

# Das konservierte Zellproliferationsgen *CDC123* kodiert für einen Initiationsfaktor der Translation: 2'-AP

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

**Frank Richter**

aus Esslingen

INSTITUT FÜR INDUSTRIELLE GENETIK  
UNIVERSITÄT STUTTGART



2006





**Das konservierte Zellproliferationsgen  
*CDC123* kodiert für einen Initiationsfaktor  
der Translation: 2 $\gamma$ -AP**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

**Frank Richter**

aus Esslingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Mitberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2006

INSTITUT FÜR INDUSTRIELLE GENETIK  
UNIVERSITÄT STUTTGART



2006



Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt  
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.



*Nichts ist endgültig,  
solange es nicht vergessen ist.*

(G. Mordillo)





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....		<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....		<b>13</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....		<b>16</b>
<b>2 Abstract</b> .....		<b>18</b>
<b>3 Einleitung</b> .....		<b>20</b>
3.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....		20
3.2 Der Zellteilungszyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....		21
3.3 Regulation des Zellzyklus.....		23
3.3.1 Die <i>CDC</i> -Gene.....		23
3.3.2 Regulation durch Cyclinabhängige Kinasen.....		23
3.4 Die Translation.....		25
3.4.1 Die Translationsinitiation.....		25
3.4.1.1 Bildung des 43S Präinitiationskomplexes.....		27
3.4.1.2 Rekrutierung des 43S Komplexes zur mRNA.....		28
3.4.1.3 Finden des Startcodons, <i>Scanning</i> .....		29
3.4.1.4 Der Translationinitiationsfaktor eIF2.....		32
3.4.1.5 Der Translationinitiationsfaktor eIF2B.....		33
3.4.2 Regulation der Translationsinitiation.....		35
3.5 D123.....		39
<b>4 Ergebnisse</b> .....		<b>41</b>
4.1 Cdc123 ist konserviert von der Hefe bis zum Menschen.....		41
4.2 Die humane <i>cDNA</i> von D123 kann eine Deletion von <i>CDC123</i> in Hefe komplementieren.....		42
4.3 Cdc123 und hD123 lokalisieren im Cytoplasma.....		44
4.4 Charakterisierung konditionaler <i>cdc123</i> -Mutanten.....		46
4.5 Cdc123 ist essentiell für das Verlassen der G1-Phase.....		48
4.6 SGA-Analyse: Suche nach Genen, die mit <i>CDC123</i> in Verbindung stehen.....		50
4.6.1 SGA-Analyse mit den Allelen <i>cdc123-1</i> und <i>cdc123ΔC</i> .....		50
4.6.2 Suche nach Suppressoren von <i>cdc123-1</i> mit Hilfe der SGA-Analyse.....		54
4.7 Cdc123 interagiert physisch mit Gcd11.....		55
4.8 Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 und Sui2.....		58
4.9 Mengenabschätzung von Cdc123 im Vergleich zu Gcd11, Gcd1 und Gcn3.....		59
4.10 <i>cdc123</i> -Mutanten zeigen Anzeichen eines Translationsinitiations- defektes.....		60
4.10.1 <i>cdc123</i> -Mutanten zeigen einen GCD-Phänotyp.....		61
4.10.2 <i>cdc123</i> -Mutanten haben einen verringerten Anteil an Polysomen.....		62
4.11 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 findet frei von Ribosomen statt.....		64

4.11.1	Cdc123 interagiert nicht mit Rps2.....	64
4.11.2	Cdc123 interagiert mit Gcd11 im postribosomalen Überstand.....	64
4.12	Fraktionierung von Polysomengradienten .....	67
4.13	Cdc123-Mutanten können mit Gcd11 interagieren.....	71
4.14	Cdc123 tritt als Monomer auf .....	72
4.15	Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 nach Rapamycinbehandlung.....	73
4.16	<i>cdc123</i> zeigt eine genetische Interaktion mit <i>gcd11</i> und <i>sui2</i> .....	75
4.17	Auswirkungen eines Verlusts von Cdc123 .....	76
4.17.1	Cdc123-1 ist bei hoher Temperatur instabil .....	76
4.17.2	Die verminderte Translationsinitiation in <i>cdc123</i> -Mutanten wird nicht durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ vermittelt. ....	76
4.17.3	Die Verbindung von Cdc123 zu Dma1 und Dma2 bleibt unklar.....	79
4.17.3.1	Eine Deletion von <i>DMA1</i> und <i>DMA2</i> zeigt keine suppressierende Wirkung auf <i>cdc123</i> -Mutanten.....	79
4.17.3.2	Ohne Cdc123-Aktivität sind die Proteine Dma1 und Dma2 instabil.....	81
4.17.4	Leicht reduzierte Mengen von Gcd11 in <i>cdc123</i> -Mutanten können nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich gemacht werden.....	82
4.18	Die Überexpression von eIF2 oder dessen Untereinheiten kann eine Deletion von <i>CDC123</i> bedingt komplementieren.....	84
4.18.1	Überexpression von eIF2 $\gamma$ / Gcd11 in W303.....	84
4.18.2	Überexpression von eIF2 $\gamma$ / Gcd11 in S288C .....	86
4.18.3	Überexpression aller drei eIF2-Untereinheiten ( $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ ) in W303.....	88
4.19	Die Interaktion der eIF2-Untereinheiten $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ ist in <i>cdc123</i> -Mutanten verringert .....	90
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
5.1	2 $\gamma$ -AP/Cdc123 – Ein essentieller Faktor für die Translationsinitiation.....	95
5.1.1	Genetische Interaktionen .....	96
5.1.2	Direkte Hinweise auf einen Translationsinitiationsdefekt.....	98
5.1.3	Die Interaktion von 2 $\gamma$ -AP mit eIF2 .....	98
5.1.4	Proteinmengen von eIF2 $\gamma$ in <i>cdc123</i> -Mutanten.....	100
5.1.5	Verringerte Interaktion der eIF2-Untereinheiten in <i>cdc123</i> -Mutanten.....	101
5.1.6	Arrest der <i>cdc123</i> -Mutanten in der G1-Phase .....	102
5.2	Die Verbindung von 2 $\gamma$ -AP zu Dma1 und Dma2.....	103
5.3	Modell der Wirkungsweise von Cdc123.....	104
<b>6</b>	<b>Material.....</b>	<b>106</b>
6.1	Nukleinsäuren .....	106
6.2	Enzyme .....	106
6.3	Antikörper und Seren.....	106
6.4	Chemikalien .....	107
6.5	Sonstige Materialien .....	109

6.6	Geräte .....	109
6.7	Medien, Puffer und Lösungen .....	110
	6.7.1 Bakterienmedien .....	110
	6.7.2 Hefemedien .....	110
	6.7.3 Puffer und Lösungen .....	111
6.8	Oligonukleotide .....	114
6.9	Plasmide .....	117
6.10	Hefestämme .....	118
<b>7</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>123</b>
7.1	Arbeiten mit Bakterien .....	123
	7.1.1 Kultivierung von Bakterien .....	123
	7.1.2 Herstellung elektrokompenter DH5 $\alpha$ -Zellen .....	123
	7.1.3 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation .....	123
7.2	Arbeiten mit Hefe .....	124
	7.2.1 Kultivierung von Hefe .....	124
	7.2.2 Konservierung von Hefestämmen .....	124
	7.2.3 Kreuzung haploider Hefestämme .....	124
	7.2.4 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse .....	124
	7.2.5 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode .....	125
	7.2.6 Synchronisation von Hefekulturen durch zentrifugale Elutriation .....	125
7.3	Färbung und Mikroskopie von Hefezellen .....	126
	7.3.1 Ethanolfixierung von Hefezellen .....	126
	7.3.2 Formaldehydfixierung von Hefezellen .....	126
	7.3.3 DNA-Färbung mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) .....	127
	7.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz .....	127
	7.3.4.1 Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin .....	127
	7.3.4.2 Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz .....	127
	7.3.5 Actinfärbung .....	128
	7.3.6 Mikroskopie .....	128
	7.3.7 Durchflusszytometrie .....	128
7.4	Genetische und molekularbiologische Methoden .....	129
	7.4.1 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	129
	7.4.1.1 Plasmidschnellisolierung [Berghammer <i>et al.</i> 1993] .....	129
	7.4.1.2 Säulenreinigung von Plasmid-DNA .....	129
	7.4.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung .....	129
	7.4.3 Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen .....	129
	7.4.4 Gelelektrophorese von DNA .....	130
	7.4.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	130
	7.4.6 Restriktionsverdau von DNA .....	131
	7.4.7 Ligation .....	131

7.4.8	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	131
7.4.8.1	PCR zur Genommanipulation [Longtine <i>et al.</i> 1998].....	133
7.4.8.2	Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR .....	134
7.5	Proteinanalytische Methoden.....	135
7.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen .....	135
7.5.2	Immunpräzipitation .....	135
7.5.3	Erzeugung postribosomaler Überstände .....	136
7.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	136
7.5.5	Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	137
7.6	Polysomen-Analyse .....	137
7.6.1	Herstellung von Saccharosegradienten.....	137
7.6.2	Auftrennung der Polysomen in Saccharosegradienten .....	138
7.7	SGA – Analyse .....	139
7.8	Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien.....	140
7.9	$\beta$ -Galaktosidase-ONPG-Flüssigassay/GCN4 Expression.....	141
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>150</b>
9.1	Sammlung aller per Tetradenanalyse verifizierten genetischen Interaktionen mit <i>cdc123</i> - Mutanten.....	150
9.2	Liste einiger, an der Translationsinitiation beteiligten Faktoren.....	161
9.3	Abbildungsverzeichnis.....	161
9.4	Tabellenverzeichnis .....	162
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>163</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\Delta$	Deletion
$\lambda$	Wellenlänge
$\alpha$ -	anti
$\Delta 327$	C-terminale Verkürzung des Proteins nach Aminosäure 327
$\Delta C$	siehe $\Delta 327$
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$^{\circ}C$	Grad Celsius
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
$\mu l$	Mikroliter
5'-m <sup>7</sup> G-Cap, 5'-Cap	7-Methylguanyl-Kappenstruktur am 5'-Ende eukaryontischer mRNA

## A

A	Ampere oder auch Absorption
Abb.	Abbildung
AD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATGA	Deletion des ATG-Startcodons

## B

b	Base(n)
BD	<i>LexA</i> -DNA-Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin

## C

CDK	Cyclin abhängige Kinase (engl. <i>cyclin dependent kinase</i> )
Chx	Cycloheximid
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette

## D

Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEAD-Box	Asp-Glu-Ala-Asp-Motiv der DEAD-Box RNA-Helicase Familie
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

**E**

E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor
eIF2 $\alpha$ (S51-P)	eIF2 $\alpha$ mit phosphoryliertem Serin an Position 51
eIF2B( $\alpha\beta\delta$ )	regulatorischer Subkomplex von eIF2B aus den Untereinheiten $\alpha$ , $\beta$ u. $\delta$
eIF2B( $\gamma\epsilon$ )	katalytischer Subkomplex von eIF2B aus den Untereinheiten $\gamma$ und $\epsilon$
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol

**G**

g	Gramm
G	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GCD	<i>General amino acid control derepressed</i>
GCN	<i>General amino acid control nonderepressible</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor, engl. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat

**H**

H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hämagglutinin-Epitop

**I**

IF	Immunfluoreszenz
----	------------------

**K**

k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

**L**

l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium

**M**

MDa	Megadalton
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
Myc	c-myc-Epitop

**N**

N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
------------	----------------------------------

**O**

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i> )

**P**

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p <i>CDC123</i>	Promotor des Gens <i>CDC123</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol

<b>R</b>	
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
<b>S</b>	
S	Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
SPB	Spindelpolkörper, engl. <i>spindle pole body</i>
<b>T</b>	
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
tCYC1	Terminator des Gens <i>CYC1</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA <sub>i</sub>	Initiator-Transfer-RNA
tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	Initiator-Methionyl-Transfer-RNA
ts	temperatursensitiv
<b>U</b>	
U	Units
UE	Untereinheit
uORF	offener Leserahmen <i>upstream</i> des Startcodons, engl. <i>upstream open reading frame</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>Untranslatierte Region</i> einer mRNA
UV	ultraviolettes Licht
<b>V</b>	
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
<b>W</b>	
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
<b>Y</b>	
YFG	<i>your favourite gene</i>
<b>X</b>	
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt.

Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur.

Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.



# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Genprodukt von *CDC123* in *Saccharomyces cerevisiae* ist essentiell und hochkonserviert. Es existieren Homologe in anderen niederen Eukaryonten ebenso wie in der Ackerschmalwand, dem Zebrafisch, der Maus oder auch dem Menschen. Ergebnisse zu dem orthologen Gen D123 aus einer Ratten-Fibroblastenzelllinie (3Y1) wurden erstmals 1984 publiziert. Es wurden konditionale Mutanten erzeugt, denen es bei restriktiver Temperatur nicht möglich war, in den Zellzyklus einzutreten und die DNA-Replikation zu initiieren. Das Interesse galt dabei der Identifikation neuer Regulatoren der Zellproliferation, um den Vorgang der Transformation hin zu unkontrolliert proliferierenden Zellen zu verstehen. Bei der Mutante 3Y1tsD123 konnte nach Inkubation bei restriktiver Temperatur ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus beobachtet werden. Das mutierte Gen konnte kloniert und ein Nukleotidaustausch, der zu einem Aminosäureaustausch führte (A109V), nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen wiesen eine Proteasom-abhängige Instabilität dieses mutierten Proteins nach. Ebenso wurde eine teilweise granuläre Lokalisation von D123 im Cytoplasma und ein Kernausschluss beobachtet. Mögliche Phosphorylierungsstellen wurden ebenso beschrieben wie eine Homologie zu dem bis zum Beginn dieser Arbeit unbekanntem ORF YLR215C in *S. cerevisiae* [Ohno *et al.* 1984; Ohno *et al.* 1984; Zaitso *et al.* 1984; Zaitso *et al.* 1985; Okuda *et al.* 1996; Onisto *et al.* 1998; Okuda *et al.* 1999; Okuda *et al.* 2001]. YLR215C erhielt den Namen *CDC123* in der *Saccharomyces* Genom Datenbank (SGD; Brenner, C.).

