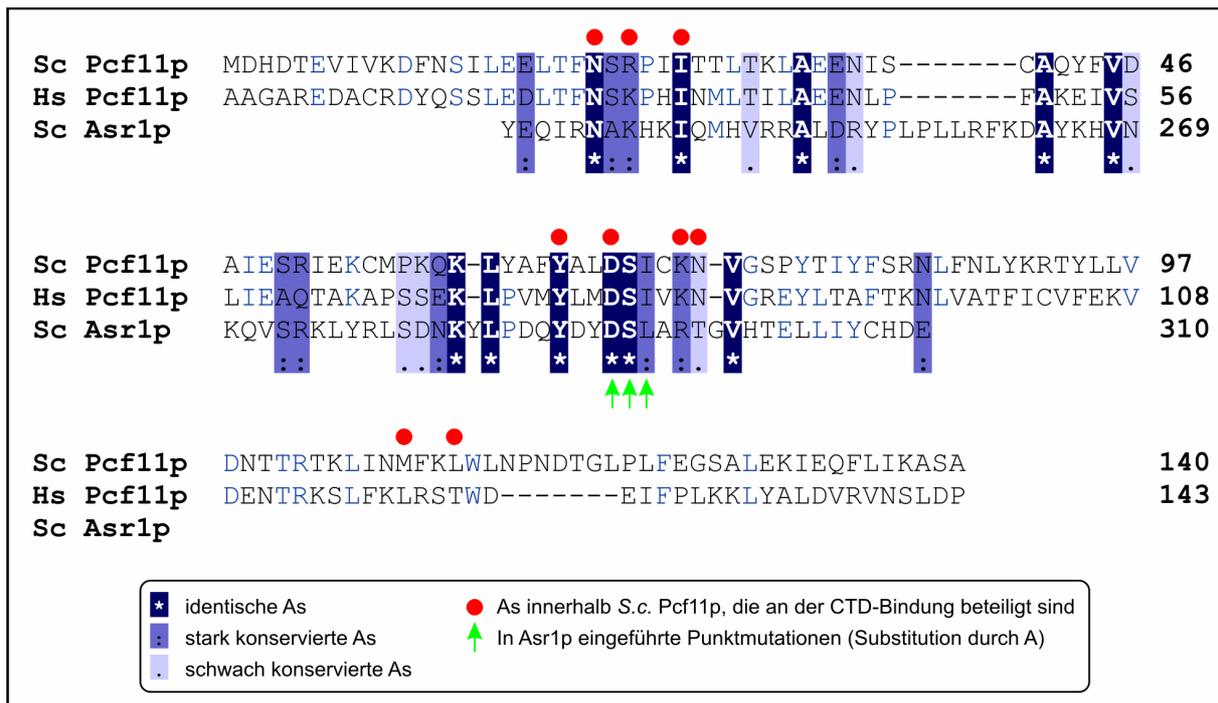
Bindung an die CTD. Somit wurde die für die Bindung ausreichende Region innerhalb Asr1p auf die As 233 – 310 eingegrenzt.

Die CTD kann zahlreiche Konformationen und Phosphorylierungszustände einnehmen, die mit einer Reihe verschiedener CTD-interagierender Proteine wechselwirken (Seet *et al.*, 2006; Yoh *et al.*, 2007; Egloff und Murphy, 2008). Folgende Domänen, die für eine Bindung an die CTD verantwortlich sein können, wurden beschrieben:

- die FF Domäne  
Sie besteht aus etwa 50 – 60 As und ist charakterisiert durch zwei konservierte Phenylalanin-Reste in der N- und C-terminalen Region. Die FF Domäne von CA150 ist für die Bindung an die CTD verantwortlich (Smith *et al.*, 2004).
- die WW Domäne  
Sie besteht aus 38 As und besitzt zwei konservierte Tryptophan-Reste, die durch 20 – 22 As voneinander getrennt sind. Die WW Domäne von Ess1p kann die phosphorylierte Form der CTD binden (Sudol *et al.*, 2001; Morris und Greenleaf, 2000).
- die SRI (Set2 Rpb1p Interacting) Domäne  
Sie wurde in der Histon Methyltransferase Set2p entdeckt und bindet an die Ser2/5P phosphorylierte Form der CTD (Vojnic *et al.*, 2006)
- die SH2 (Src Homology 2) Domäne aus Spt6p  
Sie besteht aus etwa 100 As und besitzt eine konservierte Tasche, die phosphoryliertes Tyrosin bindet. Es wurde gezeigt, dass die SH2 Domäne von Spt6p an die Ser2P Form der CTD bindet (Dengl *et al.*, 2009).
- die CID (CTD Interacting Domain)  
Die CID ist eine Domäne, die die phosphorylierte Form der CTD bindet, wobei die phosphorylierten Serine nicht direkt an der Bindung beteiligt sind. Sie wurde in den RNA-prozessierenden Faktoren Pcf11p, Ndr1p, Scaf4p und Scaf8p entdeckt (Becker *et al.*, 2008; Seet *et al.*, 2006).

Um die Bindung von Asr1p an die CTD besser zu verstehen, wurde die Region innerhalb Asr1p, die die CTD-Bindung vermittelt (As 233 – 310), auf das Vorhandensein solcher Domänen untersucht. So besitzt Asr1p As 233 – 310 weder eine FF- noch eine WW-

Domäne. Weiterhin wurden Homologievergleiche mit Asr1p As 233 – 310 und der SRI Domäne von Set2p, bzw. der SH2 Domäne von Spt6p durchgeführt. Hierbei waren keine Sequenz-Homologien festzustellen. Bei einem Homologievergleich von Asr1p As 233 – 310 mit der CID von Pcf11p waren wenige As konserviert. So waren lediglich 14,3% der As identisch und 35% der As ähnlich. Anton Meinhart und Patrick Cramer veröffentlichten 2004 eine hochauflösende Röntgenstruktur der Pcf11p CID, die an ein Ser2P CTD Peptid gebunden war. Sie konnten zeigen, dass innerhalb der Pcf11p CID die As N22, L24, Y65, D68, K72, N73, M108 und L111 durch hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken an der Interaktion mit dem CTD Peptid beteiligt waren. In Abb. 24 ist ein Homologievergleich zwischen Pcf11p aus der Bäckerhefe und dem Menschen mit Asr1p As 233 – 310 dargestellt. Durch einen roten Punkt sind die Aminosäuren markiert, die bei Pcf11p an der Interaktion mit dem CTD-Peptid beteiligt sind. Interessanterweise sind trotz der geringen Sequenz-Homologie genau diese As auch in Asr1p konserviert. Lediglich M108 und L111 in *S.c.* Pcf11p liegen in Asr1p nicht konserviert vor.



**Abb. 24 Homologievergleich der CID aus Pcf11p der Bäckerhefe und des Menschen mit Asr1p As 233 – 310**

Der Homologievergleich wurde mit Hilfe des Online-Tools „ClustalW“ durchgeführt.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein Austausch von D68A/S69A/I70A innerhalb der Pcf11p CID die CTD-Bindung nicht mehr ermöglichte (Sadowski *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob diese konservierten As auch an der Bindung zwischen Asr1p und der CTD beteiligt sind,

wurden die dazu konservierten As innerhalb Asr1p durch Alanine ersetzt. Für einen Test im Hefe-Zwei-Hybrid – System wurde das Plasmid pGBKT7-GAL4-DNA-BD-ASR1 As 212 – 310 D292A/S293A/L294A zusammen mit pGADT7-GAL4-AD-CTD in den AH109 Hefe-Stamm transformiert und co-exprimiert. Die Hefezellen waren in der Lage, auf Histidin-defizientem Medium zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Das deutet auf eine Interaktion der CTD mit Asr1p-C D292A/S293A/L294A hin. Weiterhin wurde mittels des „QuikChange Mutagenesis Kits“ ein Plasmid konstruiert, das für ProtA-Asr1p-C D292A/S293A/L294A kodiert. Dieses Plasmid wurde im *asr1Δ* Stamm exprimiert und mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Das Eluat wurde in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-CTD Antikörpern analysiert. Genau wie beim wildtypischen ProtA-Asr1p-C wurde auch bei der Mutante die größte Untereinheit Rpb1p der RNAPII co-gereinigt (Daten nicht gezeigt).

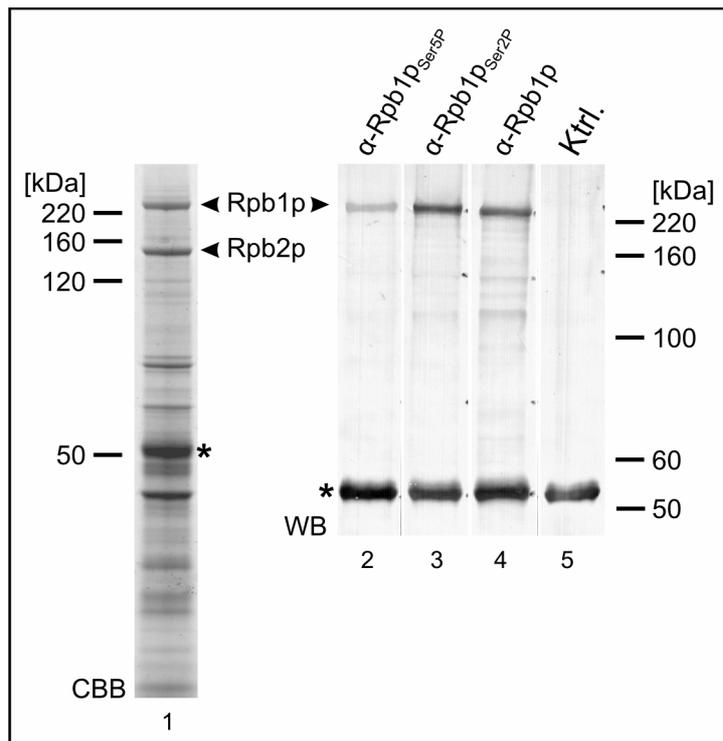
Es besteht eine gewisse Homologie zwischen der Pcf11p CID und Asr1p As 233 – 310, wobei auffälligerweise die As, die bei Pcf11p an der CTD-Bindung beteiligt sind, auch in Asr1p konserviert vorliegen. Dennoch beeinflusst eine Substitution der konservierten As D292, S293 und L294 gegen Alanin nicht die Bindung an die CTD – anders als bei den Pcf11p As D68, S69 und I70. Somit gibt es Unterschiede bei der CTD-Bindung von Asr1p und Pcf11p.

#### **IV.2.2.4. Asr1p bindet sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form der RNAPII**

Im Gegensatz zu Prokaryonten gibt es bei Eukaryonten drei unterschiedliche RNA Polymerasen. RNA Polymerase I katalysiert die Bildung von rRNA, RNA Polymerase III die von tRNAs und 5S rRNA. Die RNA Polymerase II hingegen ist für die Transkription unzähliger Protein-kodierender Gene verantwortlich und katalysiert die Bildung von snRNAs. Vergleicht man jeweils die größte Untereinheit dieser drei Polymerasen miteinander, so stellt man fest, dass eine deutliche Homologie vorliegt. Auch zur größten Untereinheit der bakteriellen RNA Polymerase liegt Homologie vor. Nichts desto trotz ist die einzigartige Struktur der C-terminalen Domäne (CTD) der größten Untereinheit nur bei der RNA-Polymerase II zu finden. Dort liegt sie hingegen bei allen Eukaryonten hoch konserviert vor. Sie besteht aus bis zu 52 Wiederholungen des Heptamer Peptids der Konsensussequenz  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$  (27 bei der Hefe). Die CTD dient als Rekrutierungsstelle für viele Faktoren,

die an Transkription oder RNA-Prozessierung beteiligt sind. Diese werden in Abhängigkeit spezifischer, reversibler Modifikationen der CTD – vor allem aufgrund des Phosphorylierungsmusters – rekrutiert. So wird unphosphorylierte RNAPII durch den Prä-Initiationskomplex am Promotor positioniert. Durch Phosphorylierung an Serin 5 können „Capping“-Enzyme binden, wird dann zusätzlich Serin 2 phosphoryliert, kommt es zur Aktivierung der Elongation und der RNA-Prozessierung. Welche Funktion die Serin 7 Phosphorylierung hat, ist bislang unbekannt. Dephosphorylierung an Serin 5 führt schließlich zur Rekrutierung von Faktoren, die an der Polyadenylierung, der mRNA-„Cleavage“ und der Termination beteiligt sind. Aber auch Modifikationen wie Glykosylierung oder Prolin cis/trans Isomerisierung spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Faktoren an die CTD (Egloff und Murphy, 2008)

Um zu untersuchen, mit welcher Form der RNAPII Asr1p interagiert, wurden phosphospezifische Antikörper verwendet. ProtA-Asr1p wurde im *asr1Δ* Stamm exprimiert und mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern für die unphosphorylierte, die Serin 2 phosphorylierte oder die Serin 5 phosphorylierte Form, analysiert (Abb. 25). Asr1p war sowohl mit der unphosphorylierten Form (Spur 4), als auch mit der Serin 2 phosphorylierten (Spur 3) und der Serin 5 phosphorylierten Form (Spur 2) assoziiert. Da Asr1p mit unterschiedlich phosphorylierten Formen der RNAPII interagiert, lässt sich durch diesen Versuch nicht bestimmen, ob Asr1p an der Initiation, der Elongation und RNA-Prozessierung, oder an der Termination der Transkription beteiligt ist. Vielleicht ist Asr1p auch während der kompletten Transkription an die CTD gebunden, oder bindet unabhängig vom Phosphorylierungszustand.



**Abb. 25 Asr1p assoziiert mit unterschiedlichen Phosphorylierungsformen der RNAPII**

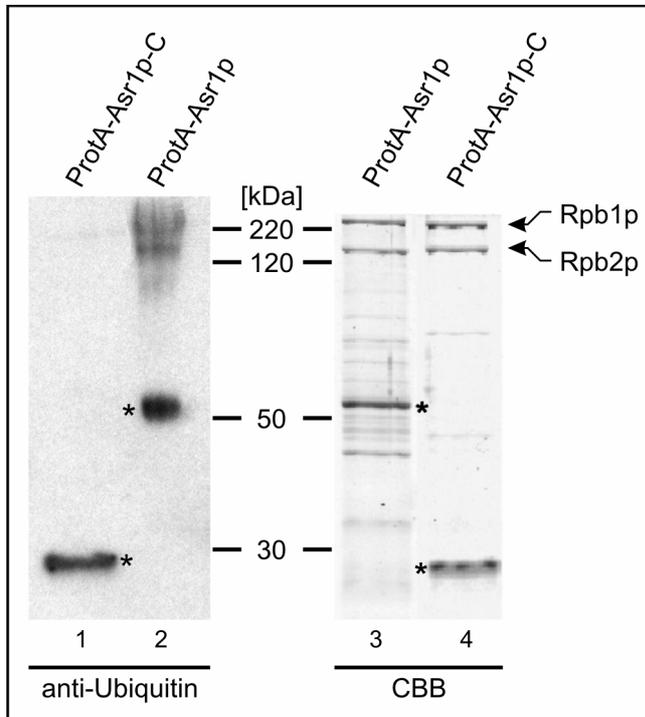
ProtA-Asr1p wurde im *asr1Δ* Stamm exprimiert und affinitätsgereinigt. Um zu testen, welche Formen der RNAPII co-gereinigt wurden, wurden die Eluate in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit 8WG16 Antikörpern (Spur 4), Ser2P spezifischen (Spur 3), Ser5P spezifischen (Spur 2) und zur Kontrolle mit Antikörpern, die nicht gegen die RNAPII gerichtet sind (Spur 5), analysiert. ProtA-Asr1p ist durch einen Stern („\*“) gekennzeichnet.

#### IV.2.2.5. Asr1p ubiquitiniert die beiden größten Untereinheiten der RNAPII

Nachdem nun gezeigt wurde, dass Asr1p mit allen Phosphorylierungsformen von Rpb1p assoziiert war, stellte sich die Frage, ob die RNAPII auch als Substrat für die Asr1p Ubiquitin-Ligase Aktivität fungiert. Zu Beginn dieser Arbeit war in der Bäckerhefe nur ein einziges Enzym beschrieben, das spezifisch die RNAPII ubiquitiniert: Rsp5p, eine HECT E3 Ubiquitin-Ligase (Somesh *et al.*, 2007).

Um zu testen, ob Rpb1p *in vivo* durch Asr1p ubiquitiniert wird, wurde ProtA-Asr1p, bzw. ProtA-Asr1p-C (hierbei fehlen sowohl RING- als auch PHD-Finger) im *asr1Δ* Stamm exprimiert und daraus affinitätsgereinigt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-Cmd1 Antikörpern analysiert (Abb. 26). Sowohl ProtA-Asr1p (Spur 3), als auch ProtA-Asr1p-C (Spur 4) assoziieren mit den beiden größten

Untereinheiten der RNAPII, Rpb1p und Rpb2p. Hierbei wurden im Western Blot durch anti-Ubiquitin Antikörper die mit ProtA-Asr1p assoziierten Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p als diffuse Banden erkannt (Spur 2), nicht jedoch in Assoziation mit ProtA-Asr1p-C, dem RING- und PHD-Finger fehlen (Spur 1).



**Abb. 26 Asr1p ubiquitiniert Rpb1p und Rpb2p *in vivo***

ProtA-Asr1p und ProtA-Asr1p-C wurden im *asr1Δ* Stamm exprimiert und mittels IgG-Sepharose affinitätsgereinigt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert.

Mit wildtypischem ProtA-getaggetem Asr1p assoziieren somit ubiquitinierte Formen der beiden größten RNAPII Untereinheiten. Bei Deletion der N-terminalen Region, die RING- und PHD-Finger beherbergt, assoziieren diese Untereinheiten noch mit der Asr1p-C Deletion, sie liegen aber nicht ubiquitiniert vor. Daraus kann man schließen, dass ein vollständig intaktes Asr1p für die Ubiquitinierung von Rpb1p und Rpb2p verantwortlich ist. Da kurz nach Durchführung dieses Versuchs von einer US-Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde, dass Asr1p eine Rpb1p-spezifische E3 Ubiquitin-Ligase ist, wurden diese Aspekte nicht weiter vertieft.

### **IV.2.3. Die CTD-Phosphatase Rtr1p**

#### **IV.2.3.1. Asr1p und Rtr1p sind zusammen in einem Komplex**

Bei der massenspektrometrischen Analyse von Asr1p wurden nicht nur Untereinheiten der RNA Polymerase II identifiziert, sondern auch ein Protein, das vom ORF YER139c auf Chromosom V kodiert wird. Es war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend uncharakterisiert. Aufgrund seiner RNAPII Bindefähigkeit wurde es Rtr1p für Regulator of transcription 1 genannt (Gibney *et al.*, 2008). Da auch dieses Protein an der RNAPII-abhängigen Transkription beteiligt zu sein scheint, war es ein interessantes Ziel für genauere Untersuchungen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde es als CTD-Phosphatase beschrieben, die die RNAPII während der Transkription reguliert (Mosley *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass Rtr1p im ProtA-Asr1p Eluat identifiziert wurde, weist darauf hin, dass beide Proteine in einem Komplex vorhanden sind. Ob sie direkt miteinander interagieren, muss genauer untersucht werden.

Weder biochemische Analysen (Pulldown, ProtA-Affinitätsreinigung), noch genetische Analysen (synthetische Letalität) konnten eine Interaktion zwischen Asr1p und Rtr1p bestätigen (Daten nicht gezeigt).

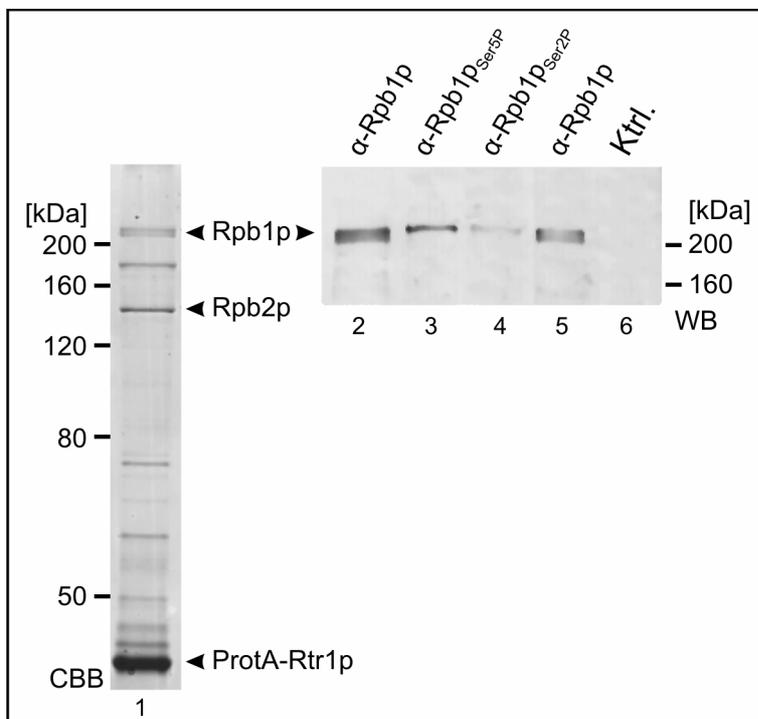
#### **IV.2.3.2. Rtr1p bindet die RNA Polymerase II**

In neuerer Zeit führten Hochdurchsatz-basierte proteomische Studien in der Hefe und in Säugern zu der Erkenntnis, dass Rtr1p (bzw. RPAP2 beim Menschen) mit etlichen Komponenten des RNA Polymerase II Komplexes interagieren könnte (Collins *et al.*, 2007; Gavin *et al.*, 2006; Jeronimo *et al.*, 2007). Zudem gab es zahlreiche genetische Wechselwirkungen zwischen Rtr1p und Komponenten der RNAPII, etwa Rpb9p und Rpb4p (Gibney *et al.*, 2008).

Um zu verifizieren, ob tatsächlich Komponenten des RNAPII Komplexes mit Rtr1p assoziieren, sollte eine ProtA-Affinitätsreinigung mit Rtr1p durchgeführt werden. Dazu wurde der *rtr1Δ* Stamm mit einem Plasmid transformiert, das für ProtA-Rtr1p kodiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2,4 kultiviert, geerntet, sphäroblastiert und lysiert. ProtA-Rtr1p wurde mit Hilfe von IgG-Sepharose aus dem Lysat gereinigt und das

Eluat mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-ProtA und phosphorylierungsspezifischen anti-Rpb1p Antikörpern analysiert, die spezifisch unphosphorylierte, Ser2-phosphorylierte oder Ser5-phosphorylierte CTD erkennen (Abb. 27).

Im Coomassie Brilliant Blue gefärbten Eluat der ProtA-Rtr1p Affinitätsreinigung (Spur 1) wurden neben ProtA-Rtr1p auch die beiden größten Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p der RNAPII gefunden. Interessant ist hierbei, dass Rpb1p in einer Doppelbande zu migrieren scheint, was auf Populationen unterschiedlicher Phosphorylierungszustände hindeuten könnte. Im Western Blot wurden beide Banden dieses Dubletts durch den 8WG16 Antikörper erkannt, der mit unphosphorylierten CTD Heptameren interagiert (Spuren 2 und 5). Die langsamer migrierende Bande des Dubletts interagiert stark mit dem H5 Antikörper, der spezifisch Serin 5 phosphorylierte CTD Heptamere erkennt (Spur 3). Hingegen zeigt sich nur eine schwache Interaktion mit dem H14 Antikörper, der spezifisch für Serin 2 Phosphorylierung ist (Spur 4). Zur Kontrolle auf Kreuzreaktionen mit ProtA wurde nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Spur 6). Keine der Rpb1p Banden wurde hierbei erkannt. Die Tatsache, dass mit ProtA-Rtr1p Untereinheiten der RNAPII Transkriptionsmaschinerie co-gereinigt wurden, und dass Rtr1p auch mit Serin 5 phosphorylierter – weniger mit Serin 2 phosphorylierter – Rpb1p assoziiert, spricht dafür, dass Rtr1p mit transkriptionell aktiver RNAPII interagiert. Somit könnte es an der Regulation der Transkription beteiligt sein.



**Abb. 27 Rtr1p assoziiert mit der transkriptionell aktiven Form der RNAPII**

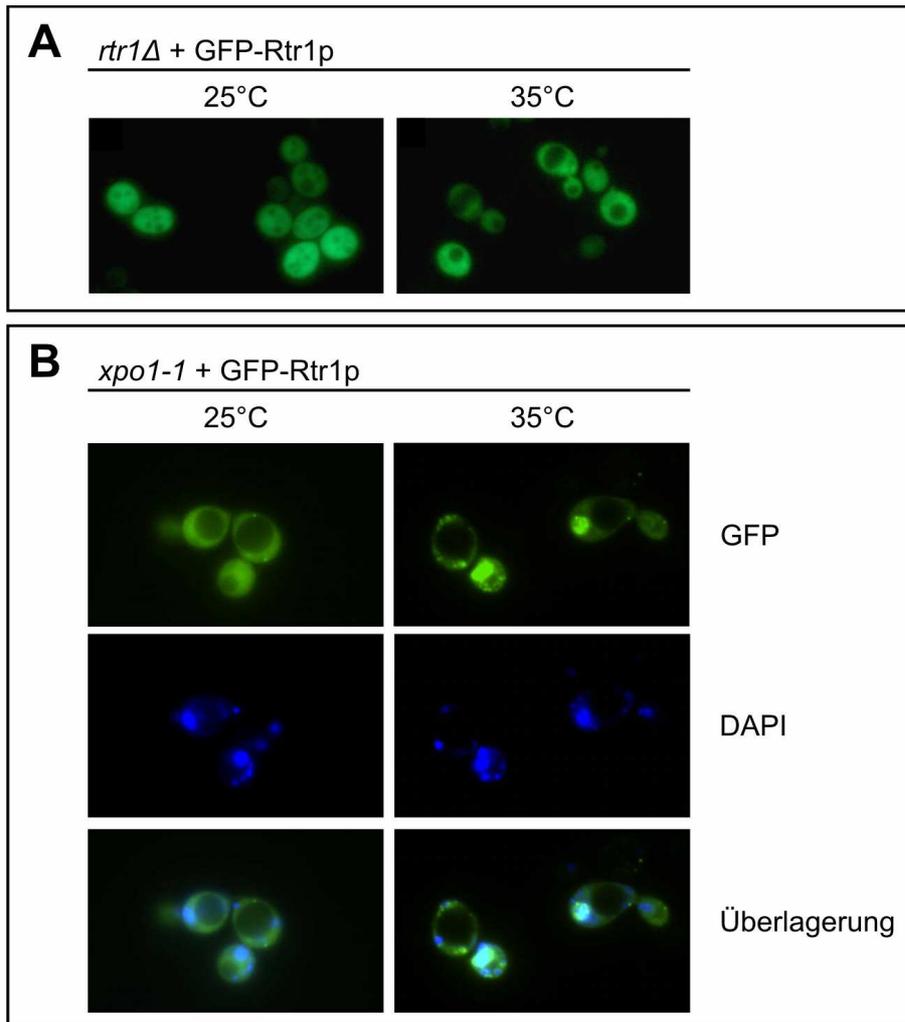
ProtA-Rtr1p wurde im *trt1Δ* Stamm exprimiert und affinitätsgereinigt. Um zu testen, welche Formen der RNAPII co-gereinigt wurden, wurden die Eluate in einer SDS-PAGE und anschließendem

Western Blot mit 8WG16 Antikörpern (Spuren 2 und 5), Ser5P spezifischen (Spur 3), Ser2P spezifischen (Spur4) und zur Kontrolle nur mit Sekundär-Antikörpern (Spur 6), analysiert.

### **IV.2.3.3. Rtr1p shuttelt konstitutiv zwischen Zellkern und Cytoplasma**

Da gezeigt wurde, dass Rtr1p mit Komponenten der RNAPII Transkriptionsmaschinerie interagiert, stellte sich die Frage, ob Rtr1p somit ein nukleäres Protein ist. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der PCR-Amplifikation aus genomischer DNA das RTR1 Gen amplifiziert und in den „single-copy“ pRS315-p*NOP-GFP* Vektor kloniert. Dieser wurde in den *rtr1Δ* Stamm transformiert, der in Selektivmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurde. Nach zehnminütiger Inkubation bei 25°C oder 35°C wurden die Hefen durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 28A). Es zeigte sich, dass GFP-Rtr1p sowohl bei 25°C als auch bei 35°C cytoplasmatisch lokalisiert, wobei jedoch kein Kernausschluss zu erkennen ist.

Da Rtr1p mit Komponenten der RNAPII interagiert, muss es auch in den Zellkern transportiert werden. Um dies zu untersuchen, wurde ein Hefestamm, der eine thermosensitive Mutation im *XPO1* Gen trägt, verwendet. Dieser *xpo1-1* Stamm exprimiert bei der permissiven Temperatur von 25°C den Exportfaktor Xpo1p, der NES-tragende Substrate aus dem Zellkern exportiert. Bei der restriktiven Temperatur von 35°C wird kein funktionales Xpo1p exprimiert, der Xpo1p abhängige Kernexport findet nicht statt. So wurde das Plasmid pRS315 p*NOP-GFP-RTR1* in den *xpo1-1* Stamm transformiert, die Zellen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in Selektivmedium kultiviert und dann für zehn Minuten bei 25°C oder 35°C inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Lokalisation des Fusionsproteins wurde per Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 28B). Wie zuvor lokalisierte GFP-Rtr1p auch im *xpo1-1* Stamm bei 25°C überwiegend im Cytoplasma. Nach zehnminütigem Temperaturshift auf 35°C zeigte sich hingegen eine Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern. Die DAPI-Färbung und die Überlagerung verdeutlichen diesen Befund nochmals. In Abwesenheit des Exportfaktors Xpo1p akkumuliert Rtr1p somit im Zellkern. Das lässt darauf schließen, dass Rtr1p konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern shuttelt, wobei das Gleichgewicht auf Seiten des Exportes liegt. Da jedoch kein funktioneller Zusammenhang zwischen Rtr1p und Asr1p gezeigt werden konnte (Bailer und Fries, unveröffentlichte Daten), wurde auf eine weitergehende Analyse von Rtr1p verzichtet. Stattdessen sollte Asr1p genauer charakterisiert werden.



**Abb. 28 Rtr1p** shuttelt konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern

**(A)** Der *rtr1Δ* Stamm wurde mit dem Plasmid pNOPGFP-RTR1 transformiert und bei 25°C in Selektivmedium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Eine Fraktion der Zellen wurde für acht Minuten bei 35°C inkubiert und sofort per Fluoreszenzmikroskopie analysiert. GFP-Filter, 1.000x Vergrößerung.

**(B)** Das Plasmid pNOPGFP-RTR1 wurde in den *xpo1-1* Hefestamm transformiert. Dieser wurde bei 25°C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in Selektivmedium kultiviert. Danach wurden die Zellen für 45 Minuten bei einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml DAPI inkubiert. Eine Fraktion wurde danach für acht Minuten bei 35°C inkubiert und sofort mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. GFP- und DAPI-Filter, 1.000x Vergrößerung. Die Überlagerung wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop CS erstellt.

### **IV.3. Der Kernimport von Asr1p**

#### **IV.3.1. Asr1p bildet Import-Komplexe mit einem Set von Importinen**

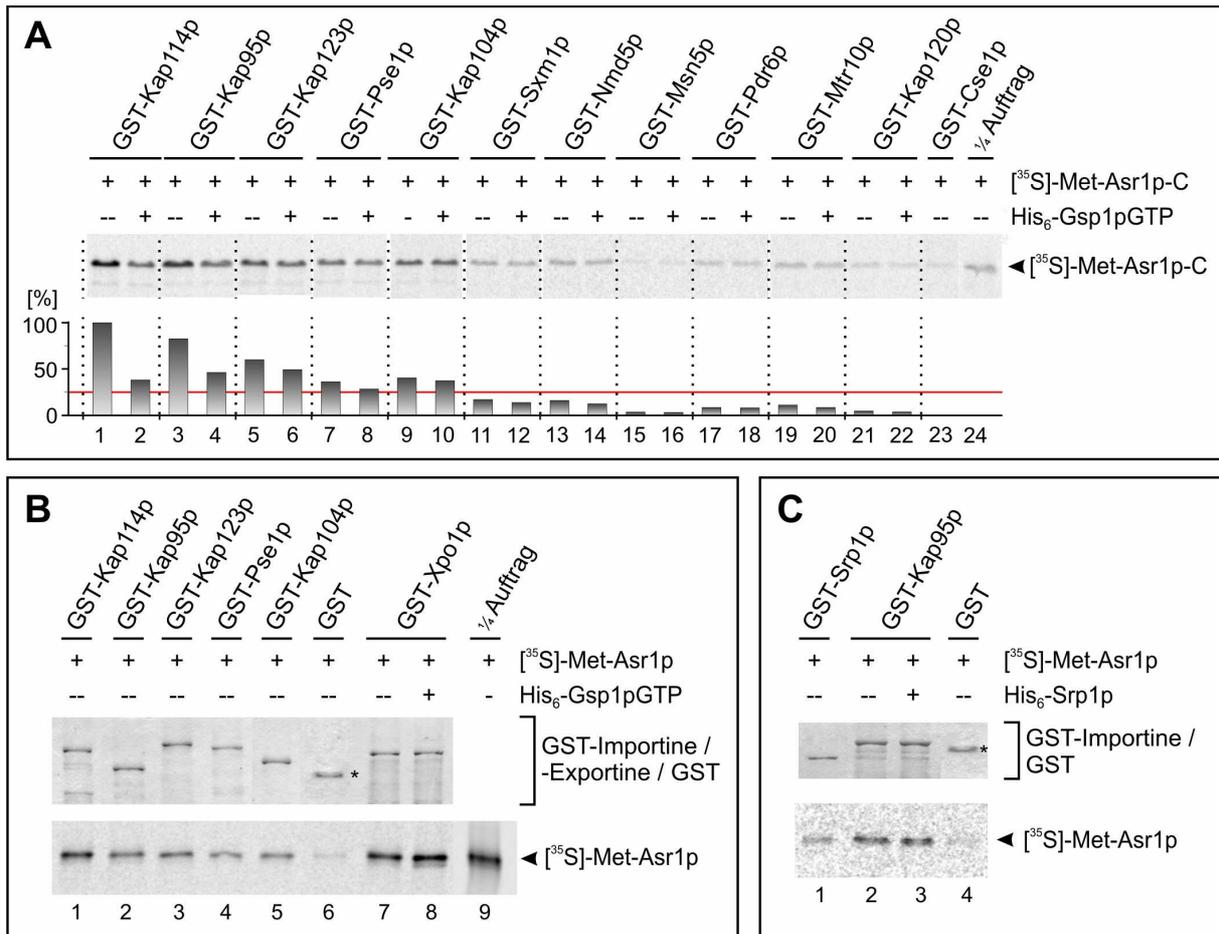
Die RNAPII ist ein Protein-Komplex, der für alle Eukaryonten essentiell und von größter Bedeutung ist. Er ist für die Transkription Protein-kodierender Gene verantwortlich. Da Asr1p an die größte Untereinheit der RNAPII bindet und diese ubiquitiniert, die Transkription bei Eukaryonten jedoch im Nukleus stattfindet, stellte sich die Frage, ob Asr1p in Kontakt mit der nukleocytoplasmatischen Transport-Maschinerie steht. Dafür würde sprechen, dass es ursprünglich in einem Hefe-Zwei-Hybrid – Screen mit dem Kernporenprotein Nup116p identifiziert wurde (Bailer, unveröffentlichte Daten). In der Tat wurde gezeigt, dass Asr1p unter Normalbedingungen zwar im Cytoplasma lokalisiert ist, dass es jedoch konstitutiv zwischen Cytoplasma und Nukleus „shuttelt“, wobei das Gleichgewicht auf Seiten des Exportes liegt. Eine Sequenz, die in der C-terminalen Region von Asr1p liegt, vermittelt den Kernimport (Betz *et al.*, 2004).

Um zu testen, welche Faktoren am nukleären Import von Asr1p beteiligt sind, wurde untersucht, mit welchen Importinen Asr1p funktionelle Komplexe bilden kann. Hierbei binden Importine an ihre Import-Substrate und die entstandenen Komplexe werden anschließend durch Kernporen in den Nukleus transferiert. Dort werden sie durch eine hohe Konzentration der GTP-gebundenen Form von Ran (in der Hefe Gsp1pGTP) wieder dissoziiert. GST-Fusionen der Importine Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p, Kap104p, Sxm1p, Nmd5p, Msn5p, Pdr6p, Mtr10p, Kap120p und des Exportins Cse1p, sowie GST selbst wurden heterolog im *E. coli* Bakterienstamm BL21(DE3) exprimiert und mittels GSH-Sepharose affinitätsgereinigt. Nach Verbindung dieser Fusionsproteine an GSH-Sepharose wurden sie für 45 Minuten mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C inkubiert. Um zu überprüfen, ob funktionelle Import-Komplexe gebildet werden, die dissoziierbar sind, wurde anschließend für 45 Minuten mit His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP inkubiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie analysiert, die Menge an gebundenem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C wurde mittels der Software ImageQuant TL quantifiziert und auf die Menge des an GST-Cse1p gebundenen [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C normalisiert. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei die Ergebnisse nur geringfügig variierten. In Abbildung 29A ist zu sehen, dass die Importine Kap114p (Spuren 1 und 2), Kap95p (Spuren 3 und 4), Kap123p (Spuren 5 und 6), Pse1p (Spuren 7 und 8) und Kap104p (Spuren 9 und 10) funktionale Komplexe bildeten, die mehr oder weniger stark dissoziierbar waren. Obwohl einige dieser Komplexe durch Gsp1pGTP nur wenig dissoziiert wurden, war das Ergebnis in

allen drei Ansätzen reproduzierbar. Die Importine Sxm1p (Spuren 11 und 12) und Nmd5p (Spuren 13 und 14) zeigten eine relativ schwache Bindung, Msn5p (Spuren 15 und 16), Pdr6p (Spuren 17 und 18), Mtr10p (Spuren 19 und 20) und Kap120p (Spuren 21 und 22) eine vernachlässigbar geringe Bindung, die kaum stärker war als die des Exportins Cse1p (Spuren 23 und 24), das als Negativ-Kontrolle eingesetzt wurde. Die Schwelle für eine signifikante Bindung wurde auf 25% der Bindung an GST-Kap114p festgelegt und ist durch eine rote Linie markiert.

Um zu analysieren, ob sich die Bindung dieser Importine an Vollängen Asr1p ähnlich verhält, wurde radioaktiv markiertes, *in vitro* translatiertes [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p an GST-Kap114p, GST-Kap95, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104, GST und GST-Xpo1p gebunden (Abb. 29B). Wie zuvor band [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p deutlich an GST-Kap114p (Spur 1), GST-Kap95p (Spur 2), und GST-Kap123p (Spur 3), während weniger [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p an GST-Pse1p (Spur 4) und GST-Kap104p (Spur 5) band. An GST selbst (Spur 6, Negativkontrolle) band praktisch kein [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p, während es an GST-Xpo1p (Spuren 7 und 8, Positivkontrolle) deutlich band, wobei die Bindung in Anwesenheit von Gsp1pGTP noch verstärkt wurde. Substrate des Importins Kap95p binden beim klassischen, NLS-vermittelten Import mit Hilfe des Adapter-Proteins Srp1p (Hefehomolog von Importin  $\alpha$ ). Es gibt jedoch auch einige Substrate, die direkt an Kap95p binden. Um zu untersuchen, ob die Bindung unabhängig vom Adapter-Protein Srp1p stattfindet, wurde radioaktiv markiertes, *in vitro* translatiertes [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p mit heterolog exprimiertem, an GSH-Sepharose vorgebundenem GST-Srp1p, GST-Kap95 und GST selbst inkubiert. Hierbei wurde GST-Kap95p in Anwesenheit und in Abwesenheit von His<sub>6</sub>-Srp1p mit [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p inkubiert (Abb. 29C). [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p band nur schwach an GST selbst oder an GST-Srp1p (Spuren 4 und 1). Die deutlich stärkere Bindung an GST-Kap95p blieb durch Zugabe von His<sub>6</sub>-Srp1p unbeeinflusst (Spuren 2 und 3).