In dieser Arbeit sollte *CDC123* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht und eine molekulare Erklärung für die in Säugerzellen beobachteten Phänotypen gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Homologie von Cdc123 zu D123 nicht nur auf Sequenzebene existiert, sondern dass eine Deletion von *CDC123* in Hefe durch das humane orthologe D123 komplementiert werden kann. Ebenso wie D123 in Säugerzellen ist auch Cdc123 in Hefe essentiell für den Eintritt in den Zellzyklus und das Verlassen der G1-Phase. Mit Hilfe der SGA-Analyse, der systematischen Suche nach synthetisch genetischen Interaktionen mit den ca. 4700 zur Verfügung stehenden Deletionen nicht essentieller Gene in *S. cerevisiae*, konnten 50 Gene identifiziert werden, die mit *CDC123* in Verbindung stehen. Es waren Gene unterschiedlichster Bereiche zellulärer Funktion und Lokalisation dabei, die eine funktionale Einordnung von *CDC123* allein aufgrund dieser Interaktionen unmöglich machte. Eine Gruppe von 6 Genen (*GCN3*, *TIF1*, *TIF2*, *TIF3*, *TIF4631*, *TIF4632*), allesamt Translations-initiationsfaktoren, erschien vor dem Hintergrund einer publizierten Interaktion von Cdc123

mit Gcd11 vielversprechend. Daraufhin konnte ebenfalls eine synthetische Interaktion (letal, bzw. krank) zwischen *cdc123*-Mutanten und *GCD11*- bzw. *SUI2*-Allelen (Untereinheiten  $\gamma$  und  $\alpha$  des Initiationsfaktors eIF2) gefunden werden. Interaktionsstudien mit verschiedenen an der Translationsinitiation beteiligten Faktoren zeigten, dass Cdc123 ausschließlich mit eIF2 interagiert, nicht aber mit dessen Nukleotidaustauschfaktor eIF2B oder eIF3, Teil des Multifaktorkomplexes (MFC) und des 43S Präinitiationskomplexes. Die Interaktion kann in einem von Ribosomen geklärten Überstand, frei von der 40S oder 60S ribosomalen Untereinheit, stattfinden. Zusammen deutet dies auf eine Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 in einem frühen Stadium der Translationsinitiation vor der Assoziation von eIF2 mit eIF3, d.h. dem MFC oder der 40S ribosomalen Untereinheit hin. Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 scheint notwendig zu sein, für die Bereitstellung eines intakten eIF2 für die Translationsinitiation. Ein weiterer Baustein, der mit dieser Funktion von Cdc123 übereinstimmt, ist der Verlust an Polysomen und die Derepression der *GCN4*-Expression nach Inaktivierung von Cdc123-1. Der gleiche Phänotyp konnte auch schon in abgeschwächter Form mit der nur leicht beeinträchtigten C-terminalen Verkürzung von Cdc123 nach Aminosäure 327 beobachtet werden. Sowohl das veränderte Polysomenprofil als auch die dereprimierte *GCN4*-Expression sind Hinweise auf eine reduzierte Translationsinitiation. eIF2 $\gamma$  wird, anders als die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , nach dem Verlust der Cdc123-Aktivität bei 25°C leicht und bei 37°C vermehrt instabil. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Abnahme der Gcd11-Menge nicht den primären Grund für die Wachstumsbeeinträchtigung der Cdc123-Mutanten darstellt. Vielmehr ist die Interaktion von eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\alpha$  und eIF2 $\beta$  durch den Verlust der Cdc123-Aktivität stark reduziert. Dieser molekulare Befund wird als Ursache sowohl für den Arrest in der G1-Phase als auch für die reduzierte Translationsinitiation in Cdc123-Mutanten angesehen. In Übereinstimmung damit kann eine Deletion von *CDC123*, d.h. eine geringere Verfügbarkeit von eIF2 durch die Überexpression der Untereinheiten von eIF2 bedingt gerettet werden. Eine Überexpression der einzelnen Untereinheiten ermöglicht nur minimales Wachstum, wohingegen eine Kombination von eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\alpha$  oder aller drei Untereinheiten annähernd Wildtypwachstum zulässt. Cdc123 stellt somit einen neuen, für die Translationsinitiation essentiellen Faktor dar. Es ist notwendig für die effiziente Bereitstellung des eIF2-Komplexes, auf die möglicherweise über Cdc123 regulatorisch eingewirkt werden kann. Um die Beteiligung von Cdc123 an der eIF2-Funktion auszudrücken, wird als Name für den neuen Faktor der Translationsinitiation 2 $\gamma$ -AP (für eIF2 $\gamma$  assoziiertes Protein) vorgeschlagen.

## 2 ABSTRACT

The gene product of *CDC123* from *Saccharomyces cerevisiae* is essential and highly conserved. Homologues can be found in other low eukaryotes as well as in Arabidopsis, zebrafish, mouse or man. It was not before 1984 when first results from rat 3Y1 cells, an untransformed fibroblastic cell line, concerning the orthologue D123 were published. Conditional mutants were isolated, which could not initiate DNA replication and enter the cell cycle at restrictive temperature. The interest focused on the identification of new proliferation regulators to elucidate mechanisms leading to loss of proliferation control and cellular transformation. At restrictive temperature the conditional mutant 3Y1tsD123 lead to an arrest in G1 phase of the cellcycle. The mutated gene was cloned and a nukleotide exchange leading to an amino acid substitution (A109V) was identified. Further results demonstrated a proteasome dependent instability of the mutated protein. D123 did localize in the cytoplasm, partly in a granular pattern, but not in the nucleus. Possible phosphorylation sites were observed as well as a homology to the so far undescribed ORF YLR215C in *S. cerevisiae* [Ohno et al. 1984; Ohno et al. 1984; Zaitso et al. 1984; Zaitso et al. 1985; Okuda et al. 1996; Onisto et al. 1998; Okuda et al. 1999; Okuda et al. 2001]. The ORF was named *CDC123* in the Saccharomyces Genome Database (SGD; Brenner, C.).

In this work *CDC123* in *S. cerevisiae* should be examined to identify a molecular explanation for the observed phenotypes in mammalian cells. It could be shown that beside the observed similarity in sequence there also is a highly conserved functional homology. A deletion of *CDC123* in *S. cerevisiae* could be rescued by expression of the human orthologue D123. As D123 in mammalian cells *CDC123* in yeast is essential for cell cycle entry, for leaving the G1 phase. Utilizing a SGA screen, a systematic screening for synthetic genetic interactions with deletions of about 4700 non essential genes in *S. cerevisiae*, 50 genes connected with *CDC123* were identified. Including genes of various cellular function and localisation it was impossible to deduce a function for Cdc123 just by genetic interactions. Nevertheless a group of 6 genes (*GCN3*, *TIF1*, *TIF2*, *TIF3*, *TIF4631*, *TIF4632*) which are all translation initiation factors, were quite interesting with a published physical interaction of Cdc123 with Gcd11 in mind. Mutations in *cdc123* also led to a synthetic lethal or sick interaction with *gcd11* or *sui2* (eIF2 subunits  $\gamma$  and  $\alpha$ ) alleles respectively. The following interaction studies with several initiation factors made clear that Cdc123 does interact with eIF2 exclusively and not with its exchange factor eIF2B or eIF3, part of the multi factor complex (MFC) and the 43S preinitiation complex. The interaction can take place in a post ribosomal supernatant free of

40S or 60S ribosomal subunits. Taken together, this suggests an interaction of Cdc123 with Gcd11 early in translation initiation before MFC or 43S assembly and it should be necessary for the generation of intact eIF2 for the initiation process. Another piece that fits into the puzzle is the reduced amount of polysomes and the derepression of *GCN4* expression after inactivation of Cdc123-1. This phenotype also could be observed less pronounced in the less compromised c-terminal truncation of Cdc123 after amino acid 327. Loss of polysomes and *GCN4* derepression are both indicators of a defect in translation initiation.

eIF2 $\gamma$  does get unstable at 25°C after loss of Cdc123 activity. This instability is increased at 37°C. However, it could be demonstrated that the abatement of Gcd11 is not the primary cause for the observed growth phenotype of *cdc123* mutants. The interaction of eIF2 $\gamma$  with eIF2 $\alpha$  or eIF2 $\beta$  is greatly reduced after loss of Cdc123 function. This molecular phenotype is more likely to cause the diminished translation initiation and the observed accumulation of cells in G1 in *cdc123* mutants. Consistent with this a deletion of *CDC123*, *i.e.* a diminished availability of eIF2 complex, can partly be rescued by the overexpression of eIF2 subunits. Overexpression of single subunits only allows minimal growth whereas co-overexpression of eIF2 $\gamma$  with eIF2 $\alpha$  or all three subunits almost can restore wildtype growth. Hence Cdc123 can be seen as a factor necessary for efficient translation initiation by limiting the availability of eIF2. Regulation of this step via Cdc123 activity could be possible. To stress the involvement of Cdc123 in eIF2 function a new name for the new factor of translation initiation is proposed, 2 $\gamma$ -AP (eIF2 $\gamma$  associated protein).

## 3 EINLEITUNG

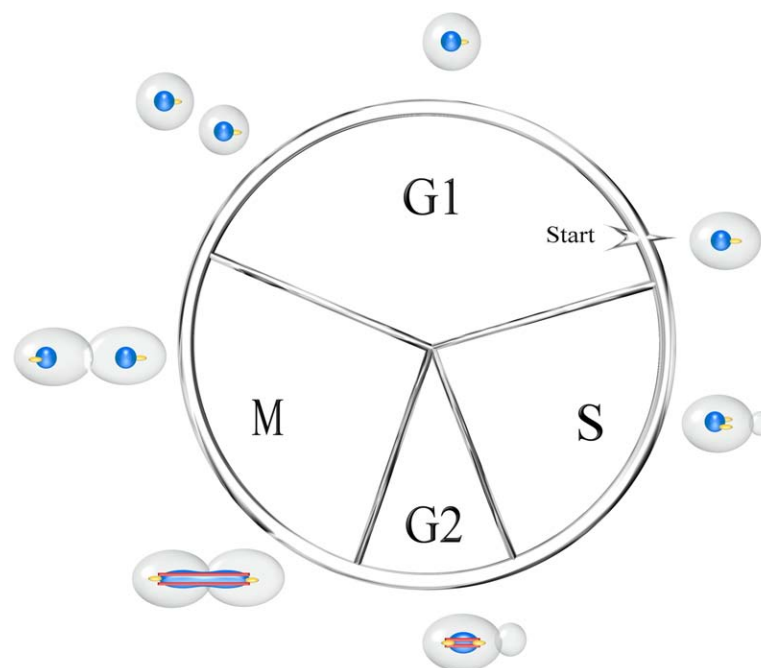
### 3.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* gehört zu der Klasse der Schlauchpilze (Ascomyceten) und ist ein gut untersuchter Modellorganismus. Sie bietet einige Vorzüge, die sie als Forschungsobjekt prädestinieren. Zum einen ist sie ein Eukaryont und besitzt als solcher grundlegende Eigenschaften, die sie mit anderen Vertretern dieser Gattung teilt. Viele der ca. 6000 Gene der Hefe haben Orthologe im Genom höherer Eukaryonten und sind teilweise bis zum Menschen konserviert. In einigen Fällen konnte sogar gezeigt werden, dass humane Proteine in der Lage sind, das entsprechende Protein in Hefe zu ersetzen und somit eine Deletion des jeweiligen Gens zu komplementieren [Flowers *et al.* 1995]. Folglich können Ergebnisse aus Hefe häufig direkt auf höhere Eukaryonten übertragen werden. Im Gegensatz zu diesen, ist *S. cerevisiae* als Einzeller im Labor besonders leicht zu handhaben. Sie besitzt eine Generationszeit von nur ca. 90 min. Neben den gut etablierten Methoden zur genetischen Manipulation ist es nicht zuletzt die seit 1996 bekannte Sequenz des Genoms, die es ermöglicht, auf einfache Weise Hefestämme mit bestimmten genetischen Eigenschaften zu erzeugen. Die im Labor verwendeten heterothallischen Stämme besitzen nicht mehr die Fähigkeit des Paarungstypwechsels, wie sie bei natürlich vorkommenden homothallischen Hefen existiert. Dies erlaubt die stabile Kultivierung haploider Stämme und die gezielte Kombination genetischer Merkmale durch Kreuzung von Stämmen entgegengesetzten Paarungstyps. In diesen diploiden Stämmen kann durch Mangelbedingungen eine Meiose eingeleitet werden. *S. cerevisiae* bildet dabei vier haploide Sporen in einem Ascus aus (Tetrade). Durch den Einsatz geeigneter genetischer Marker und verschiedener aufeinanderfolgende Selektionsschritte ist es inzwischen durch die sogenannte SGA-Analyse (engl. *synthetic genetic array*, [Tong *et al.* 2001]) sogar möglich, den bis dato langwierigen Prozess der Analyse der Sporen zu automatisieren. Dadurch kann man die Auswirkungen der Kombination genetischer Merkmale effizient und in großem Maßstab untersuchen.

Alles in allem steht mit der Hefe *S. cerevisiae* ein effizientes Werkzeug für die Analyse eukaryontischer Zellen zur Verfügung, das erlaubt, grundlegende Funktionen des Lebens wie zum Beispiel die Regulation des Zellteilungszyklus oder auch die Translation und deren Regulation in einem einfach zugänglichen Modellorganismus zu untersuchen.

### 3.2 Der Zellteilungszyklus in *Saccharomyces cerevisiae*

Der Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae* wird wie in allen Eukaryonten in vier Phasen unterteilt (Abb. 3.1, [Lew *et al.* 1997]). In der S-Phase (Synthese) wird die DNA repliziert, in der Mitose (M-Phase) werden die Schwesterchromatiden auf die Tochter- und die Mutterzelle aufgeteilt. Die S- und die M-Phase werden jeweils durch eine G-Phase (engl. *gap*) voneinander getrennt. Die G1-Phase, die an die Mitose anschließt, ist die Wachstumsphase. In ihr wachsen die Zellen bis zu einer kritischen Größe heran, die es ihnen erlaubt in die S-Phase einzutreten. Den Punkt, an dem die Entscheidung für den Eintritt in den Zellzyklus getroffen wird, nennt man START. Für diese Entscheidung spielt die Zellgröße ebenso eine Rolle wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder die Anwesenheit eines Paarungspartners. Sind die Zellen zu klein, sind zu wenig Nährstoffe vorhanden oder ist Pheromon des komplementären Paarungstyps in der Umgebung vorhanden, wird der Zellzyklus am Ende der G1-Phase angehalten. Andernfalls erfolgt der Übergang zur S-Phase. Sobald der START-Punkt überschritten ist, wird der Zellzyklus bis zur G1-Phase vollendet, auch wenn sich die äußeren Bedingungen ändern. Bei den meisten anderen Eukaryonten ist dieser kritische Punkt

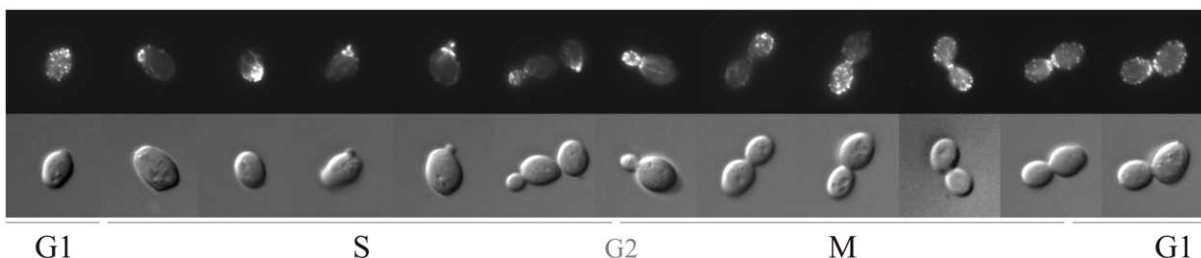


**Abbildung 3.1 Schema des Zellzyklus in *Saccharomyces cerevisiae***

Der Zellzyklus wird in die vier Phasen G1, S, G2 und M eingeteilt. Zu Beginn des Zellzyklus, beim Überschreiten des START-Punktes, bildet sich die Knospe aus und der Spindelpolkkörper verdoppelt sich. In der S-Phase (Synthese) wird die DNA repliziert und die verdoppelten Spindelpolkkörper wandern an entgegengesetzte Pole. Kernteilung und Cytokinese finden in der M-Phase (Mitose) statt.

ebenfalls am G1/S-Übergang. In wenigen Ausnahmen, wie zum Beispiel der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, befindet er sich in der G2-Phase.

In der S-Phase wird die DNA repliziert und der Spindelpolkörper (SPB von engl. *spindle pole body*) wird verdoppelt. Die Spindelpolkörper sind die Zentren für die Organisation der Mikrotubuli und Ausbildung der Spindel. Sie entsprechen den Centrosomen in anderen Organismen. Noch bevor eine Knospe erkennbar ist, wird das Actincytoskelett am Ort der Knospenbildung polarisiert (Abb. 3.2) [Pruyne *et al.* 2000]. Das Actincytoskelett leitet sekretorische Vesikel an die Zelloberfläche, an der sie fusionieren. Auf diese Weise erfolgt zunächst ein anisotropes, apikales Längenwachstum der Knospe. Während der S-Phase wandern die SPB auseinander und ordnen sich an entgegengesetzten Polen des Kerns an. Während der G2/M-Phase, nachdem das Actincytoskelett in der Tochterzelle delokalisiert wurde und sich die Actinflecken auf der gesamten Tochterzelloberfläche verteilen, erfolgt ein isotropes Wachstum der Knospe. Die Mitose selbst lässt sich wiederum in fünf einzelne Phasen unterteilen. Die Kondensation der Chromosomen sowie die Anheftung der Mikrotubuli der Kernspindel an die Kinetochoren werden der Prophase zugeordnet. Die Kernhülle wird währenddessen nicht wie in anderen Eukaryonten aufgelöst. Man spricht dabei von einer Endomitose. Ebenso bleiben in *S. cerevisiae* die Nukleoli erhalten. In der folgenden Metaphase beginnen sich die Schwesterchromatiden voneinander zu trennen. Die in höheren Eukaryonten zu beobachtende Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte gibt es in der Bäckerhefe in dieser Form ebenfalls nicht. In der Anaphase findet die Trennung der Kinetochoren statt und die Schwesterchromatiden werden auf die Mutter- und die Tochterzelle aufgeteilt. Die folgende Telophase wird durch die Trennung der Kerne und die Dekondensation der Chromosomen definiert. Es folgt die Cytokinese bei der die Tochter- und die Mutterzelle voneinander getrennt werden. Der Zellzyklus kann nun von neuem beginnen.



**Abbildung 3.2 Das Actincytoskelett im Verlauf des Zellzyklus**

Wildtypzellen (BY4741) wurden bei 25°C in Vollmedium mit Glucose kultiviert, geerntet und mit Formaldehyd fixiert. Die Färbung des Actincytoskeletts erfolgte mit Alexa488 gekoppeltem Phalloidin. (siehe auch [Pruyne *et al.* 2000])

### 3.3 Regulation des Zellzyklus

#### 3.3.1 Die CDC-Gene

L. Hartwell konnte in den siebziger Jahren durch Mutationsanalysen in *S. cerevisiae* eine große Anzahl an CDC-Genen (engl. *cell division cycle*) identifizieren, die für die Regulation und das Voranschreiten des Zellzyklus eine essentielle Rolle spielen. Eine zentrale Aussage dieser Arbeiten war, dass das Auftreten bestimmter Ereignisse während des Zellzyklus die erfolgreiche Beendigung vorangegangener Ereignisse voraussetzt. Für die Entdeckung war folgende Annahme ausschlaggebend. Nach einer Mutagenese und der Suche nach temperatursensitiven Klonen sollten diejenigen mit einem Defekt in einem für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendigen Gen bei restriktiver Temperatur mit einem einheitlichen terminalen Phänotyp arretieren [Hartwell *et al.* 1970]. Inzwischen wurden mehr als 70 solcher Gene in *S. cerevisiae* identifiziert. Die cyclinabhängige Kinase Cdc28 (Cdk1) spielt dabei für den zeitlich koordinierten Ablauf des Zellzyklus in Hefe eine entscheidende Rolle.

#### 3.3.2 Regulation durch Cyclinabhängige Kinasen

Cyclinabhängige Kinasen (CDK, engl. *cyclin dependent kinase*) sind Protein Kinasen, deren katalytische Untereinheiten bis hin zum Menschen hochkonserviert sind. In den meisten Organismen wird die CDK, die für die Regulation der Mitose verantwortlich ist Cdc2 genannt. In *S. cerevisiae* ist dies Cdc28, die jedoch auch außerhalb der M-Phase eine entscheidende Rolle spielt [Mendenhall *et al.* 1998]. CDKs phosphorylieren ihre Substrate überwiegend an einem S/T-P-Motiv. Ihre Aktivität kann auf vielfältige Weise reguliert werden. Die Bindung an ihre regulatorische Untereinheit, ein Cyclin, sowie eine Phosphorylierung durch sogenannte CAKs (engl. *CDK activating kinases*) sind für ihre Aktivierung notwendig. Negativ regulatorisch wirken dabei inhibitorische Proteine (CKIs, engl. *CDK inhibitors*) und die Möglichkeit inhibitorischer Phosphorylierung.

Die Cycline erhielten ihren Namen aufgrund ihres periodischen Auftretens während des Zellzyklus [Evans *et al.* 1983]. Sie regulieren die Aktivität der CDK und verleihen ihr ihre Spezifität. In *S. cerevisiae* unterscheidet man zwei Gruppen von Cyclinen, die G1-Cycline (Cln1-3) sowie die B-Typ Cycline (Clb1-6). Die Cycline Cln1-3 treten in der G1-Phase auf. Sie sind essentiell für das Verlassen der G1-Phase und den Eintritt in den Zellzyklus [Cross 1990]. Cln3/CDK phosphoryliert dabei den Transkriptioninhibitor Whi5 und ermöglicht so die Aktivierung der Transkription von START-spezifischen Genen, unter anderem den Cyclinen Cln1,2 und Clb5,6. [Costanzo *et al.* 2004; de Bruin *et al.* 2004]. Die Cln1,2/Cdc28



Aktivität steuert die Polarisierung des Cytoskeletts für die Knospenbildung, inaktiviert die Proteolyse der B-Typ Cycline, ermöglicht die Verdopplung der SPB und aktiviert die Proteolyse des Clb/CDK-Inhibitors Sic1. Auf diese Weise wird eine Aktivierung der Clb5,6/CDK-abhängigen DNA-Replikation [Schwob *et al.* 1994], d.h. der Eintritt in die S-Phase ermöglicht. Die vier mitotischen Cycline Clb1-4 kontrollieren die Initiation und den Ablauf der Mitose. Sie sind verantwortlich für die Bildung und Elongation der mitotischen Spindel und die Chromosomensegregation. Der Austritt aus der Mitose wird durch die Akkumulation des Clb/Cdc28-Inhibitors Sic1 und die Degradation von Clb2 und Clb3 gewährleistet.

Neben der zeitlich regulierten Transkription der Zellzyklusregulatoren spielt diese Degradation, die durch das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt wird, eine entscheidende Rolle, um die Kurzlebigkeit diverser Faktoren und damit deren koordiniertes Auftreten zu gewährleisten [Hochstrasser 1995; Hershko 1997]. Auf diese Weise können irreversible Übergänge zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus realisiert werden [King *et al.* 1996; Hoyt 1997]. Neben der Transkription, Modifikation und Degradation von Proteinen trägt auch die Translation dazu bei, den Eintritt in den Zellzyklus zu regulieren. Ziel dieser Regulation ist Cln3. Im Gegensatz zu anderen Cyclinen fluktuiert sein Transkript nicht während des Zellzyklus. Cln3 selbst ist ein sehr instabiles Protein und Ziel regulatorischer Phosphorylierung [Tyers *et al.* 1992; Cross *et al.* 1993]. Zusätzlich wird die Cln3-Expression auf Ebene der Translation reguliert (siehe 3.4.2) [Barbet *et al.* 1996; Gallego *et al.* 1997]. Die *CLN3* Expression und der Übergang von START hängt somit von einer gut funktionierenden Proteinneusynthese ab und stellt auf diese Weise einen Mechanismus bereit, der Wachstum und Teilung reguliert. Gestärkt wird dieser Punkt durch die Tatsache, dass auch Gene, die Teil der Translationsmaschinerie sind oder diese regulieren, unter den *CDC*-Genen zu finden sind. Dazu gehören unter anderem *CDC33* als Teil des Initiationskomplexes eIF4F [Brenner *et al.* 1988], *CDC63/PRT1* als Teil von eIF3 [Hanic-Joyce *et al.* 1987] oder auch *CDC25* [Chen *et al.* 2000] als Regulator der Adenylatcyclase *CDC35* [Jacquet *et al.* 1985; Camonis *et al.* 1986].

### 3.4 Die Translation

Der Prozess der Translation - der Proteinsynthese - ist ebenso wie die beteiligten Komponenten unter allen Eukaryonten stark konserviert. Die Information der mRNA wird durch die Ribosomen, großen Ribonukleoproteinkomplexen von ca. 4 MDa, zusammen mit einer Vielzahl zusätzlicher Faktoren in Proteine übersetzt. Die Translation kann in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination gegliedert werden. Die Initiation ist normalerweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Proteinneusynthese [Sonenberg *et al.* 2000]. Dies konnte durch *in vitro* Experimente mit Weizenkeimen durch A. Marcus [Marcus *et al.* 1970] gezeigt und später durch Studien mit Translationsinhibitoren [Safer *et al.* 1978] und Nuklease-Schutz-Experimenten [Wolin *et al.* 1988] bestätigt werden. Die Translationsinitiation umfasst alle Vorgänge, die Ribosomen mit der Initiator-Methionyl-Transfer-RNA ( $tRNA_i^{Met}$ ) in ihrer Peptidyl-(P-)Stelle am Startcodon der mRNA zusammenbringt. Während der Elongation erfolgt die eigentliche Proteinsynthese durch das Ribosom [Doudna *et al.* 2002; Ramakrishnan 2002]. Sobald das Stopcodon erreicht ist, wird die Synthese beendet, das Polypeptid wird vom Ribosom und dieses meist von der mRNA freigesetzt. Neben dem Ribosom sind weitere Translationsfaktoren für die Assoziation mit der mRNA, die Auswahl der aktivierten Aminosäuren sowie für die Termination notwendig.

#### 3.4.1 Die Translationsinitiation

Für den komplexen Vorgang der Initiation werden mindestens 12 Translationsinitiationsfaktoren (eIF, engl. *eukaryotic initiation factor*) verwendet. Sie kann wiederum in vier aufeinanderfolgende Schritte unterteilt werden. Als erstes erfolgt die Bildung eines 43S Präinitiationskomplexes, bestehend aus der kleinen 40S ribosomalen Untereinheit, verschiedener eIFs sowie der  $tRNA_i^{Met}$ . Der nächste Schritt ist die Rekrutierung dieses Komplexes an die 5'-Cap-Struktur der mRNA. Es folgt ein Abtasten (*Scanning*) der mRNA bis zur Erkennung des Startcodons, meist das erste AUG Codon. Abgeschlossen wird die Initiation durch die Verbindung der großen 60S mit der kleinen 40S ribosomalen Untereinheit, d.h. der Erzeugung des vollständigen 80S Ribosoms, das die Proteinsynthese beginnen kann (Abb. 3.3, [Merrick 1992; Pain 1996; Hinnebusch 2000; Preiss *et al.* 2003; Kapp *et al.* 2004]).