Diese Daten bestätigen, dass Asr1p in Kontakt mit der nukleocytoplasmatischen Transportmaschinerie steht. Es kann funktionelle Komplexe mit den Importinen Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p bilden. Die Bindung an die Importfaktoren wird durch die C-terminale Region vermittelt. Die Bindung an Kap95p ist unabhängig vom Adapter-Protein Srp1p.



**Abb. 29 Asr1p bildet funktionale Import-Komplexe mit Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p**

**(A)** GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104p, GST-Sxm1p, GST-Nmd5p, GST-Msn5p, GST-Pdr6p, GST-Mtr10p, GST-Kap120p, GST-Cse1p und His<sub>6</sub>-Srp1p wurden heterolog im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert und affinitätsgereinigt. Die GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und für 45 min bei 4°C mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Puffer wurde für 45 min bei 4°C mit His<sub>6</sub>-Srp1p oder mit Puffer inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließender Autoradiografie analysiert. Die Menge an gebundenem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C wurde durch Quantifizierung ermittelt und dargestellt (ImageQuant TL 2003)

**(B)** Heterolog exprimiertes, an GSH-Sepharose vorgebundenen GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104p, GST und GST-Xpo1p wurden mit [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Autoradiogramm analysiert.

**(C)** Heterolog exprimiertes, an GSH-Sepharose vorgebundenen GST-Srp1p, GST-Kap95p und GST wurden mit [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p in Anwesenheit und Abwesenheit von His<sub>6</sub>-Srp1p inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Autoradiogramm analysiert.

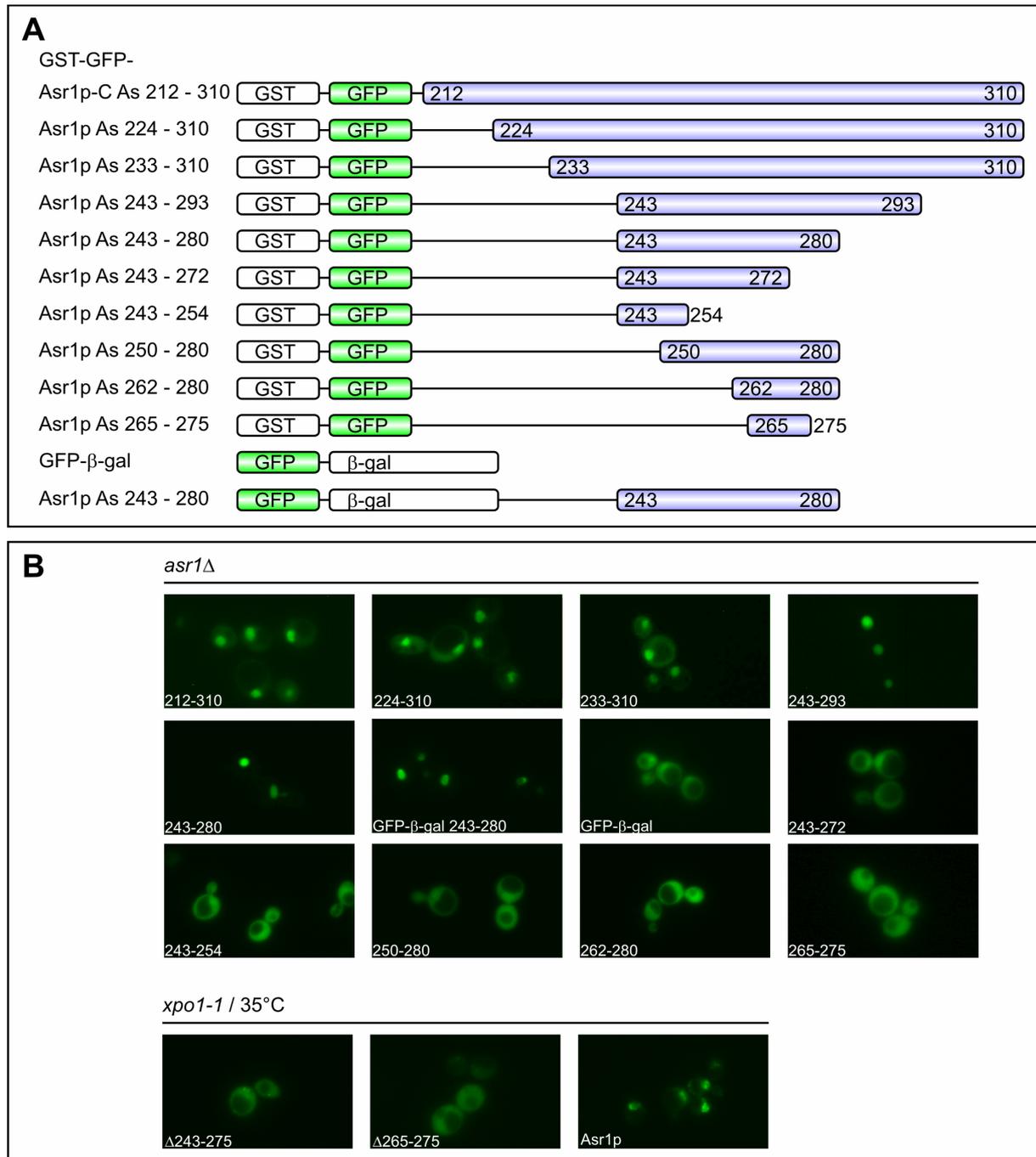
### IV.3.2. Eine kurze Sequenz innerhalb der C-terminalen Region ist ausreichend für den Kernimport von Asr1p

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die C-terminale Region von Asr1p funktionale Komplexe mit einer Reihe von Importfaktoren bilden kann, sollte nun die für den Import

verantwortliche Sequenz näher analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese in der C-terminalen Region beherbergt sein muss. Sie wurde auf die As 258 – 293 eingegrenzt (Betz, 2004). Diese Region vermittelt jedoch nur deutlich verminderten Kernimport. Deshalb sollte die Importsequenz erneut so eingegrenzt werden, dass sie eindeutig den Kernimport vermittelt. Da Asr1p kein klassisches NLS beherbergt, das durch eine Konsensussequenz charakterisiert ist, wurde eine Deletionsanalyse zur Eingrenzung der Kern-Importsequenz durchgeführt. Dazu wurden mittels PCR-Amplifikation diverse Deletionen von *ASR1-C* hergestellt und in den pRS425-*GST-GFP*-Vektor kloniert, wobei sukzessive erst der N-terminale, dann der C-terminale Bereich deletiert wurde. Die so konstruierten Vektoren wurden im *asr1Δ* Stamm exprimiert und die Lokalisation der Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das Molekulargewicht betrug bei allen Fusionsproteinen mehr als 54 kDa. Ein Import in den Zellkern durch freie Diffusion ist somit unwahrscheinlich.

In Abbildung 30A sind die analysierten Fusionsproteine aus GST-GFP und den Asr1p Deletionen schematisch dargestellt. Die adäquate Lokalisation im *asr1Δ* Stamm ist in Abbildung 30B gezeigt. So konnte Asr1p-C N-terminal bis zur As 243 deletiert werden, ohne dass die nukleäre Lokalisation beeinträchtigt wurde. Weitere N-terminale Deletion führte zur Anreicherung des Fusionsproteins im Cytoplasma. Die C-terminale Region konnte bis zur As 280 deletiert werden, ohne die Kern-Lokalisation zu beeinträchtigen. Auch hier führten weitere Deletionen zu einer Anreicherung im Cytoplasma. Die minimale, zur Kernlokalisation ausreichende Sequenz konnte somit auf die As 243 – 280 eingegrenzt werden. Auch als Fusion mit GFP-β-gal waren die As 243 – 280 ausreichend für den Kern-Import, während GFP-β-gal selbst im Cytoplasma lokalisierte. Ein passiver Import durch freie Diffusion ist somit ausgeschlossen. Um zu testen, ob die minimale Kern-Importregion nicht nur ausreichend sondern auch notwendig ist, wurden GFP-Asr1p Fusionsproteine, bei denen die As 243 – 275 oder 265 – 275 deletiert waren, im Import-defizienten *xpo1-1* Stamm exprimiert und deren Lokalisation untersucht (Abb. 30B). Bei der restriktiven Temperatur von 35°C waren GFP-Asr1p Δ As 243 – 275 und GFP-Asr1p Δ As 265 – 275 im Cytoplasma lokalisiert. GFP-Asr1p hingegen war im Zellkern lokalisiert.

Die für den Kern-Import von Asr1p verantwortliche Sequenz konnte anhand der Deletionsanalysen auf die As 243 – 280 eingegrenzt werden. Diese Sequenz ist sowohl ausreichend als auch notwendig für den nukleären Import von Asr1p.



**Abb. 30 Deletionsanalyse zur Eingrenzung der minimalen Kern-Importsequenz von Asr1p**

(A) Schematische Darstellung der erzeugten Asr1p-C Deletionen, die an GST-GFP oder GFP-β-gal anfusioniert sind.

(B) Die GST-GFP- oder GFP-β-gal Fusionsproteine wurden im *asr1Δ* Stamm exprimiert. Die Lokalisation wurde während der exponentiellen Wachstumsphase mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (GFP-Filter, 1.000 x Vergrößerung).

Vektoren, die für die Fusionsproteine GFP-Asr1p, GFP-Asr1p Δ As 243 – 275 und GFP-Asr1p Δ As 265 – 275 kodieren, wurden in den *xpo1-1* Stamm transformiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium kultiviert, bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreichten, dann wurden sie für 10 Minuten bei der restriktiven Temperatur von 35°C inkubiert und die Lokalisation der Fusionsproteine sofort mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (GFP-Filter, 1.000 x Vergrößerung). GST-GFP-Asr1p As 212-310, As 224-310 und As 233-310 wurden von Dr. C. Betz mikroskopiert.

### IV.3.3. Mutationsanalyse der Asr1p Kern-Importsequenz

Anhand der durchgeführten Deletionsanalyse konnte die für den Kernimport ausreichende und notwendige Sequenz auf die As 243 – 280 eingegrenzt werden. Welche Motive innerhalb dieser Sequenz tatsächlich den Kernimport vermitteln, war jedoch unbekannt. Deshalb wurde erst nach Aminosäure-Resten gesucht, die konserviert in der Hefe vorliegen. Dazu wurde ein Homologievergleich der Asr1p Kern-Importsequenz As 243 – 280 mit der adäquaten Sequenz verwandter Hefen durchgeführt. Dieser ist in Abbildung 31A zu sehen. Identische As sind hierbei dunkelblau unterlegt, stark konservierte blau und schwach konservierte hellblau. Man erkennt deutlich, dass es zwei konservierte Blöcke gibt, die durch eine Linkerregion variabler Länge voneinander getrennt sind. So gibt es zum einen viele konservierte Reste im Bereich der Asr1p As 243 – 254, zum anderen im Bereich der As 265 – 277. Strukturvorhersagen lassen vermuten, dass es sich bei Asr1p 243 – 280 um zwei kurze  $\alpha$ -Helices handelt, die durch einen „Turn“ voneinander getrennt sind.

Um zu untersuchen, welche dieser konserviert vorliegenden Reste eine Rolle beim Kernimport von Asr1p spielen, wurden Vektoren konstruiert, die für GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 und diverse Mutationen kodieren, bei denen konservierte Reste gegen Alanine ausgetauscht waren. Diese mutierten Fusionsproteine wurden im *asr1 $\Delta$*  Stamm exprimiert und ihre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 31B). Das wildtypische Fusionsprotein GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 ist fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Mutationen in Hefen konserviert vorliegender Aminosäuren im ersten Block (As I243A/Q244A, H246A/R248A, L251A/Y254A) zeigten praktisch keinen Einfluss auf die Lokalisation der Fusionsproteine. Hierbei war bestenfalls eine kaum wahrnehmbare Lokalisation im Cytoplasma aufgetreten (I243A/Q244A). Der Austausch konserviert vorliegender As im zweiten Block führte im Fall der Mutationen S273A/R274A und R274A/K275A zu einer verstärkten Lokalisation im Cytoplasma, wobei trotzdem noch eine deutliche Lokalisation im Zellkern auftrat. D263A/Y265A/K266A führte zu keiner Beeinträchtigung der Lokalisation. Auch die variable Region zwischen den konserviert vorliegenden Blöcken wurde mutiert, da diese möglicherweise eine „Turn“-Struktur ausbildet. Deshalb wurden die beiden Proline gegen Alanine ausgetauscht. Die Mutation P255A resultierte in einer Lokalisation des Fusionsproteins an der Plasmamembran und zum Teil an der Kernmembran. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Mutation P255A/P257A, während P257A nur zu einer sehr schwachen Lokalisation im Cytoplasma führte.

Während im ersten konserviert vorliegenden Block keine der getesteten Mutationen die Lokalisation des Fusionsproteins GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 signifikant beeinträchtigte,



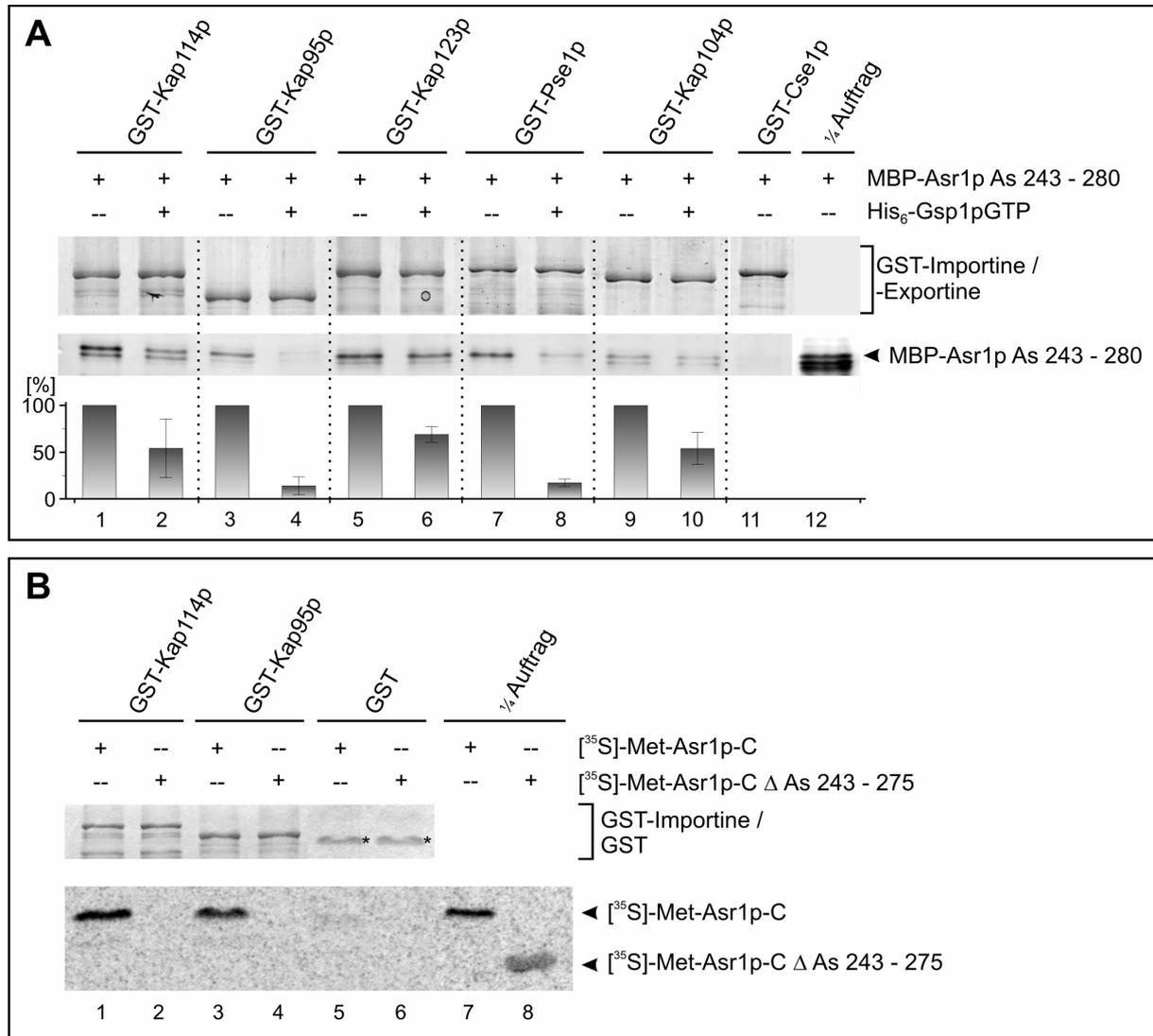
#### **IV.3.4. Die Kern-Importsequenz interagiert direkt und funktionell mit einer Reihe von Importfaktoren**

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass Asr1p mit den Importinen Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p interagiert. Mittels Deletionsanalyse konnte die Sequenz innerhalb Asr1p, die für den Kernimport verantwortlich ist, auf die Aminosäuren 243 – 280 eingegrenzt werden. Nun sollte gezeigt werden, dass genau diese minimale Kern-Importsequenz auch funktionale Komplexe mit den zuvor identifizierten Importfaktoren bilden kann.

MBP-Asr1p As 243 – 280 wurde im *E. coli* Stamm ER2508, der defizient ist für die wichtigste ATP-abhängige Protease in *E. coli*, exprimiert und aufgereinigt. His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP, GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104, GST-Cse1p und GST selbst wurden im *E. coli* Stamm BL21 exprimiert und aufgereinigt. Die GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und mit MBP-Asr1p As 243 – 280 inkubiert. Im Anschluss wurde mit His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP oder Puffer inkubiert, um die Funktionalität der Bindung zu überprüfen. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und folgendem Western Blot mit anti-MBP Antikörpern analysiert. Die Menge an gebundenem MBP-Asr1p As 243 – 280 wurde mittels ImageQuant TL Software quantifiziert. Hierbei wurde die Probe, die nicht mit Gsp1pGTP inkubiert wurde, mit 100% Bindung gleichgesetzt. Der Versuch wurde unabhängig voneinander dreifach ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32A dargestellt. Wie erwartet hat MBP-Asr1p As 243 – 280 an die Importfaktoren GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p und GST-Kap104p gebunden (Spuren 1, 3, 5, 7 und 9), während praktisch keine Bindung an den Exportfaktor GST-Cse1p erfolgte (Spur 11, Negativkontrolle). Die so gebildeten Importkomplexe waren funktional, da die Bindung sensitiv auf Zugabe von His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP war (Spuren 2, 4, 6, 8 und 10). Die Dissoziation fand hier mehr oder weniger stark statt, war aber bei allen Ansätzen reproduzierbar (Dreifachbestimmung).

Weiter wurde untersucht, ob die minimale Importsequenz auch notwendig ist zur Bindung an die identifizierten Importfaktoren. Dazu wurde GST-Kap114p, GST-Kap95p oder GST selbst an GSH-Sepharose vorgebunden und mit radioaktiv markiertem, in Kaninchen Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C oder [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C Δ As 243 – 275 inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem anschließenden Autoradiogramm analysiert (Abb. 32B). Wie zuvor schon gezeigt, fand eine Bindung von [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C an GST-Kap114p (Spur 1) und GST-Kap95p (Spur 3), nicht aber an GST selbst statt (Spur 5). Bei Deletion der Asr1p Reste 243 – 275 fand hingegen

keine Bindung an GST-Kap114p (Spur 2), GST-Kap95p (Spur 4) oder GST (Spur 6) statt. Die eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine sind in den Spuren 7 und 8 aufgetragen.



**Abb. 32 Die Asr1p Kern-Importsequenz As 243 – 280 interagiert direkt und funktionell mit einer Reihe von Importfaktoren**

**(A)** MBP-Asr1p As 243 – 280 wurde im *E. coli* Stamm ER2508 exprimiert, GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104p, GST-Cse1p und His<sub>6</sub>-Srp1pGTP wurden im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert und daraus affinitätsgereinigt. Die GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und für 45 min bei 4°C mit MBP-Asr1p As 243 - 280 inkubiert. Nach dem Waschen mit Puffer wurde für 45 min bei 4°C mit His<sub>6</sub>-Srp1p oder mit Puffer inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (anti-MBP Antikörper) analysiert. Die Menge an gebundenem MBP-Asr1p As 243 - 280 wurde durch Quantifizierung ermittelt und als Diagramm dargestellt (ImageQuant TL). Die Bindung an die Importine in Abwesenheit von Gsp1pGTP wurde als 100% festgesetzt. Der Versuch wurde als Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Standard-Abweichung wurde eingezeichnet.