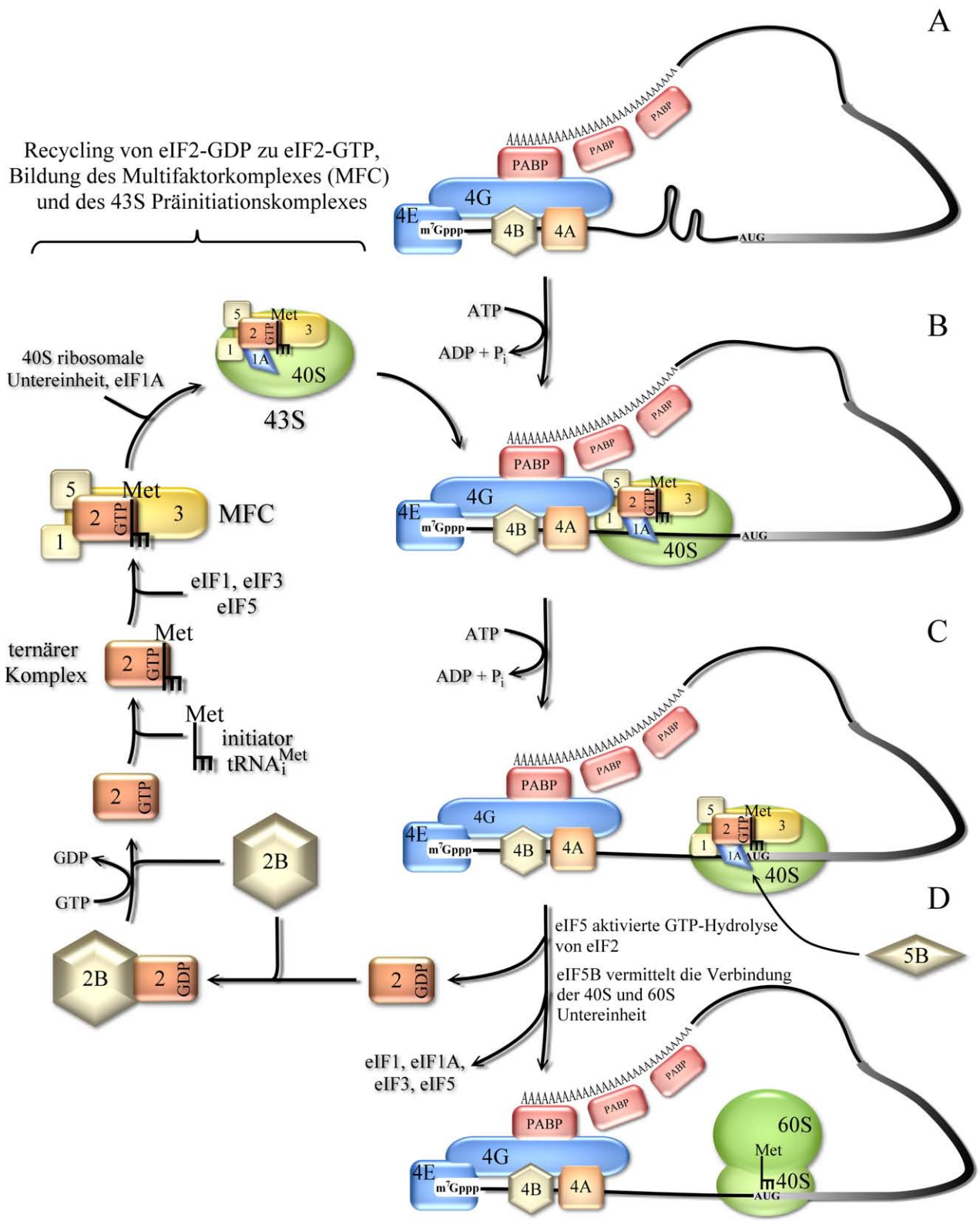


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Translationsinitiation in *Saccharomyces cerevisiae*

### Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Translationsinitiation in *Saccharomyces cerevisiae*

Detaillierte Beschreibung im Text. A) Bindung von Initiationsfaktoren an die 5'-Cap-Struktur und das poly(A)-Ende der mRNA. B) Aufwinden störender RNA-Sekundärstrukturen und Rekrutierung des zuvor gebildeten 43S Präinitiationskomplexes. C) *Scanning* des 43S Initiationskomplexes und Erkennen des AUG Startcodons. D) Freisetzung von eIF2-GDP nach der durch eIF5 aktivierten GTP-Hydrolyse. eIF5B vermittelt die Verbindung der 60S mit der 40S ribosomalen Untereinheit zum 80S Ribosom. Währenddessen werden die verbleibenden Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF5 und eIF3 freigesetzt. eIF2-GDP wird durch eIF2B zu eIF2-GTP umgesetzt und kann dadurch erneut  $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$  binden. Dieser ternäre Komplex bildet mit eIF1, eIF3 und eIF5 den Multifaktorkomplex (MFC) und kann mit diesem an die 40S ribosomale Untereinheit und eIF1A binden. Es entsteht der 43S Präinitiationskomplex, der für eine neue Initiation der Translation zur Verfügung steht.

#### 3.4.1.1 Bildung des 43S Präinitiationskomplexes

Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung des inaktiven 80S Ribosoms aus der 40S und 60S ribosomalen Untereinheit bevorzugt. Somit ist eine erste Voraussetzung für die Translationsinitiation die Erzeugung von freien, aktiven 40S Untereinheiten. Der genaue Mechanismus hierfür ist bisher noch nicht geklärt. Beide Untereinheiten sind jedoch Ziel bindender Proteine, die eine Assoziation der Untereinheiten 40S und 60S verhindern können. So zeigen eIF1A [Goumans *et al.* 1980], eIF3 [Trachsel *et al.* 1979; Goss *et al.* 1988] und eIF6 [Russell *et al.* 1979; Valenzuela *et al.* 1982; Raychaudhuri *et al.* 1984] eine anti-assoziative Wirkung *in vitro*. Ob diese Faktoren für das Recycling der 80S Ribosomen verantwortlich sind oder nur eine verfrühte Assoziation der Untereinheiten verhindern, ist noch nicht geklärt. eIF1 kann zusammen mit eIF1A in Abwesenheit anderer Faktoren ebenfalls an die 40S ribosomale Untereinheit binden und kommt somit auch für diese Funktion in Frage [Maag *et al.* 2003]. Die Aufgabe von eIF6 in der Translationsinitiation wurde später in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass es eine essentielle Aufgabe in der Biogenese der 60S Untereinheit erfüllt [Basu *et al.* 2001]. Des weiteren zeigten Zellextrakte ohne eIF6 keinen Defekt während der Translation *in vitro* [Si *et al.* 1999]. eIF3 stellt einen guten Kandidaten für die Dissoziation des 80S Ribosoms dar. Unterschiedliche Experimente legen nahe, dass es an der 60S abgewandten Seite mit der 40S Untereinheit interagiert [Srivastava *et al.* 1992; Valasek *et al.* 2003]. Es hemmt somit nicht einfach durch eine sterische Hinderung eine Assoziation der ribosomalen Untereinheiten, sondern ruft möglicherweise eine Konformationsänderung in der 40S Untereinheit hervor, die eine dissoziative und anti-assoziative Wirkung hat. Neuere Ergebnisse legen zusätzlich eine notwendige Interaktion von eIF3 mit dem ternären Komplex  $\text{eIF2-GTP-tRNA}_i^{\text{Met}}$  für die

antiassoziative Wirkung nahe. Auch scheint die Anwesenheit bestimmter einzelsträngiger Oligonukleotide diese Wirkung zu unterstützen [Kolupaeva *et al.* 2005].

Mit der nun zur Verfügung stehenden 40S ribosomalen Untereinheit kann der für die Initiation notwendige 43S Komplex gebildet werden. Dies geschieht durch die Assoziation mit den Initiationsfaktoren eIF1A, eIF1, eIF3, eIF5 und dem ternären Komplex bestehend aus eIF2, GTP und tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. In Hefe können sich die Faktoren eIF1, eIF3, eIF5 und eIF2 in Form des ternären Komplexes unabhängig von der 40S ribosomalen Untereinheit zusammenfinden. Sie bilden den sogenannten Multifaktorkomplex (MFC, engl. *multi factor complex*), der möglicherweise ein wichtiges Zwischenstadium während der Initiation darstellt [Asano *et al.* 2000].

### 3.4.1.2 Rekrutierung des 43S Komplexes zur mRNA

Alle gereiften eukaryontischen mRNAs des Kerns besitzen eine 5'-m<sup>7</sup>G-Cap-Struktur. Bis auf wenige Ausnahmen werden alle mRNAs außerdem an ihrem 3'-Ende polyadenyliert. Beides ist für die effiziente Translation einer mRNA notwendig. eIF4E bindet an die 5'-Cap-Struktur [Brenner *et al.* 1988] und vermittelt auf diese Weise die Interaktion mit der Translationsinitiationsmaschinerie. eIF4E ist Teil des eIF4F-Komplexes. In diesem ist eIF4E ebenso wie eIF4A an das große Gerüstprotein eIF4G gebunden [Lamphear *et al.* 1995; Dominguez *et al.* 1999]. eIF4F erfüllt dabei zwei Aufgaben. Zum einen können durch eIF4A, einer DEAD-Box RNA-Helicase [Blum *et al.* 1992], Sekundärstrukturen der mRNA in Abhängigkeit von ATP aufgelöst und dadurch die mRNA für die Bindung des 43S Präinitiationskomplexes vorbereitet werden. Diese Fähigkeit wird durch die Bindung an eIF4G gefördert [Pause *et al.* 1994; Korneeva *et al.* 2005]. Ebenfalls stimulierend wirken eIF4B, ein RNA bindendes Protein und eIF4H, das eine Homologie zu der RNA bindenden Domäne von eIF4B aufweist [Richter-Cook *et al.* 1998; Rogers *et al.* 2001]. Zum anderen dient eIF4G als Adapter für weitere Proteine. Poly(A)-bindendes Protein (PABP, Pab1 in *S. cerevisiae*) assoziiert mit eIF4G [Tarun *et al.* 1997] und bringt so das 3'-poly(A)-Ende der mRNA mit der Cap-Struktur in Verbindung. Offensichtlich bietet erst diese pseudozirkuläre, mit Proteinen assoziierte mRNA die Basis für eine effiziente Translation [Preiss *et al.* 1998; Kahvejian *et al.* 2005]. Dies bietet auch die Möglichkeit zu verstehen, wie 3'-untranslatierte Bereiche (3'-UTR, *untranslatierte Region*) bindende Faktoren regulatorisch auf die Translation einwirken könnten. Die Rekrutierung des 43S-Komplexes an die mRNA erfolgt in *S. cerevisiae* vermutlich über die Bindung von eIF4G an eIF1 und eIF5 [He *et al.* 2003]. Die in Säugern beschriebene wichtige Bindung von eIF4G an eIF3 konnte in Hefe bisher nicht nachgewiesen werden [Hentze 1997]. Es entsteht der sogenannte 48S Komplex.

### 3.4.1.3 Finden des Startcodons, *Scanning*

Der Initiationskomplex beginnt die mRNA in 5'-3'-Richtung schrittweise abzutasten, bis das Startcodon erreicht ist. Dies ist in 95 % der untersuchten mRNAs von Säugern und Hefe das erste AUG nach der Cap-Struktur [Kozak 1989]. Der genaue Mechanismus der Migration ist, obwohl schon 1979 vorgeschlagen [Kozak 1978], nach wie vor nicht bekannt. Die Translationsinitiation erfolgt ATP abhängig. Es ist jedoch unklar, ob dieses benötigt wird, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen oder ob der Abtastvorgang selbst Energie benötigt. Die Migration des 43S Komplexes über unstrukturierte RNA erfordert *in vitro* jedoch keine Energie. Dies deutet an, dass Energie in Form von ATP erst benötigt wird, wenn der 43S Komplex auf stabile Strukturen der mRNA stößt [Pestova *et al.* 2002]. Im Laufe der Zeit wurde deutlich, dass viele Faktoren für diesen Prozess und vor allem für die Genauigkeit bei der Erkennung des richtigen Startcodons eine Rolle spielen. So tragen eIF1, eIF1A, eIF5 ebenso wie eIF3 und nicht zuletzt eIF2 dazu bei, den 43S-Komplex am richtigen Startcodon zu positionieren [Donahue *et al.* 1988; He *et al.* 2003; Valasek *et al.* 2004; Fekete *et al.* 2005]. Ob der 43S Komplex alleine oder zusammen mit den 5'-Cap-gebundenen Faktoren von eIF4F beginnt, in 5'-3'-Richtung zu wandern, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese Bindung für das *Scanning* über strukturierte RNA notwendig ist [Pestova *et al.* 2002]. Sobald das Start-AUG durch Basenpaarung an das Anticodon der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> erkannt ist, wird die GTPase eIF2 durch eIF5 aktiviert [Das *et al.* 2001; Paulin *et al.* 2001]. Ein weiteres Ereignis, das möglicherweise zur Aktivierung der Hydrolyse beiträgt, ist eine Konformationsänderung innerhalb des 43S-Komplexes nach der Erkennung des Startcodons [Maag *et al.* 2005]. Nach der GTP-Hydrolyse wird eIF2-GDP von dem Initiationskomplex freigesetzt. Mit Hilfe von eIF5B kommt es in dem zweiten GTP-abhängigen Schritt der Translationsinitiation zur Bindung der 60S an die 40S ribosomale Untereinheit, d.h. zur Bildung des 80S Ribosoms und zur Freisetzung der anderen beteiligten Initiationsfaktoren [Lee *et al.* 2002; Unbehaun *et al.* 2004]. Die GTPase-Aktivität von eIF5B ist dabei nicht für die Verbindung der 40S und 60S Untereinheiten notwendig, sondern wird durch die Bindung aktiviert und setzt den Initiationsfaktor frei [Shin *et al.* 2002].

Obwohl die Initiation meistens am erstmöglichen Startcodon stattfindet, gibt es Ausnahmen und interessante Mechanismen wie das 40S Ribosom an den Ort der Initiation gelangen kann. Sie lassen sich in vier Gruppen einteilen.

### (1) *Leaky Scanning*

Die Basenpaarung des AUG mit der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> macht nicht alleine die Identifikation des Startcodons aus, sondern auch der Kontext, in dem es sich befindet [Kozak 1991; Wang *et al.* 2004]. Dadurch kann es bei einem AUG in einem ungünstigen Kontext vorkommen, dass es vom Initiationskomplex nicht beachtet und die Initiation erst bei einem Startcodon in passenderer Umgebung in 3'-Richtung initiiert wird. Liegt das zweite Startcodon im gleichen Leserahmen wie das erste entsteht ein N-terminal verkürztes Protein. Ist dies nicht der Fall, ermöglicht dies die Translation eines zweiten, anderen Genproduktes [Kozak 2002]. Diese bei Viren beobachtete Form der Translationsinitiation findet ebenso bei Eukaryonten statt und könnte dort sogar weit verbreitet sein [Smith *et al.* 2005]. Eine Möglichkeit, die gerade bei der unerwartet geringen Anzahl von Genen im menschlichen Genom attraktiv erscheint [Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001].

### (2) *Reinitiation*

In einigen Fällen existieren ein oder mehrere kurze offene Leserahmen *upstream* des eigentlichen Startcodons (uORF, engl. *upstream open reading frame*). Nach der Translation eines dieser uORFs dissoziiert die 60S ribosomale Untereinheit am Stop-Codon ab. Man nimmt an, dass die 40S Untereinheit an dieser polycistronischen mRNA gebunden verbleibt und erneut beginnen kann, ein Start-Codon zu suchen. Dieses Modell beinhaltet, dass die 40S ribosomale Untereinheit während des Ab tastens erneut einen ternären Komplex und vermutlich andere Initiationsfaktoren binden kann. Sobald dies geschehen ist, kann ein weiteres Start-Codon *downstream* erkannt und die Translation erneut initiiert werden [Morris *et al.* 2000; Meijer *et al.* 2002]. Allen bekannten Fällen ist gemein, dass uORFs die Translation des eigentlichen Gens stark beeinträchtigen. Dies bietet die Möglichkeit der Regulation, sodass die Translation bestimmter mRNAs der aktuellen Fähigkeit einer Zelle zur Translationsinitiation angepasst werden kann. So wird zum Beispiel in *S. cerevisiae* die *CLN3* mRNA lediglich bei hoher und im Gegensatz dazu die mRNA von *GCN4* nur bei reduzierter Initiationsfrequenz translatiert (siehe 3.4.2).