**(B)** GST-Kap114p, GST-Kap95p und GST wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C oder [<sup>35</sup>S]-Met-Asr1p-C Δ As 243 – 275 inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Die Position des GST (durch „\*“ markiert) wurde in der Montage an die GST-getaggten Proteine angeglichen und entspricht nicht seinem Migrationsverhalten im SDS-Gel.

Somit wurde gezeigt, dass die Importfaktoren Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p an die minimale Kern-Importsequenz Asr1p As 243 – 280 binden. Diese Sequenz ist sowohl ausreichend als auch notwendig zur Bindung der Importfaktoren. Die Bindung ist sensitiv auf Zugabe von Gsp1pGTP und somit funktionell. Außerdem interagiert Asr1p direkt mit den genannten Importinen. Der Kernimport von Asr1p ist somit direkt von der identifizierten Kern-Importsequenz abhängig.

#### **IV.3.5. Der Kernimport von Asr1p wird *in vivo* durch eine Reihe von Importfaktoren bewerkstelligt**

Zahlreiche *in vitro* Bindestudien hatten bereits gezeigt, dass Asr1p mit einer Reihe von Importinen direkt in Wechselwirkung steht. Im Folgenden sollten diese Ergebnisse auch *in vivo* bestätigt werden.

Je nach Genotyp der im Folgenden verwendeten Hefestämme wurde ein pRS315 oder ein pRS316 single-copy Vektor verwendet, um neue Plasmide zu konstruieren, die für ein Fusionsprotein aus GST-GFP und Asr1p As 243 – 293 unter Kontrolle des induzierbaren pGAL-Promotors kodieren. Zweck des induzierbaren Promotors ist es zu vermeiden, dass Proteine mit nur geringer Importaktivität bei konstitutiver Expression über einen längeren Zeitraum dennoch im Zellkern akkumulieren. Der induzierbare Promotor ermöglicht den zeitlichen Verlauf des Importes besser untersuchen zu können.

Die so konstruierten Plasmide wurden in Hefestämme transformiert, die für ausgewählte Importfaktoren defizient sind, bzw. die bei essentiellen Importfaktoren eine thermosensitive Mutation im jeweiligen Gen tragen. Es wurden auch Stämme verwendet, die defizient für zwei oder drei Importfaktoren sind. Die transformierten Hefen wurden in Raffinose-Selektivmedium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Dies ist notwendig, da der pGAL Promotor in Anwesenheit von Glucose reprimiert wird. Schließlich wurde für 2 Stunden mit 2% Galaktose induziert. Thermosensitive Hefestämme wurden während der Induktion sowohl bei der restriktiven Temperatur von 35°C als auch bei der permissiven Temperatur von 27°C inkubiert. Um die korrekte Expression der Fusionsproteine zu testen, wurden außerdem Totallysate der induzierten Hefen hergestellt und im Western-Blot mit anti-GFP Antikörpern analysiert. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde sofort mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Abbildung 33A zeigt die Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 im wildtypischen *W303* Hefestamm. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen unter Verwendung des GFP- (Bild a und b), des DAPI-Filters (Bild c) oder durch Phasenkontrast-Mikroskopie (Bild d) analysiert.

In Abbildung 33B ist der zeitliche Verlauf der Galaktose-Induktion dargestellt. Im wildtypischen *W303* Hefestamm wurde GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 durch Inkubation mit Galaktose induziert. Nach 0, 30, 60, 90 und 180 Minuten wurden Totallysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (anti-GFP Antikörper) analysiert wurden. Bereits nach 30 Minuten (Spur 2) konnte die Expression von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 detektiert werden, die ihr Maximum zwischen 90 (Spur 4) und 180 Minuten (Spur 5) erreichte.

Die subzelluläre Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 ist in Abbildung 33C für ausgewählte Hefestämme zu sehen. So zeigt sich beim *rs1-1* Stamm, der eine thermosensitive Mutation im *KAP95* Gen trägt, eine deutliche cytoplasmatische Lokalisation bei restriktiver Temperatur (35 °C) (Bild b), nicht aber bei permissiver Temperatur (27 °C) (Bild a). Auch der *pse1-1* Stamm trägt eine thermosensitive Mutation im adäquaten Gen. Bei restriktiver Temperatur (35 °C) (Bild d) ist eine deutliche cytoplasmatische Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 zu verzeichnen, die in abgeschwächter Form auch schon bei 27 °C (Bild c) zu sehen ist. Bei den Hefestämmen *kap114Δ* und *kap123Δ*, die defizient für die entsprechenden Importine sind, tritt zwar bei 27 °C kein Effekt auf (Bilder e und g), bei 35 °C zeigt sich jedoch eine cytoplasmatische Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 (Bilder f und h). Obwohl diese beiden Stämme nicht thermosensitiv sind, könnte hierbei der genetische Hintergrund eine Rolle spielen. Noch deutlichere Effekte gab es bei der Analyse der Stämme *pse1-1/kap114Δ*, *pse1-1/kap123Δ*, *pse1-1/kap104Δ* und *kap114Δ/kap123Δ*, die defizient für jeweils zwei Importine sind. Bei diesen Stämmen zeigte sich bei 35 °C eine sehr starke cytoplasmatische Lokalisation (Bilder j, l n und p). Bei 27 °C war dieser Effekt deutlich schwächer ausgeprägt (Bilder i, k, m und o). Die übrigen Stämme zeigten keine Änderung der subzellulären Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 (Bilder q, r, s und t), auch nicht bei 35 °C (Daten nicht gezeigt).



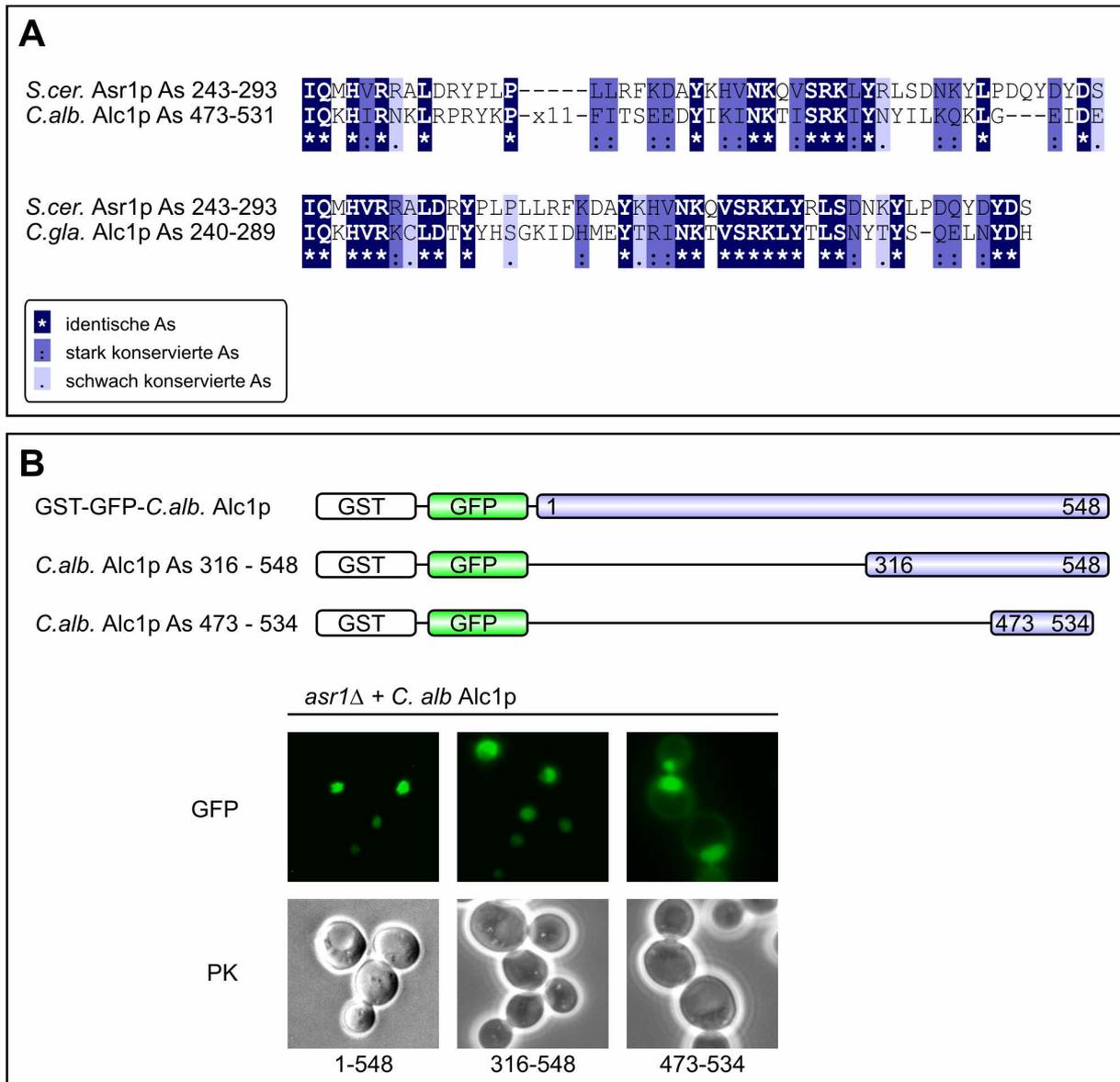
(D) Totallysate der GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 exprimierenden Stämme *kap123Δ* und *kap114Δ/kap123Δ* wurden nach Induktion bei 27°C und bei 35°C angefertigt und in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit anti-GFP Antikörpern analysiert.

Um sicher zu stellen, dass die cytoplasmatische Lokalisation von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 im *kap123Δ* und *kap114Δ/123Δ* Stamm bei 35°C nicht auf eine C-terminale Degradation des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurden die Totallysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem folgenden Western Blot mit anti-GFP Antikörpern analysiert. Es ist zu erkennen, dass es weder im *kap123Δ* (Spuren 1 und 2), noch im *kap114Δ/123Δ* Stamm (Spuren 3 – 5) bei 35°C zu einem verstärkten Auftreten von Degradationsprodukten kommt (Spuren 2 und 5). Das Bandenmuster bei 27°C und 35°C unterscheidet sich praktisch nicht.

Dieser Versuch hat somit die zuvor erhaltenen *in vitro* Ergebnisse bestätigt. Auch *in vivo* sind die Importfaktoren Kap95p, Pse1p, Kap114p und Kap123p am Kernimport von GST-GFP-Asr1p As 243 – 293 beteiligt. Das Ausschalten zweier dieser Importine verstärkt diesen Effekt sogar noch, so dass es sich evtl. um kooperative Effekte handeln könnte. Ob Kap104p *in vivo* am Kernimport beteiligt ist, bleibt unklar, da der entsprechende Disruptions-Hefestamm das Fusionsprotein nicht exprimiert hat.

### **IV.3.6. Der Mechanismus des Kernimportes von Asr1p ist in Hefen konserviert**

Nachdem der Kernimport von Asr1p gut charakterisiert war, stellte sich die Frage, ob sich Asr1p Orthologe aus verwandten Hefen beim nukleären Import ähnlich verhalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Importmechanismus auch in Säugern konserviert vorliegt (Fries, 2005). Zu diesem Zweck wurden zwei noch uncharakterisierte, putative Orthologe aus *Candida albicans* (*C. alb*) und *Candida glabrata* (*C. gla*) näher untersucht. Der *C. alb* ORF IPF9048.1 (orf19.2229) zeigt 32,7% Sequenz-Homologie zu Asr1p, der *C. gla* ORF CATG61534.1 sogar 60,3% Sequenz-Homologie ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)). Demnach wurden die beiden Proteine *C. alb* oder *C. gla* Alc1p für ASR1-like proteins in Candida genannt. Ein Alignment der Asr1p Aminosäuren 243 – 293, die die Kernlokalisierung vermitteln, mit den beiden *Candida* Orthologen zeigte die Existenz einer stark homologen Region innerhalb der Aminosäuren 473 – 531 bei *C. alb*, bzw. 240 – 289 bei *C. gla* (Abb. 34A).



**Abb. 34 Der Mechanismus des Kernimports von Asr1p liegt in der Hefe konserviert vor**

**(A)** Homologievergleich der Asr1p Importsequenz (As 243 – 293) mit den putativen Orthologen der Hefen *Candida albicans* (*C. alb*) und *Candida glabrata* (*C. gla*).

**(B)** Der *asr1Δ* Hefestamm wurde mit Vektoren, die für GST-GFP-*C. alb*-Alc1p As 1 – 548, GST-GFP-*C. alb*-Alc1p As 316 – 548 oder GST-GFP-*C. alb*-Alc1p As 473 – 534 kodieren, transformiert. Die Hefen wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in Selektivmedium kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (GFP-Filter und Phasenkontrast (PK), 1.000x Vergrößerung). Die Fusionsproteine sind schematisch dargestellt. GST-GFP-*C. alb*. Alc1p As 1-548 wurde von Dr. C. Betz mikroskopiert.

Um die subzelluläre Lokalisation von *C. alb* Alc1p zu analysieren, wurde die Sequenz von genomischer DNA durch PCR amplifiziert (Dr. Kai Sohn, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) und in den pRS425-GST-GFP Vektor kloniert. Außerdem wurden auch die Regionen, die homolog zur Asr1p C-terminalen Region (*C. alb* Alc1p As 316 – 548) sowie zu Asr1p As 243 – 293 (*C. alb* Alc1p As 473 – 534)

waren, in diesen Vektor kloniert. Die Vektoren wurden in den *S. cer. asr1Δ* Stamm transformiert und heterolog exprimiert. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 34B). Das Volllängeprotein *C. alb* Alc1p As 1 – 548 lokalisiert im Gegensatz zu Asr1p im *asr1Δ* Stamm im Zellkern. Sowohl die C-terminale Region *C. alb* Alc1p As 1 – 548, als auch die zur Asr1p-Importsequenz homologe Region *C. alb* Alc1p As 473 – 534 akkumulieren im Zellkern. Das bedeutet, dass die für den Kernimport verantwortliche Sequenz innerhalb dieser Aminosäuren beherbergt sein muss und somit konserviert ist.

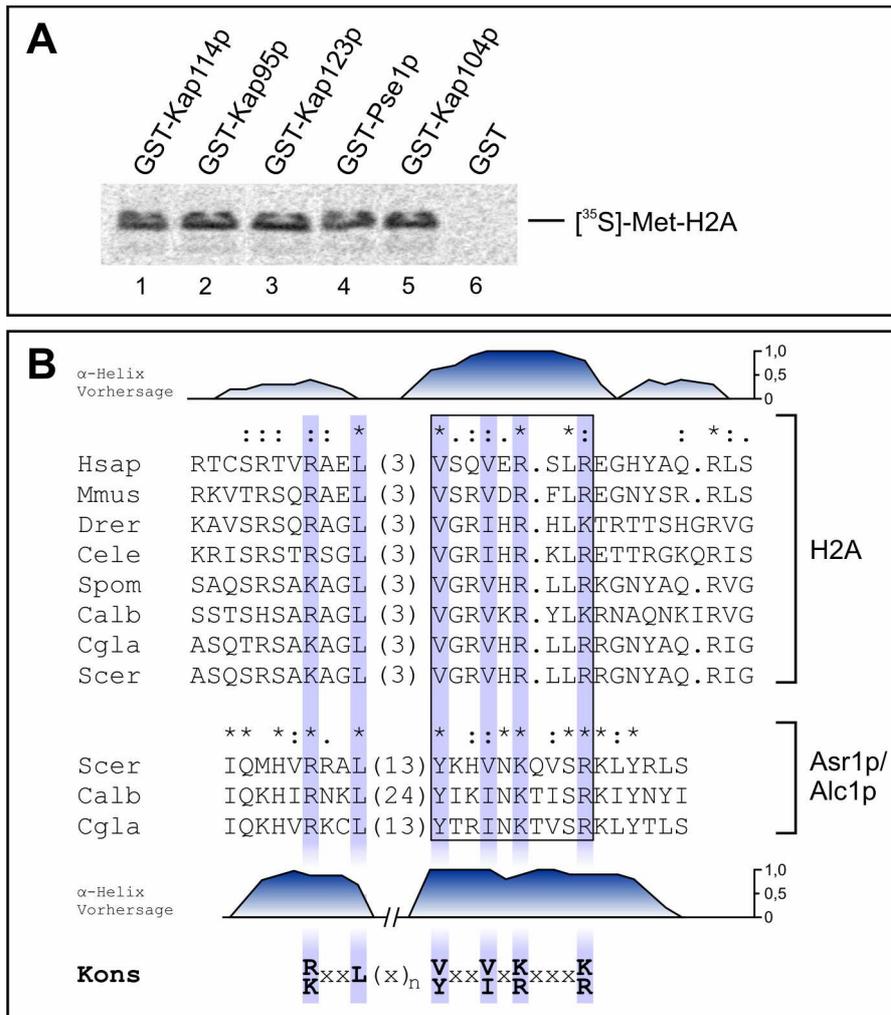
### **IV.3.7. Das Histon H2A und Asr1p interagieren mit dem gleichen Set von Importinen**

Der Mechanismus des nukleären Imports von Asr1p wurde ausführlich analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Asr1p durch ein Set von fünf Importinen – Kap95p, Kap114p, Kap123p, Pse1p und Kap104p – in den Zellkern importiert wird. Diese scheinen redundant zu fungieren, da das Fehlen eines einzigen Importfaktors den Kernimport zwar abgeschwächt, aber nicht verhindert hatte. Andere Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass das Histon H2A ähnliche Importine bindet. So wurde gezeigt, dass GST-H2A an His<sub>6</sub>-getaggtetes Kap114p, Pse1p und Kap95p bindet (Mosammaparast *et al.*, 2001), während eine weitere Arbeitsgruppe zusätzlich Bindung an die Importine Kap123p und Kap104p feststellte (Greiner *et al.*, 2004). Hierbei interagierte *in vitro* synthetisiertes H2A mit den GST-getaggteten Importinen Kap114p, Kap123p, Pse1p und Kap104p, nicht aber Kap95p (Greiner *et al.*, 2004).

Um den letztgenannten Ansatz noch einmal zu überprüfen, wurde das Gen, das für H2A kodiert – HTA1 – aus genomischer DNA amplifiziert und in den pQE70-T7 Vektor kloniert (Greiner *et al.*, 2004). Dieser Vektor wurde in einer *in vitro* Translation eingesetzt. GST-Kap95p, GST-Kap114p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104p und GST selbst wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und mit dem *in vitro* translatierten [<sup>35</sup>S]-Met-H2A inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließendem Autoradiogramm analysiert (Abb. 35A). [<sup>35</sup>S]-Met-H2A bindet spezifisch an alle fünf getesteten Importine (Spuren 1 – 5), nicht aber an GST selbst (Spur 6).

Da Asr1p und H2A mit dem gleichen Set von Importinen interagieren, ist es wahrscheinlich, dass sie ähnliche Import-Signale aufweisen. Für H2A wurde gezeigt, dass die für den Kernimport verantwortliche Sequenz innerhalb der Aminosäuren 24 – 46 beherbergt sein muss (Mosammaparast *et al.*, 2001). Da auch für Asr1p die Kernimportsequenz auf die Reste 243 – 280 eingegrenzt werden konnte, lag es nahe, einen Homologievergleich dieser Regionen durchzuführen. So wurden *S. cer* H2A As 24 – 46 und die homologen Regionen von Histon H2A anderer Organismen in einem Homologievergleich abgeglichen und mit der Kernimportsequenz von Asr1p, *C. alb* Alc1p und *C. gla* Alc1p verglichen (Abb. 35B). Die N-terminale Region von Asr1p As 243 – 280 zeigte gute Übereinstimmung mit den Orthologen anderer Hefe, aber nur geringe Übereinstimmung mit H2A. Im Gegensatz dazu konnte die C-terminale Region von Asr1p As 243 – 280 gut mit hydrophoben und basischen Aminosäuren von H2A angeglichen werden. Interessant ist auch die Tatsache, dass eine Sekundärstruktur-Vorhersage für die N-terminale als auch für die C-terminale Region von Asr1p As 243 - 280 eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Bildung einer  $\alpha$ -Helix ergab. Ebenso wurde auch für *S. cer.* H2A die Bildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur vorausgesagt (<http://www.predictprotein.org>), welche auch durch Kristallisations-Studien bestätigt wurde (White *et al.*, 2001).

Basierend auf der Mutations-Analyse der Asr1p Kern-Importsequenz, dem Homologievergleich zwischen H2A Orthologen und Asr1p Orthologen und auf der Sekundärstruktur-Vorhersage kann man die Konsensus-Sequenz für ein neu entdecktes Importsignal, das durch die Importine Kap95p, Kap114p, Kap123p, Pse1p und Kap104p erkannt wird, wie folgt beschreiben: [R/K]-x<sub>2</sub>-L-x<sub>n</sub>-[V/Y]- x<sub>2</sub>-[V/I]-x-[K/R]- x<sub>3</sub>-[K/R]. Auch wenn die Sequenzidentität nur gering ist, liegen mehrere hydrophobe und basische Reste konserviert vor.



**Abb. 35 Asr1p und H2A interagieren mit dem gleichen Set von Importinen**

(A) GST-Kap114p, GST-Kap95p, GST-Kap123p, GST-Pse1p, GST-Kap104p und GST wurden im *E. coli* Stamm BL21(DE3) heterolog exprimiert und aufgereinigt. Nachdem die GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose immobilisiert waren, wurde mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Met-H2A inkubiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

(B) Die zu *Saccharomyces cerevisiae* (*Scer*) H2A As 15 – 46 homologen Regionen von *Homo sapiens* (*Hsap*), *Mus musculus* (*Mmus*), *Danio rerio* (*Drer*), *Caenorhabditis elegans* (*Hsap*), *Schizosaccharomyces pombe* (*Spom*), *Candida albicans* (*Calb*) und *Candida glabrata* (*Cgla*) H2A (Sequenzen von <http://research.nhgri.nih.gov/histones/>) wurden mit den Importsequenzen von Asr1p und den homologen Proteinen *C. alb* Alc1p und *C. gla* Alc1p verglichen und aligned. Die abgeleitete Konsensus-Sequenz (Kons) ist unten gezeigt. Außerdem wurde eine Vorhersage für das Auftreten einer  $\alpha$ -Helix für *S. cer* H2A As 15 - 46 (Diagramm oben) und Asr1p As 243 – 280 (Diagramm unten) ausgeführt (<http://www.predictprotein.org>).

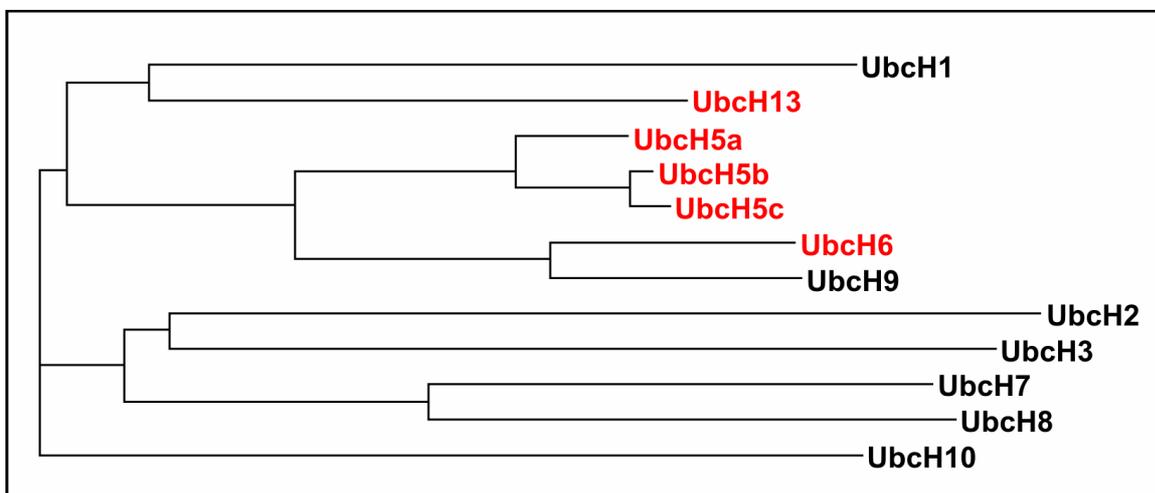
## **■ ■ ■ Diskussion**



### **V.1. Asr1p ist eine neue E3 Ubiquitin-Ligase**

Primäres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Analyse des Proteins Asr1p. Welche Funktionen Asr1p ausübt und an welchen zellulären Prozessen es beteiligt ist, war überwiegend unbekannt. Im Zuge dieser Arbeit wurde Asr1p als neue E3 Ubiquitin-Ligase der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert. Asr1p beherbergt in seiner N-terminalen Region eine RING- und eine PHD-Finger-Struktur und gehört damit zur Untergruppe der RING-Finger E3 Ubiquitin-Ligasen. Seine Funktionalität als E3 Ligase ist eng an die korrekte Faltung des RING-Fingers gebunden, während der PHD-Finger dabei keine Rolle zu spielen scheint. Wie eine Vielzahl von E3 Ligasen katalysiert auch Asr1p seine Autoubiquitinierung. Das ist in der Regel ein Mechanismus, um die eigene Aktivität zu regulieren und beispielsweise einen übermäßigen Abbau von Asr1p Substraten durch das Proteasom zu unterdrücken. Diese Fähigkeit zur Autoubiquitinierung von E3 Ligasen wird oftmals erfolgreich eingesetzt, um ihre E3 Ligase Funktion zu untersuchen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Autoubiquitinierung von Asr1p nachgewiesen, die abhängig von der RING-Finger-Domäne war. Wurden Zink-koordinierende Liganden innerhalb des RING-Fingers substituiert (C45S/H47S), war Asr1p nicht mehr zur Autoubiquitinierung fähig. E3 Ubiquitin-Ligasen ubiquitinieren sich oder ihre Substrate in enger Zusammenarbeit mit E1 Ubiquitin-aktivierenden und E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Hierbei interagieren sie direkt mit einem oder mehreren E2 Enzymen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Asr1p seine Autoubiquitinierung in Zusammenarbeit mit den E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzymen UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6 und UbcH13 katalysiert. UbcH5a,b,c und UbcH6 sind die humanen Orthologen der Hefe Ubc4/5 Familie, während UbcH13 das humane Ortholog von Hefe Ubc13p ist. Die E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzyme sind evolutionär stark konserviert, so dass die Versuche in dieser Arbeit mit den kommerziell erhältlichen humanen Orthologen durchgeführt werden konnten. Ein Homologievergleich der humanen E2 Enzyme und ein daraus erstelltes Phylogramm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) zeigen, dass die E2 Enzyme, die mit Asr1p kooperieren, evolutionär betrachtet eng miteinander verwandt sind (Abb. 36). Dieser Sachverhalt unterstützt die experimentell gewonnenen Erkenntnisse. Es stellt sich die Frage, ob die mit Asr1p kooperierenden E2 Enzyme redundant agieren oder abhängig von

bestimmten zellulären Prozessen mit Asr1p assoziieren. Die starke Sequenzhomologie würde eher dafür sprechen, dass die E2 Enzyme redundant wirken und dadurch eine effiziente Ubiquitinierung der Asr1p Substrate gewährleisten. Die Ubc4/5 Familie (UbcH5a,b,c) spielt in der Regel eine Rolle bei der Degradation abnormaler Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Seufert und Jentsch, 1990). Ubc13p ist jedoch überwiegend nicht an der Markierung für den proteasomalen Abbau beteiligt, sondern vermittelt den Aufbau K63 verknüpfter Ubiquitin-Ketten, die u.a. bei der postreplikativen DNA-Reparatur von Bedeutung sind. In wenigen Fällen vermitteln jedoch auch K63 verknüpfte Ubiquitin-Ketten den proteasomalen Abbau (Kim *et al.*, 2007). Ob Asr1p Zielproteine für den proteasomalen Abbau markiert oder ob es an der nicht-destruktiven Regulation zellulärer Prozesse (z.B. der Transkription) beteiligt ist, bleibt weiter unklar. Während dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Reinigung von Asr1p sehr schwierig ist, da es sehr rasch degradiert. Asr1pC hingegen, dem die RING-Finger-Domäne fehlt, ließ sich deutlich besser aufreinigen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Autoubiquitinierung von Asr1p dazu dient, Asr1p dem proteasomalen Abbau zuzuführen und sich somit selbst zu regulieren. Möglicherweise übt Asr1p jedoch mehrere Funktionen aus, wobei es Substrate zur Degradation durch das Proteasom markieren oder die Funktion bzw. die Aktivität spezifischer Substrate regulieren kann.



**Abb. 36 Phylogramm der humanen E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzyme**

Mit Hilfe des Online-Tools „ClustalW2“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) wurde ein „Alignment“ der Hefe E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzyme durchgeführt und daraus ein Phylogramm erstellt. Die mit Asr1p kooperierenden E2 Enzyme sind rot dargestellt.

Die Frage, ob Asr1p Mono- bzw. Multi- oder Polyubiquitinierung vermittelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Versuche mit einer Ubiquitin-Mutante, die keine Lysin-Reste enthält und somit keine Ubiquitin-Ketten formen kann, zeigten hinsichtlich des

Ubiquitinierungsmusters von MBP-Asr1p keinen Unterschied im Vergleich zu wildtypischem Ubiquitin. Dieser Befund könnte ein Indiz dafür sein, dass Asr1p bzw. der MBP-„tag“ an einer Vielzahl von Lysin-Resten ubiquitiniert wird. So ubiquitiniert beispielsweise auch die E3 Ubiquitin-Ligase Rma1p unzählige Lysine in einem anfusionierten MBP-„tag“, nicht aber in frei vorliegendem MBP (Matsuda *et al.*, 2001). Eindeutigere Ergebnisse könnten Versuche mit His<sub>6</sub>-Asr1p liefern. Dabei wäre eine Ubiquitinierung des „tags“ ausgeschlossen und es stünden deutlich weniger Ubiquitinierungsstellen zur Verfügung.

Die vorliegenden Daten haben gezeigt, dass die RING-Finger-Domäne eine wesentliche Funktion für die E3 Ligase Aktivität von Asr1p besitzt, die Funktion der PHD-Domäne konnte allerdings bisher nicht geklärt werden. PHD-Finger sind Zn<sup>2+</sup>-bindende Domänen, die sehr nah mit den RING-Fingern verwandt sind und die auch eine ähnliche „cross-brace“ Struktur ausbilden. Für RING-Finger enthaltende Proteine ist bekannt, dass sie über den RING-Finger E2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme binden und somit die Ubiquitinierung anderer Interaktionspartner initiieren. Da PHD-Domänen den RING-Fingern in der Struktur ähneln, nahm man ursprünglich an, sie hätten ebenfalls E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität. Es hat sich allerdings gezeigt, dass dies in der Regel nicht der Fall ist. Es gibt wenige Beispiele, bei denen ein PHD-Finger E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität vermittelt, z.B. beim autoimmune regulator AIRE (Uchida *et al.*, 2004) oder bei der MAP/ERK kinase kinase 1 MEKK1 (Lu *et al.*, 2002). Andere Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass es sich bei solchen Beispielen um fehlinterpretierte RING-Finger handelt (Scheel und Hofmann, 2003). Interessant ist, dass fast alle PHD-Finger-Proteine nukleäre Lokalisation aufweisen und 13 von 14 analysierten PHD-Finger-Proteinen der Bäckerhefe an der Regulation von Chromatin oder der Transkription beteiligt sind (Bienz, 2006). Die Tatsache, dass Asr1p zum einen konstitutiv in den Zellkern importiert wird, zum anderen mit Komponenten der RNAPII Transkriptionsmaschinerie interagiert und diese ubiquitiniert, stimmt mit der gängigen Vorstellung überein, dass PHD-Finger-Proteine nukleäre Funktionen insbesondere bei der transkriptionellen Regulation ausüben könnten. Bisher konnten keine Proteine identifiziert werden, die an den PHD-Finger von Asr1p binden. Da es Anhaltspunkte dafür gibt, dass PHD-Finger Nukleosomen-Bindeaktivität besitzen (Aasland *et al.*, 1995), wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob Asr1p mit Hilfe seiner PHD-Domäne an Histone binden kann. Eine Chromatin-Immunopräzipitation könnte hierüber Auskunft geben.

Der PHD-Finger des KAP1-Corepressors hingegen besitzt eine ganz andere Aktivität, er agiert nämlich als E3 SUMO Ligase (Peng und Wysocka, 2008). Für Asr1p konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schlenstedt gezeigt werden, dass es *in vitro* SUMOyliert wird, unklar bleibt jedoch, ob es selbst E3 SUMO Ligase Aktivität besitzt und ob

die SUMOylierung abhängig von einem intakten PHD-Finger ist. Die SUMOylierung und die Ubiquitinierung sind mechanistisch sehr ähnliche Prozesse. Bei Zusammenarbeit eines E1 aktivierenden Enzyms, E2 konjugierender Enzyme und E3 Ligasen wird ein Modifikator (z.B. SUMO oder Ubiquitin) durch einen C-terminalen Glycin-Rest mit einem Lysin des Substrates verknüpft. Bei dieser Bindung handelt es sich um eine Isopeptid-Bindung. Beide Vorgänge sind posttranslationale und reversible Modifikationen. Ubiquitinierung und SUMOylierung sind Prozesse, die Hand in Hand arbeiten können. So kann eine SUMOylierung als Erkennungssignal für spezifische E3 Ubiquitin-Ligasen fungieren (sog. SUMO-targeted Ubiquitin-Ligases, STUbls). In diesem Fall kann ein SUMOyliertes Protein ubiquitiniert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Prudden *et al.*, 2007). SUMOylierung kann der Ubiquitinierung auch entgegenwirken, indem potentielle Ubiquitinierungsstellen kaschiert werden und somit Substrate für den Ubiquitin-Proteasom Pathway unzugänglich gemacht werden (Buschmann *et al.*, 2000; Ulrich, 2005). Auch die Regulation des Ubiquitin-Proteasom Pathways geschieht zum Teil durch Ubiquitin-ähnliche Modifikatoren (UBLs, ubiquitin-like proteins), so beeinflusst eine SUMO-Modifikation der E3 Ubiquitin-Ligase Mdm2p deren Ligase Aktivität (Glickman und Ciechanover, 2002; Joazeiro *et al.*, 2000). Somit könnte die SUMOylierung von Asr1p auch der Regulation seiner E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität dienen. In den vergangenen Jahren ist deutlich geworden, dass Ubiquitinierung und SUMOylierung miteinander eng verknüpft sind. Ob Asr1p *in vivo* tatsächlich SUMOyliert wird und welche Auswirkungen dies auf seine Funktion als Ubiquitin-Ligase haben könnte, stellt sicher ein interessantes zukünftiges Thema dar.

## V.2. Calmodulin als Substrat für Asr1p

Die Identifikation der Substrate von E3 Ubiquitin-Ligasen kann sehr aufwendig sein. In dieser Arbeit konnte Calmodulin als Substrat von Asr1p identifiziert werden. Calmodulin selbst ist an unzähligen zellulären Prozessen beteiligt und ermöglicht die Weiterleitung von Calcium-Influx an diverse Effektoren. Asr1p bindet bei physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen direkt an Calmodulin. Die Region innerhalb von Asr1p, die diese Bindung vermittelt, wurde auf den Bereich der As 243 – 280 eingegrenzt. Diese Region beherbergt zum einen ein IQ-Motiv, zum anderen eine etwa 18 As lange basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix. In den durchgeführten Versuchen bindet Asr1p in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen schwach an Calmodulin, diese Bindung ist in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch erheblich stärker. IQ-Motive vermitteln in der Regel die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Bindung von Calmodulin, während basische, amphipathische  $\alpha$ -Helices Calmodulin in Abhängigkeit von Calcium binden (Rhoads und

Friedberg, 1997). Die vorausgesagte Wahrscheinlichkeit für eine Bindung von Calmodulin an Asr1p (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) war für die basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix deutlich höher als für das IQ-Motiv. Welche Struktur tatsächlich für die Bindung des Calmodulins verantwortlich ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings ist die Bindung überwiegend abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Konzentration. Außerdem zeigten Mutationen des IQ-Motivs keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Calmodulin-Bindung (Daten nicht gezeigt). Beides spricht dafür, dass vor allem die basische, amphipathische  $\alpha$ -Helix die Bindung von Asr1p an Calmodulin vermittelt. Das IQ-Motiv könnte in geringerem Maße an der Calcium-unabhängigen Bindung von Calmodulin beteiligt sein, was die schwache Bindung in Abwesenheit von Calcium-Ionen erklären würde. Interessant ist weiterhin, dass die Calmodulin-bindende Region Asr1p As 243 – 280 genau mit der Kernimport-vermittelnden Region übereinstimmt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Calmodulin-Bindung eine Rolle beim Kernimport von Asr1p spielen könnte. So wurde von einer amerikanischen Arbeitsgruppe gezeigt, dass es zwei Arten von nukleärem Transport gibt, den GTP- und den Calmodulin-abhängigen Transport. Wenn die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gering ist, werden Zielproteine herkömmlich in Abhängigkeit des RanGTP-Gradienten in den Zellkern transportiert. Wird durch äußere Umstände ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx induziert, kann dadurch der GTP-abhängige Kerntransport inhibiert werden.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin kann hingegen den nukleären Import wieder stimulieren (Sweitzer und Hanover, 1996). Dieser Calmodulin-abhängige Kerntransport konnte auch für den *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor Nhp6Ap nachgewiesen werden (Hanover *et al.*, 2009). Für Asr1p wurde gezeigt, dass es in Abhängigkeit des RanGTP-Gradienten in den Zellkern transloziert wird (Betz *et al.*, 2004). Ob auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin am Kernimport von Asr1p beteiligt ist, ist bisher noch nicht untersucht worden. In der Tat befinden sich IQ-Motive häufig in der Nähe von Kernlokalisierungssignalen und es gibt Hinweise dafür, dass der Kernimport gewisser Proteine durch Calmodulin-Bindung reguliert werden kann (Dzijak *et al.*, 2008). Da in dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde, dass Asr1p direkt an ein Set von Importfaktoren bindet und funktionelle Komplexe mit ihnen bildet, kann Asr1p sicherlich auch unabhängig von Calmodulin in den Zellkern importiert werden.

Schon 1993 konnte eine israelische Arbeitsgruppe nachweisen, dass in Hefelysat eine putative E3 Ligase existiert, die Calmodulin spezifisch ubiquitiniert (Parag *et al.*, 1993). Es gelang, die E3 Ligase Aktivität anzureichern, das entsprechende Protein konnte jedoch nicht identifiziert werden. Diese so genannte E3-CaM (EC 6.3.2.21) monoubiquitiniert Calmodulin an K22 in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise und kooperiert dabei mit Ubc4p. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Asr1p eine neue E3 Calmodulin Ubiquitin-Ligase (oder Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase) charakterisiert. Auch Asr1p kooperiert bei der Ubiquitinierung mit Orthologen der

Ubc4/5 Familie und die Ubiquitinierung ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei Asr1p um die zuvor identifizierte E3-CaM handelt, da letztere aus zwei Untereinheiten bestehen soll. Welche physiologische Funktion die Ubiquitinierung von Calmodulin *in vivo* spielt, ist noch unbekannt. Die Monoubiquitinierung von Calmodulin an K22 repräsentiert seine Funktion bezüglich der Aktivierung der Phosphorylase-Kinase deutlich (Laub *et al.*, 1998). Da Calmodulin der Bäckerhefe im Gegensatz zu Asr1p ein essentielles Protein ist, stellt sich die Frage, ob die Ubiquitinierung von Cmd1p auch ein nicht essentieller Prozess ist, oder ob Cmd1p durch weitere E3 Calmodulin Ubiquitin-Ligasen redundant ubiquitiniert wird. Möglicherweise ubiquitiniert Asr1p Cmd1p lediglich bei Stimulation durch äußere Einflüsse, während unter normalen Bedingungen keine Ubiquitin-Konjugation notwendig ist. Fest steht, dass Asr1p Calmodulin *in vitro* ubiquitiniert. Diese Modifikation scheint ebenfalls eine Monoubiquitinierung zu sein, die jedoch nicht alleine an K22 erfolgen muss. Die Lysin-Reste scheinen redundant ubiquitiniert werden zu können, da weder ein einfacher noch ein mehrfacher Austausch von Lysin-Resten in einer nicht-ubiquitinierten Form von Calmodulin resultierte. Trotzdem könnte das wildtypische Calmodulin *in vivo* tatsächlich nur an K22 ubiquitiniert vorliegen. Die Daten sprechen insgesamt dafür, dass es in der Bäckerhefe wohl mehr als eine E3 Calmodulin Ubiquitin-Ligase gibt.