### (3) *Ribosome shunting*

Bei dem sogenannten *Ribosome shunting* erfolgt die Bindung des Initiationskomplexes abhängig von der 5'-Cap-Struktur. Das *scannende* Ribosom trifft dann auf eine stabile RNA-Struktur und wird auf eine bisher nicht verstandene Weise auf eine entfernte, *downstream* gelegene Landesequenz versetzt. Die zwischenliegende Sequenz der mRNA wird dabei übersprungen. Das Ribosom nimmt den *Scanvorgang* wieder auf, bis ein entsprechendes Start-Codon gefunden wurde. Es gibt Hinweise darauf, dass bei diesem Vorgang zur 18S

rRNA komplementäre Sequenzen auf der mRNA notwendig sind, die eine geeignete „Landeplattform“ zur Verfügung stellen [Yueh *et al.* 1996]. Entdeckt wurde dieser Vorgang bei der Translation verschiedener viraler RNAs. Ob dieser Mechanismus generell bei RNA Sequenzen mit ausgeprägter Sekundärstruktur zum Einsatz kommt, ist bisher nicht geklärt.

(4) *Interne Initiation* [Hellen *et al.* 2001]

Eine weitere Spielart ist die Cap-unabhängige Initiation an internen Initiationssequenzen (IRES, engl. *internal ribosomal entry sites*). Ursprünglich wurde die interne Initiation bei Picornaviren beschrieben. Deren mRNA wird nicht mit der für Eukaryonten typischen Cap-Struktur versehen und enthält ungewöhnlich lange 5'-UTRs von mehreren hundert Nukleotiden. Diese können stabile Sekundärstrukturen ausbilden und enthalten mehrere AUG Triplets, die als Barriere für das *Scanning* der Cap-abhängigen Initiation wirken. Durch bestimmte Sequenzen und Sekundärstrukturen können verschiedene Initiationsfaktoren, unter anderem eine prozessierte Form von eIF4G, und der 43S Präinitiationskomplex direkt zum Start-Codon oder in manchen Fällen bis zu 160 Nukleotide *upstream* davon rekrutiert werden. Vermutlich spielt auch die direkte Bindung der 40S Untereinheit, möglicherweise über die 18S rRNA, an IRES Strukturen eine wichtige Rolle. Die Art der Bindung und die benötigten Faktoren können von Fall zu Fall unterschiedlich sein, da mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen der Initiation an IRES Sequenzen entdeckt wurden [Pestova *et al.* 2001]. Dabei ist die strukturelle Integrität der IRES Sequenz von großer Bedeutung. Selbst Punktmutationen können ihre Funktion empfindlich stören. IRES-Sequenzen verschiedener Viren können ebenfalls äußerst unterschiedlich sein. Eine Vorhersage anhand der Sequenz ist bisher nicht möglich. Nichts desto trotz konnten auch bei Eukaryonten mRNAs mit IRES Sequenzen identifiziert werden und ihre Zahl wächst stetig [Gan *et al.* 1996; Nanbru *et al.* 1997; Johannes *et al.* 1999]. Auch in *S. cerevisiae* konnte die Fähigkeit zur internen Initiation mit Hilfe artifizieller Konstrukte nachgewiesen werden [Paz *et al.* 1999]. In exponentiell wachsenden Zellen scheint sie dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen und kommt erst in der stationären Phase oder unter Mangelbedingungen zum tragen. Der Befund, dass eIF4G in Hefe bei Erreichen der stationären Phase abgebaut wird, unterstützt ebenfalls die Existenz der Cap-unabhängigen Initiation durch die Notwendigkeit der Proteinneusynthese ohne eIF4G [Berset *et al.* 1998]. Auch wurden mRNAs identifiziert, die als IRES funktionierende 5'-UTRs besitzen [Zhou *et al.* 2001; Seino *et al.* 2005]. Die Rolle der Existenz dieser Art von Translationsinitiation ist noch nicht geklärt und auch nicht gänzlich unumstritten [Schneider *et al.* 2001; Mauro *et al.* 2004; Verge *et al.* 2004]. Sie bietet jedoch eine weitere Möglichkeit



der translationalen Regulation der Proteinsynthese unter verschiedenen physiologischen Bedingungen.

#### 3.4.1.4 Der Translationinitiationsfaktor eIF2

Ein zentraler Schritt in der Translationsinitiation ist der Transfer der Initiator-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> zu der ribosomalen P-Stelle. In Eukaryonten wird dies durch den ternären Komplex aus eIF2, GTP und tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> durchgeführt. Der Translationsinitiationsfaktor eIF2 mit einer Gesamtmasse von ungefähr 124 kDa ist ein hochkonserviertes Heterotrimer, bestehend aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Es gibt Homologe in Hefe, dem Menschen bis hin zu Archäen, nicht aber in Eubakterien. In *S. cerevisiae* werden die Untereinheiten von den Genen *SUI2* ( $\alpha$ ), *SUI3* ( $\beta$ ) und *GCD11* ( $\gamma$ ) codiert. Für den Komplex aIF2 aus Archäen wurde gezeigt, dass die beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  an eIF2 $\gamma$  binden, wohingegen  $\alpha$  und  $\beta$  untereinander keinen Kontakt haben [Schmitt *et al.* 2002]. Bei einer Aufreinigung von eIF2 erhält man normalerweise den heterotrimeren Komplex. Es kommt jedoch vor, dass ebenso ein aktives Dimer aus  $\alpha$  und  $\gamma$  gereinigt wird [Hershey 2000]. Eine intakte  $\beta$ -Untereinheit scheint zumindest *in vitro* nicht essentiell für tRNA-Bindung und Bildung des ternären Komplexes zu sein. Eine Reihe unterschiedlicher biochemischer und genetischer Experimente ordnet eIF2 $\gamma$  sowohl die GTP- als auch die tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-bindende Eigenschaft zu [Naranda *et al.* 1995; Erickson *et al.* 1996], wobei auch die  $\beta$ -Untereinheit in engem Zusammenhang mit dieser Funktion zu sehen ist [Hinnebusch 2000]. Die Homologie von eIF2 $\gamma$  zu dem Elongationsfaktor eEF1A/EF-Tu auf Sequenz- [Hannig *et al.* 1993] ebenso wie auf struktureller Ebene [Schmitt *et al.* 2002] bestätigen diese Annahme. Im Gegensatz zu EF-Tu, das jede Aminoacyl-tRNA binden muss, erkennt eIF2 ausschließlich tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Dies wird durch verschiedene Elemente der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> ermöglicht, die sie von gewöhnlichen tRNAs unterscheiden [von Pawel-Rammingen *et al.* 1992; Astrom *et al.* 1993]. Die Bindung der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> erfolgt nur in Abhängigkeit von GTP. In dieser Form besteht ein Kontakt von eIF2 zu dem Methionin der tRNA. Durch die GTP-Hydrolyse wird dieser Kontakt gelöst [Kapp *et al.* 2004], wohingegen der Kontakt mit der tRNA bestehen bleibt. Diese variable Interaktion könnte eine wichtige Rolle bei der Freisetzung der tRNA nach der Erkennung des Start-Codons spielen. Ebenfalls stellt eine erforderliche Bindung des Methionins sicher, dass nur beladene Initiator-tRNAs gebunden und in den Initiationsprozess eingebracht werden.

eIF2 $\beta$  enthält drei Wiederholungen von sieben Lysinresten und ein mögliches Zinkfingermotiv des C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-Typs in der C-terminalen Domäne als mögliche RNA-Interaktionsmotive. *In vitro* konnte eine Bindung der  $\beta$ -Untereinheit an RNA in Abhängigkeit

dieser Domänen demonstriert werden [Laurino *et al.* 1999]. In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass zwar die eIF2-Bindung an mRNA von der Lysin-reichen Region abhängig ist, nicht aber die Eigenschaft GTP und tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> zu binden. Die Lysin-reiche Region vermittelt ebenfalls die Interaktion von eIF2 $\beta$  mit dem GTPase aktivierenden Faktor eIF5 und mit der  $\epsilon$ -Untereinheit von eIF2B [Asano *et al.* 1999].

Die  $\alpha$ -Untereinheit scheint überwiegend eine regulatorische Funktion zu erfüllen. Sie ist für die Interaktion von eIF2 mit eIF2B und somit für den Nukleotidaustausch notwendig. Dementsprechend ist es Hefe möglich in Abwesenheit von eIF2 $\alpha$  zu wachsen, wenn nur die Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  zusammen mit der Initiator-tRNA<sub>i</sub> überexprimiert werden [Erickson *et al.* 1996; Erickson *et al.* 2001; Nika *et al.* 2001]. Die regulatorisch wirksame Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  an der konservierten Aminosäure Serin 51 wird durch spezifische Kinasen durchgeführt (siehe 3.4.2) und führt letztendlich zu einer verminderten Translationsinitiation (siehe 3.4.1.5).

#### 3.4.1.5 Der Translationinitiationsfaktor eIF2B

Als Produkt der Translationsinitiation entsteht eIF2-GDP. Da die Affinität von eIF2 zu GDP ca. hundertfach höher ist als zu GTP und die Dissoziationskonstante von GDP relativ hoch ist [Erickson *et al.* 1996; Kapp *et al.* 2004], würde der langsame Austausch von GDP zu GTP die Initiation der Proteinsynthese blockieren. Es wird ein Nukleotidaustauschfaktor (GEF, engl. *guanine nucleotide exchange factor*) benötigt, der diese Reaktion katalysiert. Diese Aufgabe erfüllt eIF2B [Price *et al.* 1994], ein Heteropentamer von 294 kDa aus den fünf Polypeptiden  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . In *S. cerevisiae* werden die Untereinheiten von dem nicht essentiellen Gen *GCN3* ( $\alpha$ ) und den vier essentiellen Genen *GCD7* ( $\beta$ ), *GCD1* ( $\gamma$ ), *GCD2* ( $\delta$ ) und *GCD6* ( $\epsilon$ ) codiert. Alle fünf Untereinheiten besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den entsprechenden Faktoren in Säugetieren. Man unterscheidet einen katalytischen und einen regulatorischen Subkomplex, die jeweils unabhängig voneinander *in vitro* an eIF2 binden können [Pavitt *et al.* 1998]. Der katalytische Subkomplex besteht aus den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\epsilon$ . Sie besitzen zueinander eine Sequenzähnlichkeit von 47 % über ihre gesamte Länge [Bushman *et al.* 1993]. Jedoch zeigt nur die  $\epsilon$ -Untereinheit eine katalytische Aktivität, die dem C-Terminus zugeordnet werden konnte [Gomez *et al.* 2002]. Obwohl die  $\gamma$ -Untereinheit selbst nicht als Austauschfaktor wirksam ist, wird durch sie die Bindung an eIF2 und somit die Aktivität des katalytischen Subkomplexes deutlich verstärkt [Pavitt *et al.* 1998].

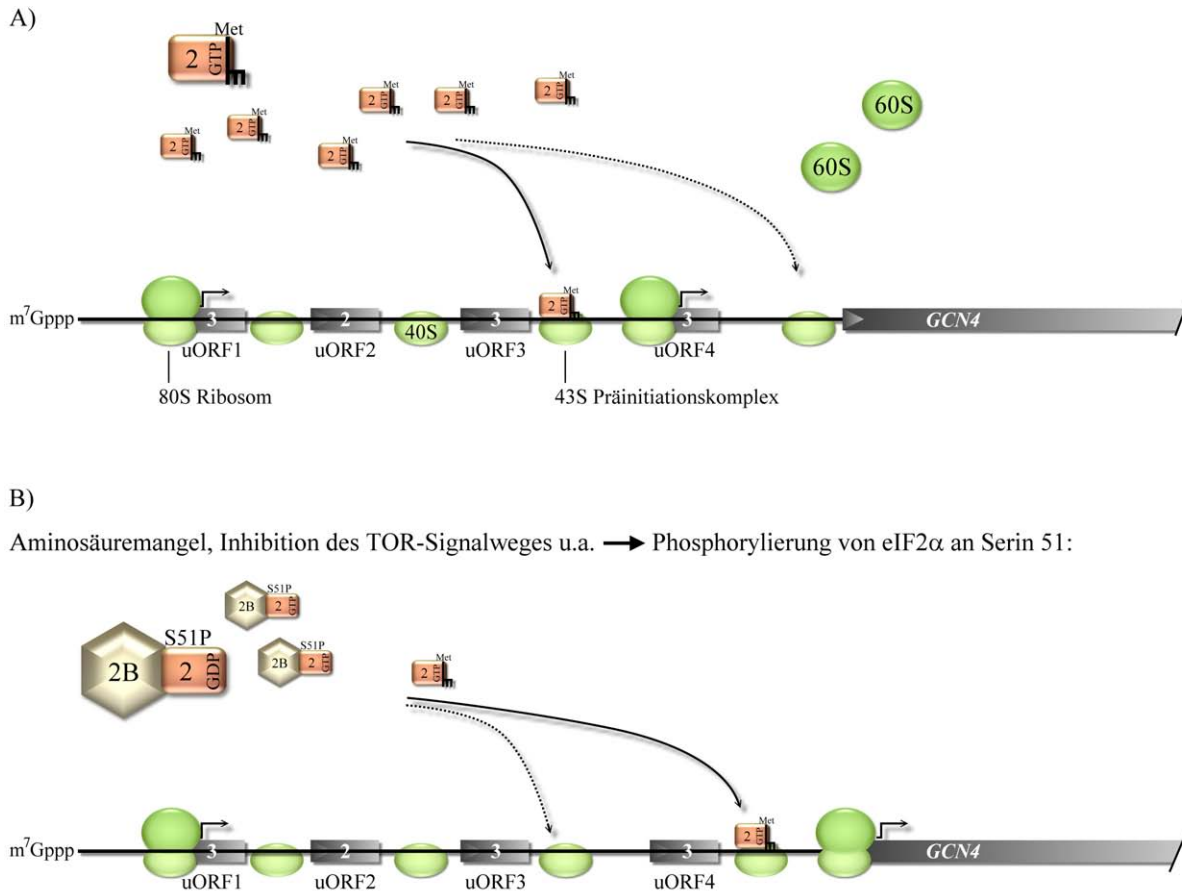
Auch die drei Untereinheiten des regulatorischen Subkomplexes -  $\alpha$ ,  $\beta$  und die C-terminale Hälfte von  $\delta$  - zeigen eine Sequenzähnlichkeit zueinander [Bushman *et al.* 1993]. Trotz der

offensichtlichen Homologie sind alle drei Proteine für die Regulation der GEF-Aktivität durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  an Serin 51 notwendig. Diese erhöht die Affinität von eIF2 zu eIF2B um das Hundertfünzigfache. Auf diese Weise agiert eIF2( $\alpha$ S51-P) als kompetitiver Inhibitor für den Nukleotidaustausch durch eIF2B und inhibiert dadurch die Translationsinitiation [Rowlands *et al.* 1988]. Durch den ca. zehnfachen Überschuss von eIF2 gegenüber eIF2B [von der Haar *et al.* 2002] reicht schon ein geringer Anteil von phosphoryliertem eIF2 $\alpha$ , um eine effektive Inhibition zu erreichen. Sowohl eine Deletion von *GCN3* als auch Mutationen in einer der essentiellen Untereinheiten hat einen Verlust der regulatorischen Funktion zur Folge [Vazquez de Aldana *et al.* 1994; Pavitt *et al.* 1997]. Der regulatorische Subkomplex bindet stärker an eIF2( $\alpha$ S51-P) als an unphosphorylierten eIF2. Die Affinität des katalytischen Subkomplexes zu eIF2 wird durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst [Pavitt *et al.* 1998]. Erklärt werden kann dieser Befund durch eine Interaktion von eIF2B( $\alpha\beta\delta$ ) mit eIF2 $\alpha$  [Krishnamoorthy *et al.* 2001] und von eIF2B( $\gamma\epsilon$ ) mit eIF2 $\gamma$ . Eine Überexpression von eIF2B( $\alpha\beta\delta$ ) kann die Wachstumsinhibition durch eine Hyperphosphorylierung von eIF2 $\alpha$  teilweise supprimieren. Möglich wird dies durch die Bindung von eIF2B( $\alpha\beta\delta$ ) an eIF2( $\alpha$ S51-P), so dass dieses nicht für die Inhibition von eIF2B zur Verfügung steht. Eine Überexpression von eIF2B( $\beta\delta\gamma\epsilon$ ) kann diesen Wachstumsnachteil vollständig ausgleichen, da die für die inhibitorische Wirkung essentielle  $\alpha$ -Untereinheit fehlt. Überexprimiert man eIF2B( $\gamma\epsilon$ ) ist dies nicht möglich, obwohl der katalytische Subkomplex eine dem Gesamtkomplex oder eIF2B( $\beta\delta\gamma\epsilon$ ) entsprechende Nukleotidaustauschrate *in vitro* aufweist. Frühe Ergebnisse beschrieben, dass eIF2-GDP nach der Verbindung von 40S und 60S ribosomaler Untereinheit am 80S Ribosom gebunden verbleibt [Gross *et al.* 1985; Thomas *et al.* 1985], eIF2B für die Freisetzung von eIF2-GDP vom 80S Ribosom benötigt und dies durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  verhindert wird [De Benedetti *et al.* 1983; Gross *et al.* 1987]. Dies legt nahe, dass der regulatorische Subkomplex von eIF2B für die Freisetzung von eIF2-GDP vom Initiationskomplex notwendig ist. Aus *S. cerevisiae* gibt es ebenfalls genetische Hinweise, dass eIF2B hierfür benötigt wird [Mueller *et al.* 1998]. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass der Nukleotidaustausch an der ribosomalen Oberfläche stattfindet [Ramaiah *et al.* 1992]. Auf diese Weise würde die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  in zweifacher Weise für die Translationsinitiation inhibitorisch wirken. Zum einen durch die verminderte Freisetzung von eIF2-GDP vom 80S Ribosom und zum anderen durch das reduzierte Recycling von eIF2-GDP zu eIF2-GTP. Eine weit verbreitete Meinung sieht den Verlauf der Vorgänge jedoch anders. Es beginnt mit der spontanen Freisetzung von eIF2-GDP

vom Initiationskomplex [Unbehaun *et al.* 2004]. Anschließend bindet eIF2B an eIF2-GDP und katalysiert den Austausch von GDP zu GTP. Der detaillierte Mechanismus dieser Reaktion ist nach wie vor umstritten. eIF2B aus Säugern wurde sowohl als Dissoziationsfaktor beschrieben, der einen sog. Ping-Pong-Mechanismus katalysiert, als auch als Austauschfaktor, der die Reaktion mit einem quartären Zwischenprodukt aus eIF2, GDP eIF2B und GTP katalysiert [Rowlands *et al.* 1988; Oldfield *et al.* 1992; Williams *et al.* 2001]. In *S. cerevisiae* wurde bisher nur Letzteres beschrieben [Nika *et al.* 2000]. Eine Notwendigkeit dieser Reaktion wäre eine zweite GTP-Bindestelle. Keine der fünf Untereinheiten aus Hefe oder dem Menschen enthält jedoch eine Konsensussequenz einer GTP-Bindedomäne [Price *et al.* 1996]. In wieweit die kürzlich beschriebene Lokalisation von eIF2B in distinkten Loci im Cytoplasma und der dynamische Transport von eIF2 in und aus diesen Loci für die Regulation oder einen der vorgeschlagenen Mechanismen eine Rolle spielt, muss noch geklärt werden [Campbell *et al.* 2005].

### 3.4.2 Regulation der Translationsinitiation

Die Translation ist der letzte Schritt der Genexpression und ein wichtiger Punkt, um regulatorisch in die Proteinneusynthese einzugreifen. Ihre Regulation ermöglicht der Zelle, Proteinmengen schnell und selektiv an veränderte Bedingungen anpassen zu können, ohne auf Transkription, Prozessierung und Export von mRNA angewiesen zu sein. Diese Art der Regulation spielt besonders unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel, Hypoxie oder Stress durch ungefaltetes Protein im Endoplasmatischen Retikulum eine wichtige Rolle. Man kann zwischen einer eher globalen Kontrolle, bei der die generelle Translations(intitations)effizienz betroffen ist, und einer mRNA spezifischen Regulation unterscheiden, bei der regulatorische Proteine Sequenzen in der 5'- oder 3'-UTR einer mRNA erkennen und daran binden. Die globale Regulation der Translation kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Die Mengen der 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten können ebenso variiert werden wie die Mengen beladener Aminoacyl-tRNAs und die Aktivitäten der beteiligten Translationsinitiationsfaktoren [Hershey 2000]. Die Faktoren eIF2 und eIF2B spielen dabei eine entscheidende Rolle. Da ein aktiver Komplex aus eIF2 und GTP benötigt wird, um die tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> zu binden und die Translation zu initiieren, beeinflusst die Aktivität des Nukleotidaustauschfaktors eIF2B die gesamte Rate der Proteinneusynthese. Es gibt jedoch auch einige wenige mRNAs, die durch die globale Variation der Translationsinitiation spezifisch beeinflusst werden. Ein gut verstandenes Beispiel einer solchen mRNA



**Abbildung 3.4 Schema des Mechanismus der Regulation der GCN4-mRNA-Translation**

Detaillierte Beschreibung im Text. Die mRNA von *GCN4* enthält vier *upstream* des eigentlichen Startcodons gelegene kleine offene Leserahmen (uORF1-4). A) Unter Bedingungen unter denen ausreichend Aminosäuren vorhanden sind, ist die Zahl des ternären Komplexes eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und damit die Wahrscheinlichkeit der Beladung des 40S Ribosoms für die Reinitiation hoch. Dadurch erfolgt die Reinitiation (Pfeil) nach uORF1 schnell genug für die Translation von uORF4. Die Initiation am *GCN4* ORF ist dadurch selten (gestrichelter Pfeil). B) Bei Aminosäuremangel wird eIF2 $\alpha$  phosphoryliert und die Zahl des verfügbaren ternären Komplexes wird verringert. Dadurch wird eine Reinitiation seltener und erfolgt häufig erst nach uORF4, so dass *GCN4* translatiert werden kann.

ist die des Transkriptionsfaktors Gcn4 in *S. cerevisiae* (Abb. 3.4) [Hinnebusch 2000]. Gcn4 ist ein Transkriptionsaktivator für verschiedenste, an der Aminosäuresynthese beteiligten Gene. Dementsprechend wird als Reaktion auf einen Mangel an Aminosäuren die Translation dieser mRNA drastisch verstärkt, obwohl die globale Translationsinitiationsrate vermindert ist. Die Bezeichnung GCN (*General amino acid control of gene expression, non-derepressing*) deutet darauf hin, dass ohne die Funktion von Gcn4 die Aktivierung dieses Transkriptionsprogramms nicht möglich ist. Eine anderen Klasse von Genen wird mit GCD (*General amino acid control of gene expression, derepressed*) bezeichnet. Dies steht für den entgegengesetzte Sachverhalt, nämlich die konstitutive Expression der Gene für die Aminosäuresynthese bei einem Funktionsverlust dieser Proteine. Viele der GCD Gene codieren für Untereinheiten der Translationsinitiationsfaktoren eIF2 und eIF2B. Für die Regulation wichtig ist des weiteren die Kinase Gcn2, die eIF2 $\alpha$  phosphoryliert [Hinnebusch 2000]. Unbeladene tRNAs können an Gcn2 über eine Histidyl-tRNA-Synthetase ähnliche Region binden. Dies ermöglicht eine Autophosphorylierung und Dimerisierung von Gcn2 [Narasimhan *et al.* 2004], wodurch die Kinase aktiviert wird. Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt letztendlich zu einer Reduktion des ternären Komplexes und somit zu einer Reduktion der globalen Translationsinitiation. Dass unter diesen Umständen *GCN4* vermehrt translatiert werden kann, liegt in dem Aufbau der mRNA begründet. Diese enthält *upstream* des eigentlichen ORFs vier kleine, zwei bzw. drei Codons lange ORFs (uORF1-4). Man nimmt an, dass die erste Initiation an uORF1 stattfindet. Nach der Termination verbleibt das 40S Ribosom an der mRNA und wandert weiter in 3'-Richtung. Durch die erneute Bindung eines ternären Komplexes kann die Translation eines der nächsten (u)ORFs initiiert werden. Ist die Konzentration des ternären Komplexes hoch, findet die Reinitiation schneller und somit vor uORF4 statt. Wurde dieser translatiert erfolgt keine Reinitiation für *GCN4*. Ist die Konzentration jedoch niedrig, wandert ein Teil der 40S ribosomalen Untereinheiten in der Zeit bis zum Binden eines ternären Komplexes hinter uORF4 und *GCN4* kann translatiert werden [Abastado *et al.* 1991; Hinnebusch 2000]. Schon kleine Änderungen der eIF2 Aktivität können zu einer veränderten Translation der *GCN4*-mRNA führen, auch wenn die Auswirkungen auf die globale Translation gering ausfallen. Ein entsprechender Mechanismus der Regulation ist auch bei dem Transkriptionsfaktor ATF4 (*activating transcription factor 4*) in Säugetieren zu finden. Auch er wird unter verschiedenen Stressbedingungen, u.a. ebenfalls Aminosäuremangel, dereprimiert. Seine mRNA enthält zwar eine andere Anordnung von uORFs, folgt aber dem gleichen Prinzip [Harding *et al.* 2000]. Ein weiterer interessanter Fall für die Regulation der Translation über einen uORF ist die mRNA von *CLN3* [Polymenis et

al. 1997]. Wie in den anderen Fällen auch, ist der uORF entscheidend für die regulierte Translation der mRNA und verantwortlich für eine Reduktion der Translationsrate. Jedoch erfolgt die Expression reziprok zu *GCN4*. Unter Bedingungen einer hohen Initiationsrate erfolgt eine verstärkte Expression. Unter Bedingungen reduzierter Translationsinitiation wird die Expression überdurchschnittlich stark beeinträchtigt. Der Grund für dieses Verhalten ist ein anderer Mechanismus der Kontrolle. Sie erfolgt nicht über die Reinitiation wie bei *GCN4* oder *ATF4* sondern über ein *leaky scanning*. Je höher dabei die Initiationsfrequenz, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Startcodon des uORFs übergangen und die Translation von *CLN3* initiiert wird. Auf diese Weise kann der Eintritt in den Zellzyklus der Translationsrate angepasst werden.

In *S. cerevisiae* existiert lediglich eine eIF2 $\alpha$ -Kinase, Gcn2. In Säugern hingegen gibt es vier verschiedene Kinasen, die auf unterschiedliche Stresssituationen reagieren können (PKR: doppelsträngige RNA  $\rightarrow$  Virusinfektion, PERK: *Unfolded Protein Response*, HRI: Häm-Mangel in Reticulozyten und GCN2: Aminosäuremangel; [Holcik *et al.* 2005; Proud 2005]). Da sie alle eIF2 $\alpha$  zum Ziel haben, führt ihre Aktivierung zu einer ähnlichen Reaktion in der Zelle, der sogenannten integrierten Stress Antwort (ISR für *integrated stress response* [Harding *et al.* 2003]). Es ist jedoch anzunehmen, dass die Kinasen, insbesondere PKR, weitere, unterschiedliche Ziele haben, so dass die Reaktion der Zelle, zusätzlich zur Inhibition der Translationsinitiation, den jeweiligen Gegebenheiten angepasst werden kann. In den meisten Fällen von Stress ist aber die Reduktion der Translation und deren Maschinerie, insbesondere auch der Ribosomen, ein wichtiges Ziel. In Anbetracht der großen Energiemenge, die für diesen Vorgang benötigt wird [Warner 1999; Rudra *et al.* 2004] ist dies eine gute Möglichkeit des Energiesparens in schlechten Zeiten. Von anderen Signalwegen, die einen regulatorischen Einfluss auf die Translationsinitiation haben können [Kleijn *et al.* 1998; Proud 2005; Zurita-Martinez *et al.* 2005], soll hier nur der TOR-Signalweg (engl. *target of rapamycin*) seine Erwähnung finden. Der Signalweg ist in die Steuerung einer Vielzahl zellulärer Prozesse in Abhängigkeit des Nährstoffangebots involviert. Dazu gehören Transkription, Stabilisierung von mRNAs, Mengenregulation von Nährstofftransportern, Autophagozytose, tRNA- und Ribosomenbiogenese sowie Translationsinitiation und Elongation [Schmelzle *et al.* 2000; Raught *et al.* 2001; Hay *et al.* 2004]. Namensgebend ist die zur Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) verwandte Kinase TOR. In höheren Eukaryonten existiert lediglich ein *TOR* Gen, wohingegen niedrigere Eukaryonten meist mit zwei *TOR* Genen ausgestattet sind (in Hefe *TOR1* und *TOR2* [Loewith *et al.* 2002]). Bei gutem Nährstoffangebot ist die Kinase aktiv und beeinflusst die 5'-Cap-abhängige

Translationsinitiation positiv. Zum einen fördert sie den Zusammenbau von eIF4F [Raught *et al.* 2001] und zum anderen wird die Kinase Gcn2 inhibiert und dadurch eine inhibitorische Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  verhindert. Nährstoffmangel hingegen führt zu einer Aktivierung der Kinase Gcn2 und zu einer Inhibierung der Translationsinitiation [Kubota *et al.* 2003]. Der Signalweg und dadurch die Translationsinitiation kann gezielt durch das Immunsuppressivum Rapamycin inhibiert werden. Rapamycin bindet dabei an FKBP12 (FK506 binding protein), das in Hefe von dem Gen für die Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase *FPR1* codiert wird. Der FKBP12-Rapamycin Komplex wiederum bindet und inhibiert Tor [Crespo *et al.* 2002]. Dieser Mechanismus ist konserviert von der Hefe bis zum Menschen.