### **V.3. Die RNA Polymerase II Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p als Substrate für Asr1p**

Asr1p steht in Kontakt mit Komponenten der RNA Polymerase II (RNAPII) Transkriptionsmaschinerie. Hier interagiert es direkt mit CTD-Heptameren der größten Untereinheit Rpb1p der RNAPII. Diese Interaktion konnte auf den Aminosäurebereich Asr1p As 233 – 310 eingegrenzt werden (Fries, 2005). Sie findet sowohl mit unphosphorylierten, als auch mit Ser2/Ser5 phosphorylierten CTD Heptameren statt. Domänen, die die Bindung an die CTD vermitteln – wie die FF Domäne, WW Domäne, SRI Domäne, SH2 Domäne oder CTD-Interacting Domain (CID) – wurden bereits bei mehreren Proteinen beschrieben. Asr1p zeigt jedoch keine direkte Sequenzhomologie zu diesen bereits bekannten Domänen. Ein Homologievergleich zwischen der CTD-bindenden Domäne Asr1p As 233 – 310 und der CID von *S. cerevisiae* Pcf11p sowie *Homo sapiens* Pcf11p zeigte eine geringe Sequenzhomologie (14,3% identisch, 35% ähnlich). Für *S. cer* Pcf11p wurde eine hochauflösende Röntgenstruktur in Verbindung mit einem CTD-Peptid erstellt (Meinhart und Cramer, 2004). Auffällig ist, dass die Reste, die laut Pcf11p Röntgenstruktur an der CTD-

Bindung beteiligt sind, auch zwischen Pcf11p und Asr1p konserviert vorliegen. Das würde dafür sprechen, dass bei der Bindung von Asr1p an die CTD eine ähnliche Bindedomäne ausgebildet wird, die jedoch nur geringe Sequenzhomologie zur Pcf11p CID aufweist. Für Pcf11p wurde weiterhin gezeigt, dass ein Austausch der an der CTD-Bindung beteiligten Reste D68A/S69A/I70A keine Bindung an die CTD mehr erlaubte (Sadowski *et al.*, 2003). Die Mutagenese der dazu in Asr1p konservierten Reste D292A/S293A/L294A hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bindung an die CTD. Möglicherweise können benachbarte Aminosäuren die bereits mutierten kompensieren. Ein weiterer Austausch von Aminosäuren, die zwischen Asr1p und Pcf11p konserviert sind und bei Pcf11p an der CTD-Bindung beteiligt sind, könnte diese Vermutung erhärten. Zu beachten ist jedoch, dass nicht nur Reste, die laut Röntgenstruktur direkt an der CTD-Bindung beteiligt sind, sondern auch solche, die Einfluss auf die Struktur bzw. Faltung haben können, wichtig für die Interaktion mit der CTD sein könnten. Vorsichtig ausgedrückt kann man wohl sagen, dass Asr1p eine CTD-Binderegion beherbergt, die mit keiner der bereits bekannten Binderegionen übereinstimmt, die aber eine gewisse Ähnlichkeit zur Pcf11p CID aufweist. Eine Röntgenstruktur-Analyse von Asr1p mit CTD-Peptiden würde genaueren Aufschluss über die Asr1p CTD-Binderegion und deren räumliche Struktur geben.

Beim Menschen existiert ein putatives Ortholog von Asr1p, das CTD-binding SR-like protein rA9 (KIAA1542). Wie Asr1p besitzt auch rA9 E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität. Obwohl es nur eine sehr geringe Sequenzhomologie zu Asr1p aufweist, enthält es wie Asr1p N-terminal sowohl einen RING- als auch einen PHD-Finger. Seine C-terminale Region dagegen vermittelt ganz analog zu Asr1p die Interaktion mit der CTD der RNAPII (Daulny *et al.*, 2008). Allerdings gibt es praktisch keine Sequenzhomologie zwischen den CTD-Binderegionen von Asr1p und rA9. Einzelne konservierte Aminosäuren treten fast nur in den Bereichen des RING- und des PHD-Fingers auf. Obwohl Asr1p und rA9 ähnliche Domänen und ähnliche Funktionen aufweisen, gibt es keine erkennbare gemeinsame CTD-bindende Domäne. Auch der Vergleich der Pcf11p CID und der rA9 CTD-bindenden Domäne (As 1558 – 1634) ergab keinerlei Sequenzhomologie. Funktionelle Ähnlichkeiten könnten bei der Analyse der Tertiärstruktur etwa durch die Exposition hydrophober Reste zutage treten. Insgesamt scheint Asr1p eine neuartige CTD-Bindedomäne zu besitzen. Weiter Einsichten in diese Fragen könnte die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Asr1p CTD-bindenden Domäne mit assoziierten CTD-Peptiden ergeben.

Neben Calmodulin konnten auch die beiden größten Untereinheiten Rpb1p und Rpb2p der RNAPII als Substrate für die Ubiquitinierung durch Asr1p identifiziert werden. Die größte Untereinheit Rpb1p bindet direkt mittels der CTD an die C-terminale Region von Asr1p (As

233 – 310). Asr1p bindet sowohl an die unphosphorylierte Form, als auch an die Ser2- oder Ser5-phosphorylierte Form der CTD. Dies lässt darauf schließen, dass Asr1p eine Funktion bei der Transkriptionselongation ausübt. Die Frage, ob Asr1p auch bei der Transkriptionsinitiation eine Rolle spielt, oder ob es mit transkriptionell aktiver RNAPII interagiert, bei der sowohl unphosphorylierte als auch phosphorylierte CTD-Heptamere existieren, bleibt offen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche waren ein Indiz dafür, dass Asr1p Rpb1p und Rpb2p *in vivo* ubiquitiniert. Weiterführende Versuche wurden nicht durchgeführt, da eine amerikanische Arbeitsgruppe zeitgleich veröffentlichte, dass Asr1p spezifisch mit Ser5-phosphorylierter CTD interagiert und die beiden größten Untereinheiten der RNAPII – Rpb1p und Rpb2p – ubiquitiniert (Daulny *et al.*, 2008). Als Folge dieser Ubiquitinierung werden die beiden Untereinheiten Rpb4p und Rpb7p als Heterodimer abgespalten, was zu einer Inaktivierung der RNAPII Funktion führt. Rpb4p und Rpb7p spielen eine entscheidende Rolle bei der Stressantwort (Sampath und Sadhale, 2005). Somit könnte Asr1p in der Tat eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription – speziell als Antwort auf spezifische Stressbedingungen – spielen. Es besteht jedoch ein Widerspruch zwischen den Ergebnissen dieser amerikanischen Arbeitsgruppe und den Ergebnissen von C. Betz (2005). Während die amerikanische Arbeitsgruppe beschreibt, dass Asr1p vorzugsweise an die Ser5-phosphorylierte Form der CTD bindet (Daulny *et al.*, 2008), hat C. Betz in einem Peptid SPOT-Array gezeigt, dass Asr1p direkt mit der unphosphorylierten Form der CTD interagiert, nur sehr schwach mit der Ser5-phosphorylierten und nicht mit der Ser2-phosphorylierten Form (Betz, 2005). Der Befund, dass Asr1p in dieser Arbeit mit allen Formen, also auch der Ser2- und Ser5-phosphorylierten Form der CTD assoziiert ist, und dass Asr1p eine Rolle bei der Inaktivierung der RNAPII zu spielen scheint, deutet darauf hin, dass Asr1p auch mit phosphorylierten Formen der CTD interagiert. Ebenso denkbar wäre, dass Asr1p an unphosphorylierte CTD-Heptamere einer weitgehend phosphorylierten CTD bindet. Es bleibt die Frage, unter welchen Bedingungen Asr1p die RNAPII inaktiviert. Da Asr1p ein Protein ist, das bei Alkoholstress seine Lokalisation vom Cytoplasma in den Zellkern verlagert (Betz, 2005), könnte es bei bestimmten Stressbedingungen die Inaktivierung der RNAPII induzieren. So könnte es einerseits eine schützende Funktion innehaben und andererseits die Transkription der meisten Gene, abgesehen von Hitzeschock-Genen, inhibieren. Es bleibt also noch zu zeigen, ob und inwiefern Asr1p die Ubiquitinierung der RNAPII nach Alkohol-Stress beeinflusst.

Die CTD der RNAPII muss mit einer Vielzahl an regulatorischen Proteinen interagieren. Die Rekrutierung solcher Proteine erfolgt durch komplexe, bisher nur teilweise verstandene Muster posttranslationaler Modifikationen. Zu diesem „CTD-Code“ zählen – wie zuvor besprochen – unterschiedliche Phosphorylierungszustände der CTD. Weitere

Modifikationen, die die Rekrutierung spezifischer Faktoren initiieren, sind CTD-Glykosylierung und -*Cis/Trans*-Isomerisierung, jedoch schließen sich Phosphorylierung und Glykosylierung gegenseitig aus (Egloff und Murphy, 2008). Jedes CTD Heptapeptid enthält zwei Peptidyl-Prolyl-Bindungen, die sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Konfiguration auftreten können, wodurch für jedes Heptapeptid vier unterschiedliche Konfigurationen möglich sind (Egloff und Murphy, 2008). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Asr1p mit der Peptidyl-Prolyl-*Cis/Trans*-Isomerase Fpr1p interagiert (Ho *et al.*, 2002; Betz, 2005). Fpr1p könnte durch die Interaktion mit Asr1p zur RNAPII rekrutiert werden, wo es die CTD modifizieren könnte. Da eine direkte Interaktion mit der RNAPII jedoch nicht gezeigt wurde und Asr1p die RNAPII durch Ubiquitinierung inaktiviert, ist dies eher unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Fpr1p Asr1p selbst durch *Cis/Trans*-Isomerisierung modifiziert, wodurch es seine Funktion als E3 Ubiquitin-Ligase regulieren könnte. Die Proline 255 und 257 innerhalb des Asr1p Kernlokalisierungssignals wären ein interessantes Ziel, da ein Austausch dieser Proline den Kernimport inhibiert. So könnte vielleicht der Kernimport von Asr1p und dadurch die Interaktion mit der RNAPII reguliert werden. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob Fpr1p ein weiteres Substrat für Asr1p darstellt, wodurch die Funktion von Fpr1p reguliert werden könnte.

#### **V.4. Die CTD-Phosphatase Rtr1p**

Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass auch ein Protein, das vom hypothetischen ORF *YER139c* kodiert wird, mit ProtA-Asr1p cogereinigt wurde. Zu Beginn dieser Arbeit war kaum etwas über dieses Protein bekannt. Das 226 Aa und etwa 26 kDa große Protein ist ein nicht essentielles Protein, das wohl eine Rolle bei der Hitzestress Regulation spielt. Da sich im Laufe dieser Arbeit herauskristallisierte, dass es in Kontakt mit der Transkriptionsmaschinerie steht, wurde es Rtr1p (Regulator of Transcription 1) genannt (Gibney *et al.*, 2008). Aufgrund einer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen Morano und Bailer konnte gezeigt werden, dass das überwiegend cytoplasmatische Rtr1p konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern shuttelt und mit der größten Untereinheit Rpb1p der RNAPII interagiert. Eine amerikanische Arbeitsgruppe zeigte 2009, dass Rtr1p eine neue CTD-Phosphatase ist, die am Übergang von der Ser5- zur Ser2-phosphorylierten Form beteiligt ist (Mosley *et al.*, 2009).

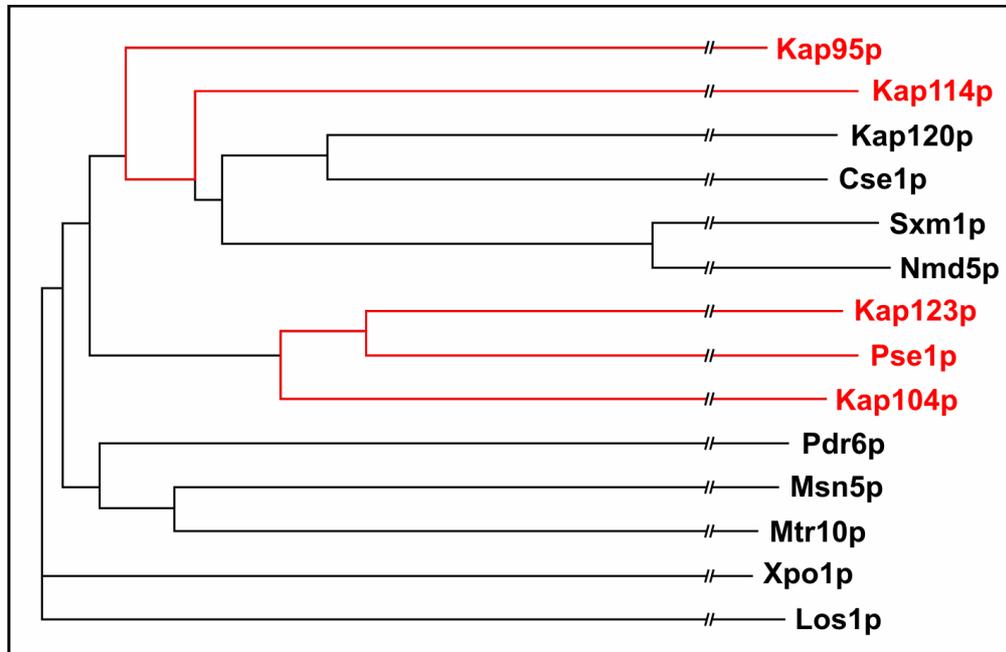
Obwohl Rtr1p mit ProtA-Asr1p aus einem Zelllysats cogereinigt wurde, gelang es nicht, eine direkte Interaktion nachzuweisen. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit den Vektoren pGBKT7-

*GAL4-DNA-BD-RTR1* und *pACT2-GAL4-AD-ASR1* wurde keine Expression des Reportergens induziert. Weiterhin konnte Asr1p nicht mit ProtA-Rtr1p cogereinigt und immunologisch detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass keine direkte Interaktion zwischen Asr1p und Rtr1p besteht. Somit ist es unwahrscheinlich, dass Rtr1p ein Substrat für die Asr1p Ubiquitin-Ligase-Aktivität darstellt. Dennoch deutet das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse darauf hin, dass Asr1p und Rtr1p in einem gemeinsamen Komplex vorliegen. So wäre es denkbar, dass Populationen der RNAPII existieren, die sowohl an Asr1p als auch an Rtr1p gebunden sind. Asr1p als auch Rtr1p verleihen den Hefezellen eine gewisse Resistenz bei Stressbedingungen. Asr1p kann die RNAPII durch Ubiquitinierung inaktivieren, wobei es zur Abspaltung der Untereinheiten Rpb4p und Rpb7p kommt. Rtr1p dagegen inaktiviert die RNAPII nicht, sondern ist notwendig für den Übergang von der Ser5- zur Ser2-phosphorylierten Form der CTD. Rtr1p spielt also eine wichtige Rolle bei der Transkriptionselongation und beim Übergang zur Transkriptionstermination. So treten im *rtr1Δ* Stamm zum Teil Defekte bei der Termination in Form von „readthroughs“ auf (Mosley *et al.*, 2009). Asr1p kann also die Transkription spezifischer Gene inhibieren, während Rtr1p zur korrekten Transkription notwendig ist. Insgesamt ist es daher eher unwahrscheinlich, dass Asr1p und Rtr1p in einem gleichgearteten „Pathway“ kooperieren.

## **V.5. Asr1p beherbergt ein neuartiges Kernimport-Signal**

Damit Asr1p effizient mit der RNAPII Transkriptionsmaschinerie interagieren kann, muss es sich zumindest zeitweise im Zellkern aufhalten. Ursprünglich wurde Asr1p in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit dem Nukleoporin Nup116p identifiziert (Bailer, unveröffentlichte Daten). Dieser Befund ließ schon vermuten, dass Asr1p in Kontakt mit der nukleocytoplasmatischen Transportmaschinerie stehen könnte. Asr1p ist zwar überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert, „shuttelt“ aber konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern. Ein nicht klassisches NLS in der C-terminalen Region von Asr1p wurde identifiziert und auf die As 243 – 280 eingegrenzt (Betz, 2005; diese Arbeit). Dieses NLS interagiert *in vitro* mit den Importinen Kap95p, Kap114p, Kap13p, Pse1p und Kap104p, von denen die meisten auch *in vivo* am Kernimport von Asr1p beteiligt sind. Der Kernimport von Asr1p ist nur bei gleichzeitiger Abwesenheit mehrerer Importfaktoren deutlich vermindert und läuft somit erstaunlich redundant ab. Da Asr1p für die Hefe nicht überlebensnotwendig ist, wird dieser Befund wohl nicht mit der Asr1p Funktion zusammenhängen. Wahrscheinlicher ist, dass die interagierenden Importine sich strukturell ähneln, so dass sie die gleiche Art von NLS erkennen können. Diese Idee wird dadurch untermauert, dass alle interagierenden Importine

*in vitro* direkt und funktional an die gleiche Sequenz innerhalb von Asr1p (As 243 – 280) binden. In Übereinstimmung damit hat ein Homologievergleich der Hefe-Importine gezeigt, dass Kap95p und Kap114p, sowie Kap123p, Pse1p und Kap104p evolutionär eng verwandt sind (Abb. 37).



**Abb. 37 Phylogramm der *S. cerevisiae* Karyopherine**

Mit Hilfe des Online-Tools „ClustalW2“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) wurde ein Alignment der Hefe Karyopherine durchgeführt und daraus ein Phylogramm erstellt. Die mit Asr1p interagierenden Karyopherine sind rot dargestellt.

Um das Asr1p NLS näher zu untersuchen, wurde ein Homologievergleich von Asr1p mit den Orthologen anderer Hefen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass innerhalb der As 243 – 280 zwei konservierte Regionen existieren, die durch eine variable Linker-Region getrennt sind (s. Abb. 31A). Beide Hälften sind für den effizienten Kernimport von Asr1p notwendig. Das Asr1p NLS scheint somit bipartit zu sein. Mutationen in der konservierten Region As 243 – 255 zeigten jedoch keine Wirkung auf den Kernimport von Asr1p. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass benachbarte Reste kompensatorisch wirken könnten, oder dass ein Austausch durch Alanin die Funktion nicht ausreichend beeinträchtigt. Vielleicht ist diese Region nicht direkt am Kernimport beteiligt, jedoch notwendig für die korrekte Faltung des NLS. Die Mutationen S273A/R274A und R274A/K275A in der weiter C-terminal gelegenen, konservierten Region zeigten jedoch einen verminderten Kernimport. Diese Reste, insbesondere R274, scheinen somit beim Import von Asr1p und dessen Bindung an Importine eine wichtige Rolle zu spielen. Außerdem zeigte auch eine Mutation des Prolins P255A einen inhibierenden Effekt beim Kernimport. Möglicherweise ist die dreidimensionale

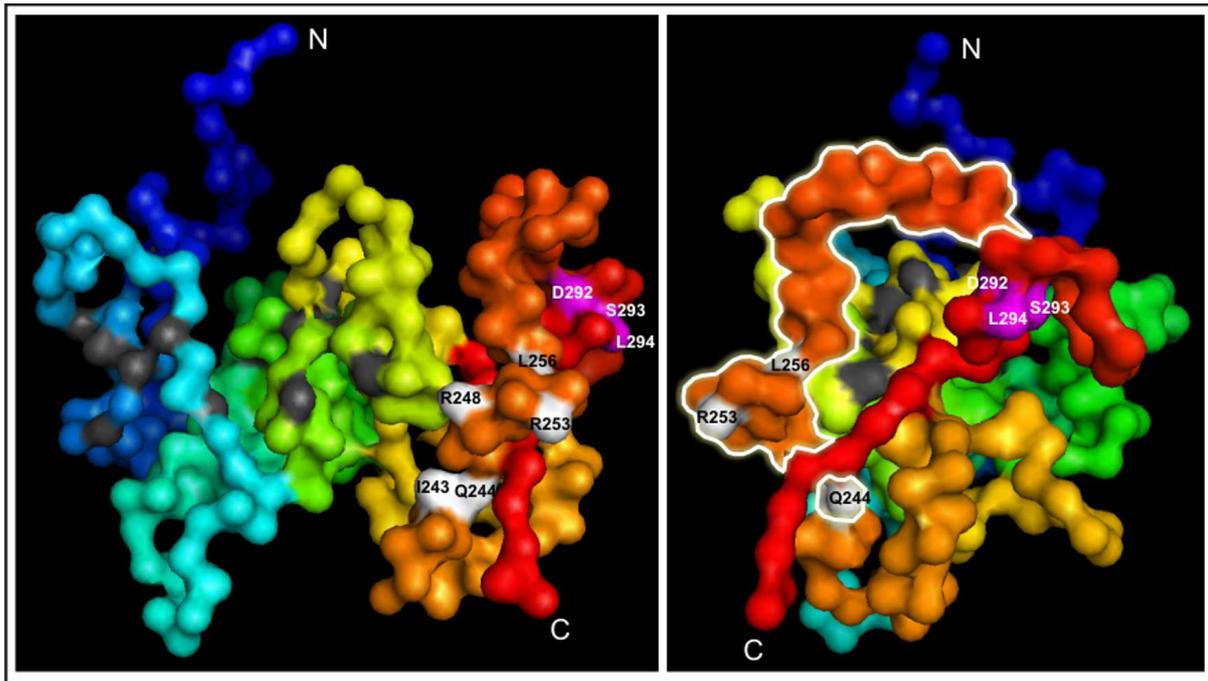
Organisation des NLS durch das benachbarte Prolin beeinflusst. Eine direkte Beteiligung bei der Interaktion mit Importinen ist eher unwahrscheinlich, da P255 in den anderen Hefe-Orthologen nicht konserviert vorliegt. Für die Importine Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p wurde eine Reihe von Import-Substraten identifiziert. Es gibt allerdings nur wenige Substrate, bei denen diese Importine den Kernimport in Kooperation vermitteln. Die Histone H2A und H2B scheinen jedoch das gleiche Set von Importinen zu nutzen wie Asr1p. Eine Arbeitsgruppe konnte 2001 zeigen, dass die Histone H2A und H2B direkt mit den Importinen Kap114p, Kap95p und Pse1p interagieren (Mosammaparast *et al.*, 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte unabhängig davon, dass H2A und H2B an Kap114p, Kap95p, Kap123p, Pse1p und Kap104p binden (Greiner *et al.*, 2004). Dieser Befund konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Somit nutzt Asr1p das gleiche Set an Importfaktoren wie das Histon H2A und könnte folglich ein ähnliches NLS wie H2A beherbergen. Das NLS von H2A konnte auf die Region As 1 – 46 mit überwiegender Importaktivität im Bereich As 24 – 46 eingegrenzt werden (Mosammaparast *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2004). Bei einem Vergleich der Importsequenzen von H2A unterschiedlicher Spezies und Asr1p bzw. Alc1p aus verschiedenen Hefen zeigte sich, dass zwar keine überragende Sequenzhomologie besteht, dass jedoch etliche hydrophobe und basische Aminosäurereste mit gleicher Anordnung existieren, darunter auch R274 (s. Abb. 35B). Interessant ist auch, dass Kristallisations-Analysen eine alpha-helikale Konformation für das H2A NLS ergaben (White *et al.*, 2001). Da sowohl für das H2A als auch für das Asr1p NLS alpha-helikale Konformation vorausgesagt wird, könnten auch Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur bestehen. Aus beiden Sequenzen und ihrer Ähnlichkeit wurde ein neuartiges Kernlokalisierungssignal mit der Konsensussequenz [R/K]-x<sub>2</sub>-L-x<sub>n</sub>-[V/Y]- x<sub>2</sub>-[V/I]-x-[K/R]- x<sub>3</sub>-[K/R] abgeleitet. Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass weder das klassische NLS, das M9 NLS, noch die Importin β-bindende (IBB) Domäne von Importin α-ähnlichen Proteinen alpha-Helices ausbilden (Medrid *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

Durch Computeranalysen (ScanProsite, <http://expasy.org/tools/scanprosite/>) konnten noch weitere Proteine identifiziert werden, die die Asr1p NLS Konsensussequenz beherbergen, u.a. Ctr9p, eine Komponente des Paf1p Komplexes, das an die RNAPII bindet und dessen Aktivität reguliert. Ctr9p lokalisiert im Zellkern, beinhaltet jedoch auch ein Lysin- und Argininreiches NLS. Eine Analyse der identifizierten Proteine aus der Bäckerhefe ergab, dass tatsächlich 45% eine nukleäre Lokalisation aufweisen (UniProtKB, <http://www.uniprot.org>). Weitere Homologe könnten zur Optimierung der Konsensussequenz herangezogen werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass Proteine, die wie Asr1p zwischen Cytoplasma und Zellkern „shutteln“, hier nicht berücksichtigt sind. Die Resultate dieser Computeranalysen sprechen aber auch dafür, dass die Aminosäuresequenz von untergeordneter Funktion für

die Bindung an die Importine ist und vielmehr die räumliche Struktur für die Erkennung der Importfaktoren wichtig ist.

## V.6. Vorhersage der Asr1p Tertiärstruktur

Betrachtet man nun die gewonnenen Erkenntnisse zusammenfassend, fällt auf, dass ein recht kleiner Bereich innerhalb der Asr1p C-terminalen Region für die Interaktion mit einer Vielzahl „großer“ Proteine verantwortlich ist. So können an die Region Asr1p As 243 – 280 fünf verschiedene Importine und Calmodulin binden, und an die Region Asr1p As 233 – 310 die größte Untereinheit Rpb1p der RNAPII. Es wäre also sehr interessant zu wissen, wie diese Binderegionen innerhalb von Asr1p räumlich angeordnet sind. Dazu wurde mit Hilfe des Online-Tools PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) eine Vorhersage der Tertiärstruktur von Asr1p durchgeführt. Die so errechnete PDB-Datei wurde mittels PyMOL v1.1 als Sphären-Modell dargestellt (Abb. 38). Asr1p ist von der N-terminalen zur C-terminalen Region in Regenbogenfarben dargestellt (blau – grün – gelb – orange – rot). Reste, die als Liganden bei RING- und PHD-Finger beteiligt sind, sind grau dargestellt. Reste, die das IQ-Motiv definieren, sind weiß dargestellt. Die basisch amphipathische  $\alpha$ -Helix folgt darauf (orange-rot). Die Region von IQ-Motiv und amphipathischer  $\alpha$ -Helix stellt zugleich das Asr1p NLS dar. In violett sind Reste dargestellt, die evtl. an der Bindung der RNAPII beteiligt sein könnten (D292A/S293A/L294A), wobei der gesamte Bereich As 233 – 310 für die Bindung notwendig ist. Es ist zu erkennen, dass alle Binderegionen praktisch in einer Ebene liegen. Besonders das Asr1p NLS liegt in der Vorhersage gut exponiert (As 243 – 280, orange), genau wie die Calmodulin bindenden Motive. Somit wäre auch die Bindung räumlich großer Proteine möglich, wenn auch nicht die zeitgleiche Bindung. Ob die CTD der RNAPII tatsächlich in direktem Kontakt mit den Resten D292A/S293A/L294A (violett) steht, ist fraglich, da die Mutation dieser As keine Inhibition der CTD-Bindung bewirkte. Dagegen steht für die CTD eine große Fläche bereit, mit deren Resten sie interagieren kann (As 233 – 310). Obwohl die Strukturvorhersage zeigt, dass alle Bindedomänen exponiert vorliegen, ist eine solche Vorhersage mit großer Vorsicht zu genießen. Tertiärstruktur-Vorhersagen sind in der Regel sehr fehlerbelastet, da die Faltung eines Proteins ein sehr komplexer Vorgang ist, der nur bedingt vorausgesagt werden kann. Dieses Modell muss somit nicht die tatsächliche dreidimensionale Struktur von Asr1p widerspiegeln. Es dient lediglich der Veranschaulichung der Verteilung der Bindedomänen. Um die tatsächliche dreidimensionale Struktur zu ermitteln müssten Kristallisations- oder NMR-Analysen von Asr1p – evtl. in Verbindung mit gebundenen Peptiden – durchgeführt und ausgewertet werden.



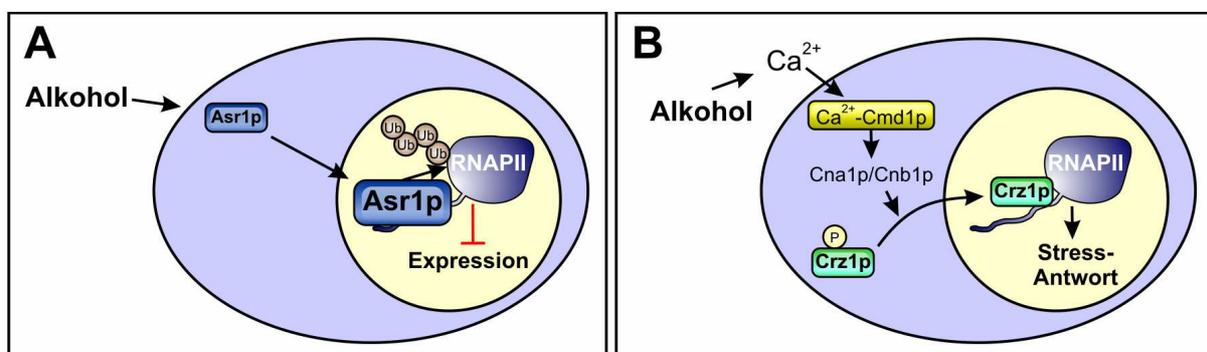
**Abb. 38 Vorhersage der Asr1p Tertiärstruktur**

Mittels des Online-Tools „PredictProtein“ (<http://www.predictprotein.org/>) wurde aus der Asr1p Aminosäuresequenz eine mögliche Tertiärstruktur erstellt und mit „PyMOL v1.1“ dargestellt. Von der N-terminalen zur C-terminalen Region ist Asr1p in Regenbogenfarben dargestellt (blau – grün – gelb – orange – rot). Aminosäuren, die als Liganden bei RING- und PHD-Finger beteiligt sind, sind grau, Reste, die das IQ-Motiv definieren, weiß und Reste, die vielleicht an der CTD-Bindung beteiligt sind, sind violett. Die weiße Umrandung markiert das Asr1p Kernlokalisierungssignal As 243 – 280.

## V.7. Ein Modell für die Funktionsweise von Asr1p

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Asr1p eine neuartige E3 Ubiquitin-Ligase ist, die spezifisch Calmodulin und Komponenten der RNAPII Transkriptionsmaschinerie ubiquitiniert, stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang seiner Alkohol-Responsibilität, dem hoch redundanten Kernimport und seiner Funktion als E3 Ligase. Hefen wandeln Zucker aus ihrer Umgebung durch Fermentation in Ethanol und Kohlenstoffdioxid um. Dadurch reichern sie ihr umgebendes Medium mehr und mehr mit Ethanol an, so dass sie sich schließlich selbst einem Alkoholstress aussetzen (van Voorst *et al.*, 2006). Dieser kann viele Auswirkungen auf eine Zelle haben: Hitzeschock-Proteine werden gebildet, Mutationen treten verstärkt auf, der Stoffwechsel wird beeinträchtigt und die Aktivität von Enzymen kann reduziert werden. Der Hauptangriffspunkt für Ethanol sind jedoch Membranen, v.a. die Plasmamembran (Stanley *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2009). Ein mögliches Modell für das Zusammenspiel von Ethanolstress, Kernimport und E3 Ligase Funktion wäre, dass Asr1p bei Alkoholstress reversibel in den Zellkern transloziert wird (Betz *et al.*, 2004), dort an

Komponenten der RNAPII bindet und diese ubiquitiniert (Abb. 39A). In Folge dessen würden die Untereinheiten Rpb4p/Rpb7p als Heterodimer von der RNAPII abgespalten (Daulny et al., 2008), was zu ihrer Inaktivierung führen würde. Somit würde als Stressantwort auf Ethanol die Expression spezifischer Gene inaktiviert und der Organismus dadurch vor fehlerhaften Proteinen geschützt werden. Als Antwort auf Alkoholstress können Zellen auch die Transkription bestimmter Gene, z.B. Hitzeschutz-Proteine, induzieren. So konnte gezeigt werden, dass bei Ethanolstress auch ein „Pathway“ aktiviert wird, der in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin und Calcineurin Gene der Stressantwort exprimiert (Araki *et al.*, 2009; Kraus und Heitman, 2003). Bedingt durch Ethanolstress kann ein Calcium-Influx ins Cytoplasma induziert werden, da Ethanol die Plasmamembran beeinflusst und hydrophobe Interaktionen beeinträchtigt. Diese ist dann nicht mehr in der Lage, Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten (Sancha *et al.*, 1988). Eine Ethanol induzierte Erhöhung der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration könnte so zur Aktivierung von Calcineurin durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin führen. Die intrinsische Phosphatase-Aktivität von Calcineurin kann den Transkriptionsfaktor Crz1p der Bäckerhefe dephosphorylieren, woraufhin dieser in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Genen der Stress-Antwort induziert (Abb. 39B). Ob und in wieweit Asr1p hierbei eine Rolle spielt ist unklar.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin ist ein Substrat für die E3 Ligase Aktivität von Asr1p. Evtl. könnte die Ubiquitinierung von Calmodulin einen Effekt auf die Aktivierung von Calcineurin zeigen. Eine weitere Möglichkeit, wie die Ubiquitinierung von Calmodulin eine Reaktion auf Alkoholstress darstellt, könnte auf der Tatsache beruhen, dass ubiquitiniertes Calmodulin nicht mehr in der Lage ist, die Phosphorylase-Kinase zu aktivieren, wodurch der Abbau von Glykogen zu Glucose-1-Phosphat inhibiert würde. Dadurch würde kein Glykogen mehr für die alkoholische Gärung bereit stehen, wodurch eine weitere Anreicherung von Ethanol im Medium eingeschränkt werden könnte.



**Abb. 39 Modell für die Funktionsweise von Asr1p**

**(A)** Bei Stress durch aliphatische Alkohole akkumuliert Asr1p reversibel im Zellkern. Dort interagiert es mit der CTD der RNAPII und ubiquitiniert diese. Als Folge werden die Untereinheiten Rpb4p und Rpb7p als Heterodimer abgespalten und die RNAPII dadurch inaktiviert.

**(B)** Alkohol kann die Eigenschaften der Plasmamembran beeinflussen. Diese ist dann nicht mehr in der Lage, Konzentrations-Gradienten aufrecht zu erhalten. Es kann somit zu einem Calcium-Influx und zur Aktivierung von Calcineurin (Cna1p/Cnb1p) führen. Dessen intrinsische Phosphatase-Aktivität dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor Crz1p, der daraufhin im Zellkern lokalisiert und dort die Expression von Genen der Stress-Antwort induziert.

Abschließend kann gesagt werden, dass Asr1p eine neue E3 Ubiquitin-Ligase ist, die konstitutiv zwischen Cytoplasma und Zellkern „shuttelt“ und bei Stress durch aliphatische Alkohole im Zellkern akkumuliert. Sie ubiquitiniert spezifisch und unabhängig voneinander Calmodulin und die beiden größten Untereinheiten der RNAPII, wodurch letztere inaktiviert wird. In wiefern Asr1p bei Stresssituationen tatsächlich an der Regulation der Expression spezifischer Gene beteiligt ist, ist sicherlich ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Versuche.



## VI Literaturverzeichnis

1. **Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF (1995):** *The PHD finger: implications for chromatin mediated transcriptional regulation.* Trends Biochem Sci 20: 56–59.
2. **Ahn EY, Lim ST, Cook WJ, McDonald JM (2004):** *Calmodulin binding to the Fas death domain. Regulation by Fas activation.* J Biol Chem 279: 5661-5666.
3. **Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Rout MP, Sali A (2007):** *Determining the architectures of macromolecular assemblies.* Nature 450: 683-694.
4. **Araki Y, Wu H, Kitagaki H, Akao T, Takagi H, Shimoi H. (2009):** *Ethanol stress stimulates the Ca<sup>2+</sup>-mediated calcineurin/Crz1 pathway in Saccharomyces cerevisiae.* J Biosci Bioeng 107: 1-6.
5. **Becker R, Loll B, Meinhart A (2008):** *Snapshots of the RNA processing factor SCAF8 bound to different phosphorylated forms of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II.* J Biol Chem 283: 22659-22669.
6. **Betz C, Schlenstedt G, Bailer SM (2004):** *Asr1p, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus.* J Biol Chem 279: 28174-28181.
7. **Betz C (2005):** *Charakterisierung des Alkohol-sensitiven Ring/PHD-Finger-Proteins Asr1p der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae.* Dissertation.
8. **Bienz M (2006):** *The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain.* Trends Biochem Sci 31: 35-40. Review.
9. **Bird G, Zorio DA, Bentley DL (2004):** *RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation.* Mol Cell Biol 24: 8963-8969.
10. **Borden KL (2000):** *RING domains: master builders of molecular scaffolds?* J Mol Biol 295: 1103-1112. Review.
11. **Borden KL, Freemont PS (1996):** *The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family.* Curr Opin Struct Biol 6: 395-401. Review.
12. **Bosc C, Frank R, Denarier E, Ronjat M, Schweitzer A, Wehland J, Job D (2001):** *Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins.* J Biol Chem 276: 30904-30913.

13. **Brockerhoff SE, Davis TN (1992):** *Calmodulin concentrates at regions of cell growth in Saccharomyces cerevisiae.* J Cell Biol 118: 619-629.
14. **Brockerhoff SE, Stevens RC, Davis TN (1994):** *The unconventional myosin, Myo2p, is a calmodulin target at sites of cell growth in Saccharomyces cerevisiae.* J Cell Biol 124: 315-323.
15. **Brooks WS, Helton ES, Banerjee S, Venable M, Johnson L, Schoeb TR, Kesterson RA, Crawford DF (2008):** *G2E3 is a dual function ubiquitin ligase required for early embryonic development.* J Biol Chem 283: 22304-22315.
16. **Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z (2000):** *SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53.* Cell 101: 753-762.
17. **Butler JE, Kadonaga JT (2002):** *The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression.* Genes Dev 16: 2583-2592. Review.
18. **Caesar S, Greiner M, Schlenstedt G (2006):** *Kap120 functions as a nuclear import receptor for ribosome assembly factor Rpf1 in yeast.* Mol Cell Biol 26: 3170-3180.
19. **Capili AD, Schultz DC, Rauscher III FJ, Borden KL (2001):** *Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains.* EMBO 20: 165-77.
20. **Chen A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan ZQ (2002):** *Autoubiquitination of the BRCA1•BARD1 RING ubiquitin ligase.* J Biol Chem 277: 22085-22092.
21. **Cheney RE, Mooseker MS (1992):** *Unconventional myosins.* Curr Opin Cell Biol 4: 27-35. Review.
22. **Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE (2007):** *E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages.* Nat Struct Mol Biol 14: 941-948.
23. **Collins SR, Kemmeren P, Zhao XC, Greenblatt JF, Spencer F, Holstege FC, Weissman JS, Krogan NJ (2007):** *Toward a Comprehensive Atlas of the Physical Interactome of Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Proteomics 6: 439-450.
24. **Conaway RC, Brower CS, Conaway JW (2002):** *Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation.* Science 296: 1254-1258. Review.
25. **Corden JL (1990):** *Tails of RNA polymerase II.* Trends Biochem Sci 15: 383-387. Review.
26. **Cunningham KW, Fink GR (1994):** *Ca<sup>2+</sup> transport in Saccharomyces cerevisiae.* J Exp Biol 196: 157-166. Review.
27. **Cyert MS (2001):** *Genetic analysis of calmodulin and its targets in Saccharomyces cerevisiae.* Annu Rev Genet 35: 647-672. Review.