### 3.5 D123

Die Regulation der Zellproliferation und der Zusammenhang von Wachstum und Teilung ist ein Feld starken Interesses. Die Suche nach darin involvierten Faktoren führte 1984 zu der Erzeugung einer Reihe temperatursensitiver Mutanten der Fibroblastenzelllinie 3Y1 aus Ratte. Diesen Mutanten, unter anderem der Mutante D123 (3Y1tsD123), war es bei restriktiver Temperatur nicht möglich, aus der Ruhephase in den Zellzyklus einzutreten [Ohno *et al.* 1984]. Proliferierende Zellen arretierten unter restriktiven Bedingungen innerhalb von 24 h in der G1-Phase des Zellzyklus. 3Y1-Zellen benötigen zur Proliferation serumreiches Medium. Sie sind sensitiv gegenüber der Inhibition des Wachstums durch hohe Zelldichten. Dichtearretierten Zellen war es auch nach 24 h bei restriktiver Temperatur durch Serumstimulation noch möglich, den Eintritt in den Zellzyklus, d.h. die Replikation der DNA zu initiieren. Somit wurde der Arrestpunkt der D123-Mutante vor dem Arrest durch hohe Zelldichten eingeordnet [Ohno *et al.* 1984; Zaitzu *et al.* 1984]. Wurden die Kulturen jedoch 4 Tage bei restriktiver Temperatur inkubiert, war es nur noch einem Bruchteil der Zellen nach der Serumstimulation möglich, den Arrest zu verlassen. Im Gegensatz dazu gelang es durch die Infizierung mit SV40 Virus auch nach 4 Tagen bei restriktiver Temperatur, den Eintritt in den Zellzyklus zu induzieren [Zaitzu *et al.* 1985]. Die Autoren nahmen für die D123-Mutante demnach eine serumunabhängige Funktion nach der Mitose an, die notwendig für den Eintritt in die S-Phase ist. Erst 1996 wurde das komplementierende Gen kloniert und das zugehörige Protein D123 (ca. 44 kDa) von Okuda *et al.* beschrieben. Es konnte ein einziger Aminosäureaustausch in der Mutante identifiziert werden, der für den konditionalen Phänotyp verantwortlich war (Abb. 4.1) [Okuda *et al.* 1996]. Eine weiterführende Charakterisierung führte zu der Beschreibung einer Proteasom-vermittelten Instabilität des mutierten Proteins

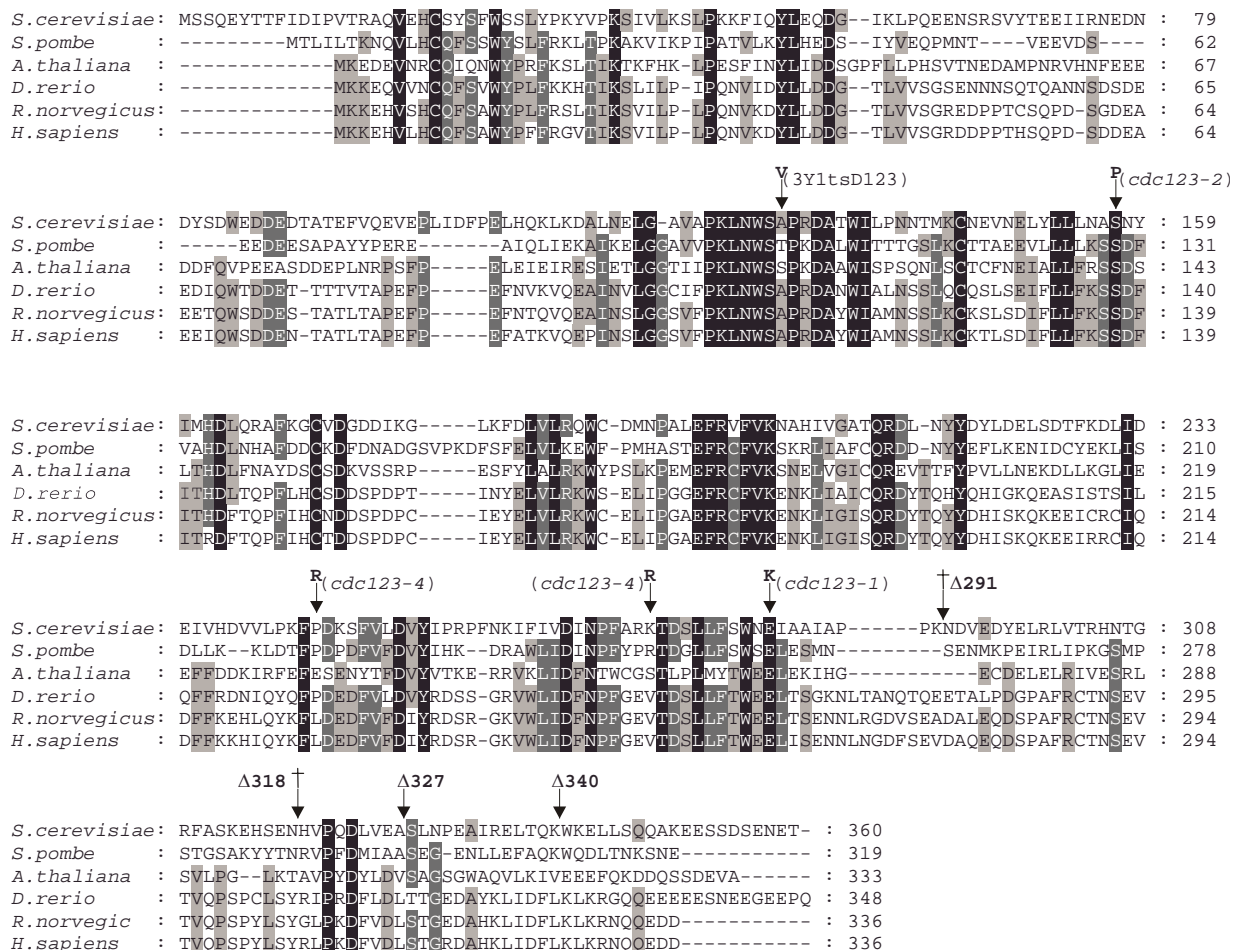


bei restriktiver Temperatur [Okuda *et al.* 1999; Okuda *et al.* 2001]. D123 wurde im Cytoplasma von Zellen verschiedener Gewebe, häufig mit einer granulären Verteilung und nicht im Zellkern lokalisiert. Die Menge der mRNA war über den Zellzyklus homogen [Onisto *et al.* 1998]. Die Proteinmengen blieben selbst bei einem Dichtearrest der Kulturen konstant. Dies führte zu dem Schluss, dass der Dichtearrest in der G1-Phase nicht durch die Regulation der D123-Proteinmenge zustande kommt [Okuda *et al.* 1996]. Erwähnung fand auch eine beobachtete Sequenzähnlichkeit zu einem bis dato unbekanntem Gen in *S. cerevisiae*, *CDC123*.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Cdc123 ist konserviert von der Hefe bis zum Menschen

Das Protein Cdc123 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein kleines Protein von 41,9 kDa bestehend aus 360 Aminosäuren und es ist hochkonserviert. Es findet sich in anderen Hefen wie der Spaltheefe, den Modellorganismen Ackerschmalwand und Zebrafisch sowie in der Maus, der Ratte und weiteren Eukaryonten bis hin zum Menschen. Der Sequenzvergleich mit ausgewählten Vertretern zeigt stark konservierte Aminosäurereste über die ganze Sequenz hinweg (Abb. 4.1). Der Vergleich mit hD123, dem humanen orthologen



- Identische Aminosäurereste in allen sechs Sequenzen
- fünf von sechs Aminosäureresten identisch
- vier von sechs Aminosäureresten identisch

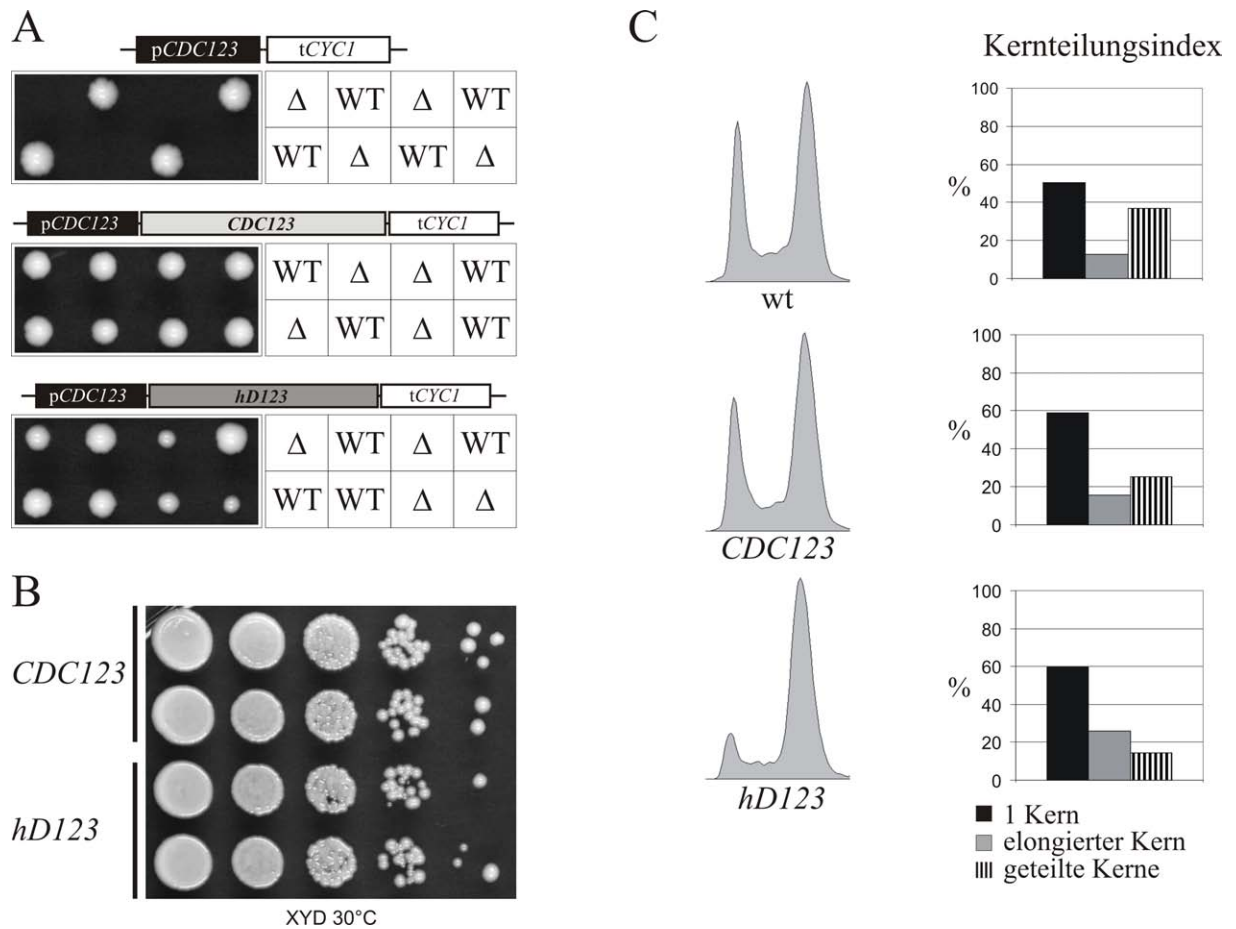
**Abbildung 4.1 Multipler Sequenzvergleich von Cdc123 mit orthologen Proteinen aus ausgewählten Organismen**

Mutierte Aminosäurereste verschiedener Allele bzw. hergestellte C-terminale Verkürzungen ( $\Delta$ xxx) von Cdc123 sind jeweils über der Sequenz vermerkt.

Protein, zeigt immer noch 33 % identische und 52 % ähnliche Aminosäurereste. Es finden sich keinerlei bekannte Domänen, so dass vor einiger Zeit eine eigene Proteinfamilie bestehend aus 43 Mitgliedern definiert wurde (Pfam D123 PF07065).

## **4.2 Die humane *cDNA* von D123 kann eine Deletion von *CDC123* in Hefe komplementieren**

Ausgehend von der Beobachtung, dass eine große Ähnlichkeit auf Sequenzebene zwischen Cdc123 und hD123 besteht, stellte sich die Frage, ob die Proteine auch funktionell konserviert sind. Um dies zu beantworten, wurden zuerst Expressionsvektoren erstellt, die sowohl *CDC123* als auch die *cDNA* des humanen *D123* unter der Kontrolle des *CDC123*-Promotors exprimieren (pWS1377 und pWS1378). Als Quelle der humanen *cDNA* diente das von Hoja *et al.* erzeugte Plasmid pWS1261 [Hoja *et al.* 2000]. Die Plasmide pWS1377 und pWS1378 und der entsprechende Kontrollvektor (pWS1367) wurden in den Stamm W4745 (heterozygot diploid für die Deletion von *CDC123*) transformiert. Die Analyse der haploiden Nachkommen nach der Sporulation zeigte, dass hD123 in der Lage ist, das Fehlen von Cdc123 zu komplementieren (Abb. 4.2). Die Koloniegröße dieser Klone war bei der Tetradenanalyse leicht heterogen. Dieses leicht heterogene Erscheinungsbild wurde bei der anschließenden Untersuchung des Wachstums in Verdünnungsreihen auf Vollmedium erneut beobachtet. Allerdings bilden die mit hD123 komplementierten Klone nur unwesentlich langsamere Kolonien als Zellen mit Cdc123. Die detailliertere Untersuchung der Nachkommen aus den Tetraden zeigte, dass durch hD123 komplementierte Zellen einen höheren Anteil an Zellen mit 2C DNA-Gehalt aufweisen. Dieser Anteil ließ nach Bestimmung des Kernteilungsindex eine erhöhte Subpopulation an Zellen mit ungetrenntem, elongiertem Kern erkennen. Somit ist eine Verlangsamung der Mitose in den hD123-komplementierten Zellen anzunehmen.