28. **Daulny A, Geng F, Muratani M, Geisinger JM, Salghetti SE, Tansey WP (2008):** *Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation.* Proc Natl Acad Sci U S A 105:19649-19654.
29. **Dengl S, Mayer A, Sun M, Cramer P (2009):** *Structure and in vivo requirement of the yeast Spt6 SH2 domain.* J Mol Biol 389: 211-225.
30. **Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K (2009):** *Tolerance and stress response to ethanol in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Appl Microbiol Biotechnol 85: 253-263. Review.
31. **Dominguez C, Folkers GE, Boelens R (2004):** *RING domain proteins. Contribution to Handbook of Metalloproteins.* Wiley and Sons 3: 338-351.
32. **Dzijak R, Yildirim S, Kahle M, Hozak P (2008):** *The IQ motif drives the nuclear translocation of nuclear myosin I.* Institute of Molecular Genetic.
33. **Egloff S, Murphy S (2008):** *Cracking the RNA polymerase II CTD code.* Trends Genet 24: 280-288. Review.
34. **Eguchi A, Furusawa H, Yamamoto A, Akuta T, Hasegawa M, Okahata Y, Nakanishi M (2005):** *Optimization of nuclear localization signal for nuclear transport of DNA-encapsulating particles.* J Control Release 104: 507-519.
35. **Fischer T, De Vries L, Meerloo T, Farquhar MG (2003):** *Promotion of G alpha i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP.* Proc Natl Acad Sci U S A 100: 8270-8275.
36. **Fries T (2005):** *Funktionelle und strukturelle Analyse des Ethanol-responsiven Proteins Asr1p der Hefe Saccharomyces cerevisiae.* Diplomarbeit.
37. **Fries T, Betz C, Sohn K, Caesar S, Schlenstedt G, Bailer SM (2007):** *A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins.* J Biol Chem 282: 19292-19301.
38. **Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, Edlmann A, Heurtier MA, Hoffman V, Hoefert C, Klein K, Hudak M, Michon AM, Schelder M, Schirle M, Remor M, Rudi T, Hooper S, Bauer A, Bouwmeester T, Casari G, Drewes G, Neubauer G, Rick JM, Kuster B, Bork P, Russell RB, Superti-Furga G (2006):** *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery.* Nature 440: 631-636.
39. **Geiser JR, van Tuinen D, Brockerhoff SE, Neff MM, Davis TN (1991):** *Can calmodulin function without binding calcium?* Cell 65: 949-959.
40. **Gibney PA, Fries T, Bailer SM, Morano KA (2008):** *Rtr1 is the Saccharomyces cerevisiae homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins.* Eukaryot Cell 7: 938-948.

41. **Gill G (2004):** *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev 18: 2046-2059. Review.
42. **Glickman MH, Ciechanover A (2002):** *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.* Physiol Rev 82: 373-428. Review.
43. **Goldstrohm AC, Greenleaf AL, Garcia-Blanco MA (2001):** *Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing.* Gene 277: 31-47. Review.
44. **Greiner M, Caesar S, Schlenstedt G (2004):** *The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms.* Eur J Cell Biol 83: 511-520.
45. **Gu M, Lima CD (2005):** *Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA.* Curr Opin Struct Biol 15: 99-106. Review.
46. **Hahn S (2004):** *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.* Nat Struct Mol Biol 11: 394-403. Review.
47. **Hanahan D (1983):** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol 166: 557-580.
48. **Hanover JA, Love DC, Prinz WA (2009):** *Calmodulin-driven nuclear entry: trigger for sex determination and terminal differentiation.* J Biol Chem 284: 12593-12597. Review.
49. **Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M (2002):** *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry.* Nature 415: 180-3.
50. **Hoppe T (2005):** *Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all.* Trends Biochem Sci 30: 183-187. Review.
51. **Houdusse A, Gaucher JF, Kremontsova E, Mui S, Trybus KM, Cohen C (2006):** *Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features.* Proc Natl Acad Sci U S A 103: 19326-19331.
52. **Hultschig C, Hecht HJ, Frank R (2004):** *Systematic delineation of a calmodulin peptide interaction.* J Mol Biol 343: 559-568.
53. **Imai N, Matsuda N, Tanaka K, Nakano A, Matsumoto S, Kang W (2003):** *Ubiquitin ligase activities of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus RING finger proteins.* J Virol 77:923-930.

54. **Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983):** *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.* J Bacteriol 153: 163-168.
55. **Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD (2000):** *The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases.* Trends Cell Biol 10: 429-439. Review.
56. **Jennissen HP, Botzet G, Majetschak M, Laub M, Ziegenhagen R, Demiroglou A (1992):** *Ca<sup>2+</sup>-dependent ubiquitination of calmodulin in yeast.* FEBS Lett 296: 51-56.
57. **Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Thérien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J, Chabot B, Poirier GG, Hughes TR, Blanchette M, Price DH, Coulombe B (2007):** *Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme.* Mol Cell 27: 262-274.
58. **Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Leverson JD, Hunter T, Liu YC (1999):** *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase.* Science 286: 309-312.
59. **Joazeiro CA, Weissman AM (2000):** *RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity.* Cell 102: 549-552. Review.
60. **Johnson ES (2004):** *Protein modification by SUMO.* Annu Rev Biochem 73: 355-382. Review.
61. **Kalkhoven E, Teunissen H, Houweling A, Verrijzer CP, Zantema A (2002):** *The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain.* Mol Cell Biol 22:1961-1970.
62. **Kang CH, Jung WY, Kang YH, Kim JY, Kim DG, Jeong JC, Baek DW, Jin JB, Lee JY, Kim MO, Chung WS, Mengiste T, Koiwa H, Kwak SS, Bahk JD, Lee SY, Nam JS, Yun DJ, Cho MJ (2006):** *AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants.* Cell Death Differ 13: 84-95.
63. **Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006):** *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins.* Annu Rev Cell Dev Biol 22: 159-180. Review.
64. **Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL (2007):** *Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages.* J Biol Chem 282: 17375-17386.
65. **Kinyamu HK, Chen J, Archer TK (2005):** *Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors.* J Mol Endocrinol 34: 281-297. Review.
66. **Klee CB, Crouch TH, Richman PG (1980):** *Calmodulin.* Annu Rev Biochem 49: 489-515. Review.

67. **Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999):** *A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly.* Cell 96: 635-644.
68. **Koepp DM, Wong DH, Corbett AH, Silver PA (1996):** *Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors.* J Cell Biol 133: 1163-1176.
69. **Kornberg RD (2007):** *The molecular basis of eucaryotic transcription.* Cell Death Differ 14: 1989-1997.
70. **Kraus PR, Heitman J (2003):** *Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi.* Biochem Biophys Res Commun 311: 1151-1157. Review.
71. **Künzler M, Gerstberger T, Stutz F, Bischoff FR, Hurt E (2000):** *Yeast Ran-binding protein 1 (Yrb1) shuttles between the nucleus and cytoplasm and is exported from the nucleus via a CRM1 (XPO1)-dependent pathway.* Mol Cell Biol 20: 4295-4308.
72. **Laub M, Steppuhn JA, Blüggel M, Immler D, Meyer HE, Jennissen HP (1998):** *Modulation of calmodulin function by ubiquitin-calmodulin ligase and identification of the responsible ubiquitylation site in vertebrate calmodulin.* Eur J Biochem 255: 422-431.
73. **Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999):** *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination.* Proc Natl Acad Sci U S A 96: 11364-11369.
74. **Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T (2002):** *The PHD domain of MEK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2.* Mol Cell 9: 945-956.
75. **Luo X, He Q, Huang Y, Sheikh MS (2005):** *Cloning and characterization of a p53 and DNA damage down-regulated gene PIQ that codes for a novel calmodulin-binding IQ motif protein and is up-regulated in gastrointestinal cancers.* Cancer Res 65: 10725-10733.
76. **Matsuda N, Suzuki T, Tanaka K, Nakano A (2001):** *Rma1, a novel type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase.* J Cell Sci 114: 1949-1957.
77. **Maurer P, Redd M, Solsbacher J, Bischoff FR, Greiner M, Podtelejnikov AV, Mann M, Stade K, Weis K, Schlenstedt G (2001):** *The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p).* Mol Biol Cell 12: 539-549.
78. **Min DH, Mrksich M (2004):** *Peptide arrays: towards routine implementation.* Curr Opin Chem Biol 8: 554-558. Review.
79. **Morillon A, O'Sullivan J, Azad A, Proudfoot N, Mellor J (2003):** *Regulation of elongating RNA polymerase II by forkhead transcription factors in yeast.* Science 300: 492-495.

80. **Morris DP, Greenleaf AL (2000):** *The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II.* J Biol Chem 275: 39935-39943.
81. **Mosammaparast N, Jackson KR, Guo Y, Brame CJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2001):** *Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins.* J Cell Biol 153: 251-262.
82. **Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2002):** *Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast.* J Biol Chem 277: 862-868.
83. **Mosammaparast N, Pemberton LF (2004):** *Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators.* Trends Cell Biol 14: 547-556. Review.
84. **Mosley AL, Pattenden SG, Carey M, Venkatesh S, Gilmore JM, Florens L, Workman JL, Washburn MP (2009):** *Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation.* Mol Cell 34: 168-178.
85. **Mullis KB, Faloona FA (1987):** *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol 155: 335-350.
86. **Muratani M, Tansey WP (2003):** *How the ubiquitin-proteasome system controls transcription.* Nat Rev Mol Cell Biol 4: 192-201. Review.
87. **Nalepa G, Rolfe M, Harper JW (2006):** *Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system.* Nat Rev Drug Discov 5: 596-613. Review.
88. **Nikolov DB, Burley SK (1997):** *RNA polymerase II transcription initiation: a structural view.* Proc Natl Acad Sci U S A 94: 15-22.
89. **Nishizawa Y, Katoh S, Koiwai H, Katoh E (2008):** *EL5 is involved in root development as an anti-cell death ubiquitin ligase.* Plant Signal Behav 3: 148-150.
90. **Ohya Y, Botstein D (1994):** *Structure-based systematic isolation of conditional-lethal mutations in the single yeast calmodulin gene.* Genetics 138: 1041-1054.
91. **Olzmann JA, Li L, Chudaev MV, Chen J, Perez FA, Palmiter RD, Chin LS (2007):** *Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6.* J Cell Biol 178: 1025-1038.
92. **Parag HA, Dimitrovsky D, Raboy B, Kulka RG (1993):** *Selective ubiquitination of calmodulin by UBC4 and a putative ubiquitin protein ligase (E3) from Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett 325: 242-246.
93. **Patel SS, Belmont BJ, Sante JM, Rexach MF (2007):** *Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex.* Cell 129: 83-96.
94. **Pemberton LF, Paschal BM (2005):** *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export.* Traffic 6: 187-198. Review.

95. **Peng J, Wysocka J (2008):** *It takes a PHD to SUMO*. Trends Biochem Sci 33: 191-194.
96. **Pickart CM (2001):** *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem 70: 503-533. Review.
97. **Prudden J, Pebernard S, Raffa G, Slavin DA, Perry JJ, Tainer JA, McGowan CH, Boddy MN (2007):** SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. EMBO J 26:4089-4101.
98. **Reed SI (2003):** *Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover*. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 855-864. Review.
99. **Rhoads AR, Friedberg F (1997):** *Sequence motifs for calmodulin recognition*. FASEB J 11: 331-340. Review.
100. **Rout MP, Aitchison JD (2001):** *The nuclear pore complex as a transport machine*. J Biol Chem 276: 16593-16596. Review.
101. **Sambrook J, Gething MJ (1989):** *Protein structure. Chaperones, paperones*. Nature 342: 224-225.
102. **Sampath V, Sadhale P (2005):** *Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions*. IUBMB Life 57: 93-102. Review.
103. **Scheel H, Hofmann K (2003):** *No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases*. Trends Cell Biol 13: 285-287.
104. **Schlenstedt G, Smirnova E, Deane R, Solsbacher J, Kutay U, Görlich D, Ponstingl H, Bischoff FR (1997):** *Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus*. EMBO J 16: 6237-6249.
105. **Seedorf M, Silver PA (1997):** *Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 8590-8595.
106. **Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T (2006):** *Reading protein modifications with interaction domains*. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 473-483. Review.
107. **Seufert W, Jentsch S (1990):** *Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins*. EMBO J 9: 543-550.
108. **Sickmann A, Dormeyer W, Wortelkamp S, Woitalla D, Kuhn W, Meyer HE (2002):** *Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 771: 167-196.
109. **Singh SR, Rekha N, Pillai B, Singh V, Naorem A, Sampath V, Srinivasan N, Sadhale PP (2004):** *Domainal organization of the lower eukaryotic homologs of the*

- yeast RNA polymerase II core subunit Rpb7 reflects functional conservation.* Nucleic Acids Res 32: 201-210.
110. **Smale ST, Kadonaga JT (2003):** *The RNA polymerase II core promoter.* Annu Rev Biochem 72: 449-479. Review.
111. **Smith MJ, Kulkarni S, Pawson T (2004):** FF domains of CA150 bind transcription and splicing factors through multiple weak interactions. Mol Cell Biol 24: 9274-9285.
112. **Solsbacher J, Maurer P, Bischoff FR, Schlenstedt G (1998):** *Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus.* Mol Cell Biol 18: 6805-6815.
113. **Somesh BP, Sigurdsson S, Saeki H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2007):** *Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD.* Cell 129: 57-68.
114. **Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA (2010):** *The ethanol stress response and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae.* J Appl Microbiol.
115. **Stone SL, Hauksdóttir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J (2005):** *Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis.* Plant Physiol 137: 13-30.
116. **Ström AC, Weis K (2001):** *Importin-beta-like nuclear transport receptors.* Genome Biol 2:REVIEWS3008. Review.
117. **Studier FW, Moffatt BA (1986):** *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.* J Mol Biol 189: 113-130.
118. **Sudol M, Sliwa K, Russo T (2001):** *Functions of WW domains in the nucleus.* FEBS Lett 490: 190-195. Review.
119. **Sweitzer TD, Hanover JA (1996):** *Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport.* Proc Natl Acad Sci U S A 93:14574-14579.
120. **Takai R, Matsuda N, Nakano A, Hasegawa K, Akimoto C, Shibuya N, Minami E (2002):** *EL5, a rice N-acetylchitooligosaccharide elicitor-responsive RING-H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co-operation with an elicitor-responsive ubiquitin-conjugating enzyme, OsUBC5b.* Plant J 30: 447-455.
121. **Trost C, Bergs C, Himmerkus N, Flockerzi V (2001):** *The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins.* Biochem J 355: 663-670.
122. **Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, Kudoh J, Shimizu N, Doucas V, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M (2004):** *AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase.* J Exp Med 199: 167-172.

123. **Ulrich HD (2005):** *Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest.* Trends Cell Biol 15: 525-532. Review.
124. **van Voorst F, Houghton-Larsen J, Jønson L, Kielland-Brandt MC, Brandt A (2006):** *Genome-wide identification of genes required for growth of Saccharomyces cerevisiae under ethanol stress.* Yeast 23: 351-359.
125. **Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999):** *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis.* Annu Rev Biochem 68: 1015-1068. Review.
126. **Vojnic E, Simon B, Strahl BD, Sattler M, Cramer P (2006):** *Structure and carboxyl-terminal domain (CTD) binding of the Set2 SRI domain that couples histone H3 Lys36 methylation to transcription.* J Biol Chem 281: 13-15.
127. **Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y (1999):** *The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor.* J Biol Chem 274: 22151-22154.
128. **White CL, Suto RK, Luger K (2001):** *Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions.* EMBO J 20: 5207-5218.
129. **Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S (2007):** *The ubiquitination code: a signalling problem.* Cell Div 2: 11.
130. **Woychik NA, Hampsey M (2002):** *The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function.* Cell 108: 453-463. Review.
131. **Xiao T, Hall H, Kizer KO, Shibata Y, Hall MC, Borchers CH, Strahl BD (2003):** *Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast.* Genes Dev 17: 654-663.
132. **Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985):** *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.* Gene 33: 103-119.
133. **Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M (2000):** *Calmodulin target database.* J Struct Funct Genomics 1: 8-14.
134. **Yoh SM, Cho H, Pickle L, Evans RM, Jones KA (2007):** *The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iws1-dependent mRNA splicing and export.* Genes Dev 21: 160-174.
135. **Yokouchi M, Kondo T, Houghton A, Bartkiewicz M, Horne WC, Zhang H, Yoshimura A, Baron R (1999):** *Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and Ubch7.* J Biol Chem 274: 31707-31712.
136. **Zhou Y, Yang W, Lurtz MM, Ye Y, Huang Y, Lee HW, Chen Y, Louis CF, Yang JJ (2007):** *Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43.* J Biol Chem 282: 35005-35017.

137. **Ziegenhagen R, Goldberg M, Rakutt WD, Jennissen HP (1990):** *Multiple ubiquitination of calmodulin results in one polyubiquitin chain linked to calmodulin.* FEBS Lett 271: 71-75.
138. **Zielinski RE (1998):** *Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants.* Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 697-725.
139. **Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999):** *Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels.* Nature 399: 159-162.

## ▣▣ Publikationen



**Fries T, Betz C, Sohn K, Caesar S, Schlenstedt G, Bailer SM (2007):** *A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins.* J Biol Chem 282: 19292-19301.

**Gibney PA, Fries T, Bailer SM, Morano KA (2008):** *Rtr1 is the Saccharomyces cerevisiae homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins.* Eukaryot Cell 7: 938-948.

**Fries T, Frank R, Heinzmann M, Haas J, Bailer SM:** *The S. cerevisiae ubiquitin E3 ligase Asr1p targets calmodulin for ubiquitylation.* Manuskript in Vorbereitung.

## **∴ Danksagung**

Frau PD Dr. Susanne M. Bailer möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes besonderen Dank aussprechen. Durch unzählige anregende Gespräche und Diskussionen hat sie sehr zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Sie hat mich in jeder Phase dieser Arbeit professionell betreut und warmherzig begleitet. Ihre kompetenten Ratschläge und ihre Motivationsfähigkeit kamen mir in zahlreichen Situationen zugute.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe Bailer in Homburg. Hier möchte ich mich besonders bei Tina, Christian, Hannah und Georg für ihre freundschaftliche Unterstützung und für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Auch Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Max von Pettenkofer-Institut in München fortführen zu können. Auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für ihre Unterstützung und für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Für die zeitweilige Bereitstellung eines Labors am Genzentrum in Großhadern und für die Mitbenutzung ihrer Laborausstattung möchte ich Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer, Herrn Prof. Dr. Dr. Ulrich Koszinowski, Herrn Prof. Dr. Conzelmann und deren Arbeitsgruppen herzlichen Dank aussprechen.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Ronald Frank für die SPOT-Synthese der Asr1p-Peptide und Herrn Dr. Albert Sickmann für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse. Auch Herrn Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt, Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann und deren Arbeitsgruppen möchte ich herzlichen Dank aussprechen für die Bereitstellung ihrer Laborausstattung, für ihre Hilfsbereitschaft und für die konstruktive Kritik in zahlreichen Seminaren.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meinen Eltern und besonders Melanie für die tatkräftige Unterstützung beim Entstehen dieser Arbeit danken. Sie haben mir stets mit Ruhe und Geduld zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgemuntert.

## **..: Lebenslauf**

---

### **..: Persönliche Daten**

Vor- und Zuname	Thomas Fries
geboren	am 25.11.1979 in Sankt Wendel
Anschrift	Namborner Str. 21, 66649 Oberthal
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **..: Schulbildung**

07/1986 – 07/1990	Grundschule Steinberg-Deckenhardt
07/1990 – 07/1999	Cusanus Gymnasium des Landkreises St. Wendel
07/1999	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7)

### **..: Wehrdienst**

07/1999 – 04/2000	Wehrdienst beim Nachschubbataillon 51 in Schwalmstadt
-------------------	---

### **..: Studium**

10/2000 – 10/2005	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes mit dem Hauptfach Molekularbiologie und den Nebenfächern Zellbiologie und Entwicklungsbiologie, Anfertigung der Diplomarbeit im Fachbereich Molekularbiologie
11/2005	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe (Note 1,7)
11/2005 – 11/2007	Dissertationsarbeit an der Universität des Saarlandes, Fachbereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie zum Thema „Funktionelle Analyse des Proteins Asr1p der Bäckerhefe und ausgewählter Interaktionspartner“
11/2007 – 09/2009	Weiterführung der Dissertationsarbeit an der LMU München, Max-von-Pettenkofer Institut, Fachbereich Virologie
seit 10/2009	Arbeit suchend

### **..: Sonstiges**

Betreuung von Praktika	Grund- und Aufbaupraktikum „Molekularbiologie für Biologen“ Praktikum „Biochemie für Mediziner“
------------------------	--

## **⚔ Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den

---

Thomas Fries