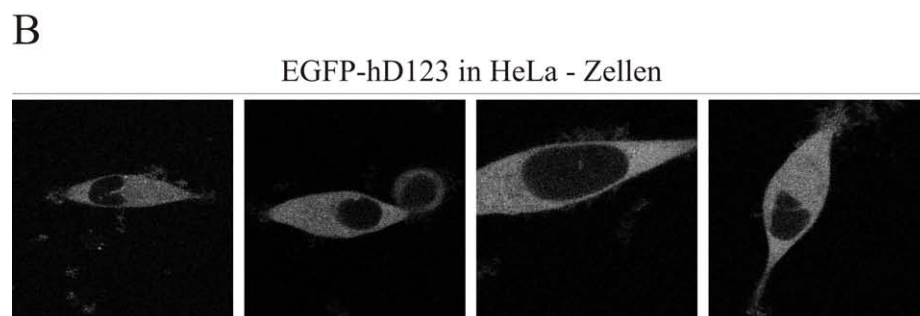
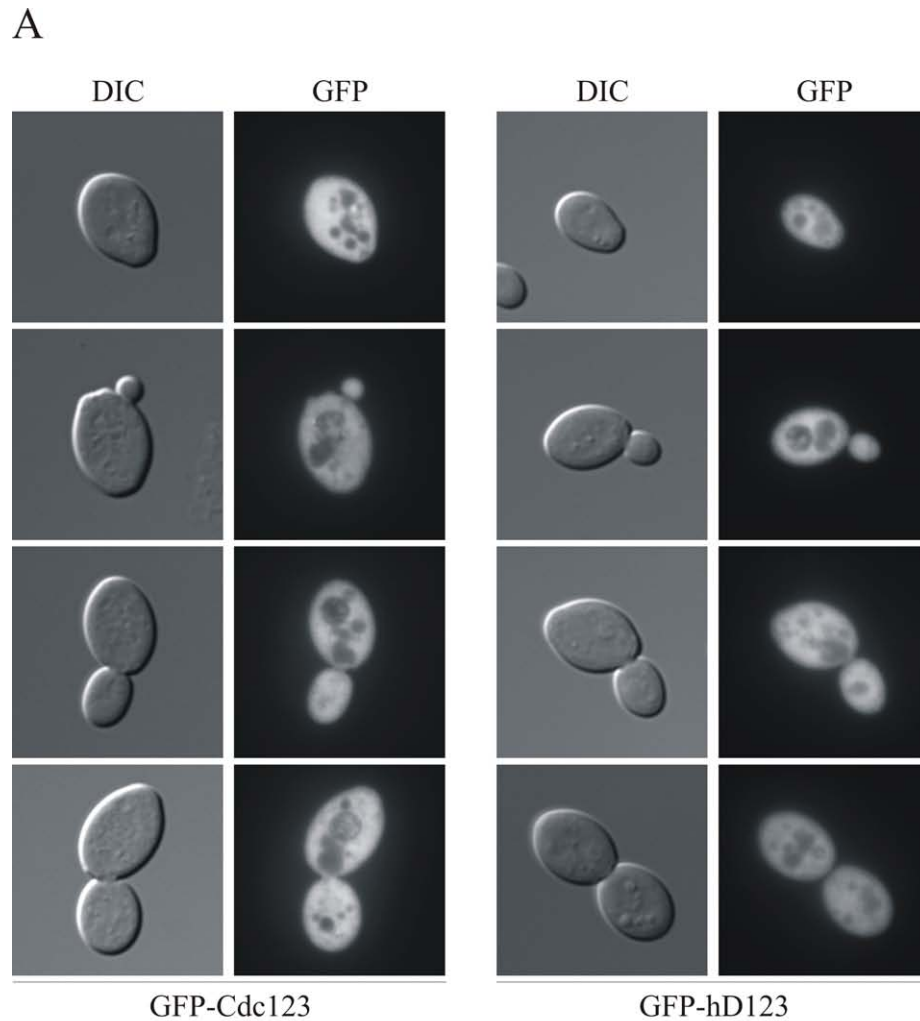


**Abbildung 4.2 Humane cDNA von *D123* ist in der Lage die Deletion von *CDC123* zu komplementieren**

Die Expression von hD123 von einem Vektor niedriger Kopienzahl vom *CDC123*-Promoter ist ausreichend, um *cdc123*-Deletionsmutanten Wachstum zu ermöglichen. **A)** Die Plasmide pWS1367 (p*CDC123*-*tCYC1*), pWS1377 (p*CDC123*-*hD123*-*tCYC1*) und pWS1378 (p*CDC123*-*CDC123*-*tCYC1*) wurden in den Stamm W4745 (*MATa/α CDC123/cdc123Δ::kanMX4*) transformiert. Die Tetradenanalyse zeigt, dass beide Plasmide (pWS1377 und pWS1378) Wachstum von vier haploiden Nachkommen ermöglichen. Das Kontrollplasmid pWS1367 hingegen bestätigt den essentiellen Charakter von *CDC123*, da nur Wiltyp-Nachkommen anwachsen können. **B)** Verdünnungsreihen von Nachkommen aus der Tetradenanalyse auf XYD Medium bei 30°C **C)** Durchflusszytometrie und Kernteilungsindex von Kulturen, gewachsen in XYD Medium bei 30°C. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

### 4.3 Cdc123 und hD123 lokalisieren im Cytoplasma

In dem nächsten Experiment sollte Cdc123 durch seine Lokalisierung weiter charakterisiert werden. Zum einen konnte durch indirekte Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass C-terminal epitopmarkierte Versionen von Cdc123 (Cdc123-Myc13 sowie Cdc123-HA3) im Cytoplasma lokalisieren [Nachtsheim 2002]. Zum anderen wurden sowohl *CDC123* als auch *hD123* mit N-terminal fusioniertem *GFP* als einziger Quelle für Cdc123 in diploiden Zellen expremiert. Wachstumstests mit diesen Stämmen zeigten, dass die GFP-Fusion sowohl des humanen als auch des Hefeproteins eine Deletion von *CDC123* vollständig ersetzen kann (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation dieser Fusionsproteine ist ebenfalls eindeutig cytoplasmatisch (Abb. 4.3A). Dieses Ergebnis wurde durch eine in der Zwischenzeit veröffentlichte systematische Studie zur Lokalisation des Hefeproteoms gestützt [Huh *et al.* 2003]. Bei dieser Arbeit wurde C-terminal GFP-markiertes Cdc123 ebenfalls im Cytoplasma lokalisierend gefunden. Zwei früher veröffentlichte Arbeiten sahen eine granuläre Verteilung von hD123 im Cytoplasma in histologischen Schnitten diverser Gewebe [Onisto *et al.* 1998] bzw. einer humanen Leberkarzinom-Zelllinie (PLC-Zellen) [Hoja *et al.* 2000]. Das in der Studie von Hoja erzeugte Plasmid diente als Quelle für die in dieser Arbeit verwendete cDNA von *D123* (pWS1261). Um das Ergebnis aus den PLC-Zellen zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen transient mit diesem Konstrukt transfiziert (Abb. 4.3B). Auch in diesem Experiment war eine homogene cytoplasmatische Lokalisation zu beobachten. Zusätzlich kann man in diesen Zellen deutlich erkennen, dass das Fusionsprotein (EGFP-D123) sich nicht im Kern befindet.

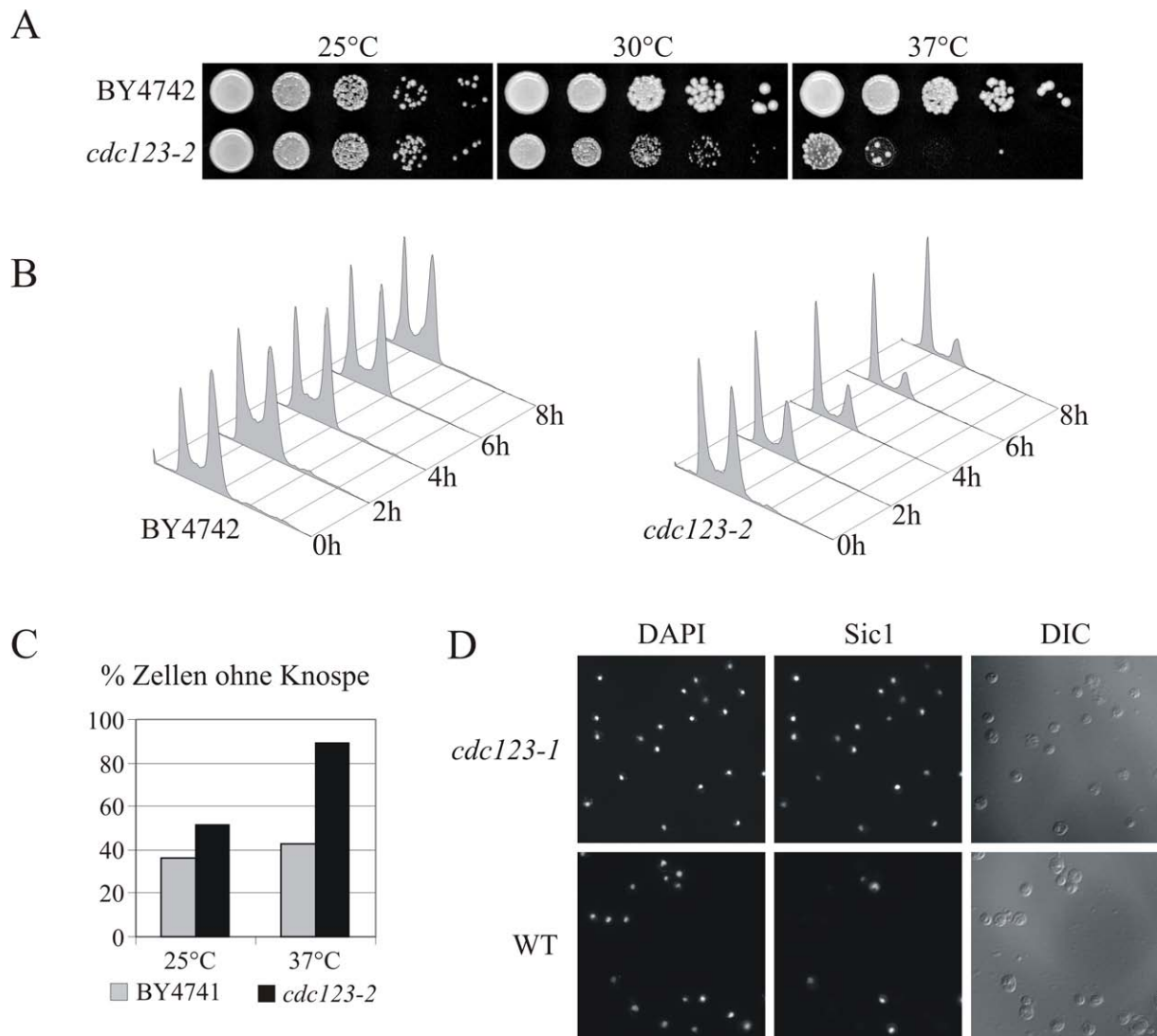


### Abbildung 4.3 Cdc123 und hD123 lokalisieren im Cytoplasma

A) Lokalisation von GFP-Cdc123 (W5454) bzw. GFP-hD123 (W5455) in Stämmen homozygot diploid für die Deletion von *CDC123*. Die GFP-Fusionsproteine sind somit die alleinige Quelle von Cdc123. Die Zellen wurden in XYGal Medium bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Wachstum der Stämme mit vom *GALI*-Promotor [Mumberg *et al.* 1994] überexprimiertem *GFP-CDC123* bzw. *GFP-hD123* entspricht dem von Wildtyp-Stämmen (Daten nicht gezeigt) B) EGFP-hD123 lokalisiert in HeLa-Zellen homogen im Cytoplasma. Die Zellen wurden transient mit pWS1261 transfiziert (in Zusammenarbeit mit M. Branschädel, Institut für Immunologie und Zellbiologie, Universität Stuttgart).

#### 4.4 Charakterisierung konditionaler *cdc123*-Mutanten

Im Rahmen einer Diplomarbeit [Nachtsheim 2002] konnten mittels ungerichteter PCR-Mutagenese temperatursensitive Allele von *CDC123* erzeugt werden. Es wurden drei verschiedene Allele hergestellt (*cdc123-1*, *cdc123-2* und *cdc123-4*), die sich, in teils unterschiedlich starker Ausprägung des Phänotyps, in allen durchgeführten Analysen gleich verhielten. Die Mutationen, die sich nach der Sequenzierung der DNA der drei Allele identifizieren ließen, sind in Abbildung 4.1 vermerkt. Das Wachstum der *cdc123-2* Mutante auf Vollmedium mit Glucose bei unterschiedlichen Temperaturen ist in Abbildung 4.4A gezeigt. Bei 25°C ist es leicht, bei 30°C stark beeinträchtigt. Bei 37°C sind die Zellen praktisch nicht mehr lebensfähig. Dabei treten Suppressor-Kolonien auf, die vermutlich darauf beruhen, dass das integrierte Konstrukt durch ein Rekombinationsereignis verloren und dabei eine Wildtyp-Kopie von *CDC123* zurückgelassen werden kann. Die Ermittlung des DNA-Gehalts mit Hilfe einer Durchflusszytometrie (Abb. 4.4B) zeigt einen leicht erhöhten Gehalt an Zellen mit einfachem DNA-Gehalt schon bei 25°C. Nach Temperaturerhöhung zu 37°C steigt dieser Anteil stark an bis zu einem fast vollständigen Arrest. Die Bestimmung des Knospungsindex (Abb. 4.4C) identifiziert diese Zellpopulation als große, runde Zellen ohne Knospe. An dem DNA-Profil fällt ebenfalls eine starke Abnahme von Zellen in der S-Phase auf (Abb. 4.4B). Um den Arrestpunkt der Zellen weiter zu charakterisieren, wurde überprüft, ob sie sich in einem Zustand mit expremiertem *SIC1* (*S-phase inhibitor of CDK*), also in der G1-Phase befinden. Sic1 ist ein Inhibitor von Cdc28-CyclinB-Komplexen, dessen Menge im Zellzyklus fluktuiert. Es ist von der späten M-Phase bis zum G1/S-Übergang vorhanden und verhindert die vorzeitige Replikation der DNA [Schwob *et al.* 1994]. Damit die CDK-Komplexe aktiviert werden können und der START am G1/S-Übergang überschritten werden kann, muss Sic1 degradiert werden [Verma *et al.* 2001]. Dieses Experiment (Abb. 4.4D) zeigte, dass alle Zellen ohne Knospe (nach 6 h bei 37°C in *cdc123-1* Mutanten mehr als 78,3 % verglichen zu 47,1 % im Kontrollstamm) ein Sic1-Signal aufweisen. Die Zellen arretieren also vor dem START Punkt in der G1-Phase. Auch der Befund, dass diese Zellen auf Paarungspheromon reagieren, sich paaren können (Daten nicht gezeigt) und Wachstum zeigen (siehe Abb. 4.5E) ordnet den Status der Zellen in G1 vor dem START Ereignis ein (siehe dazu [Reid *et al.* 1977; Reed 1980]).



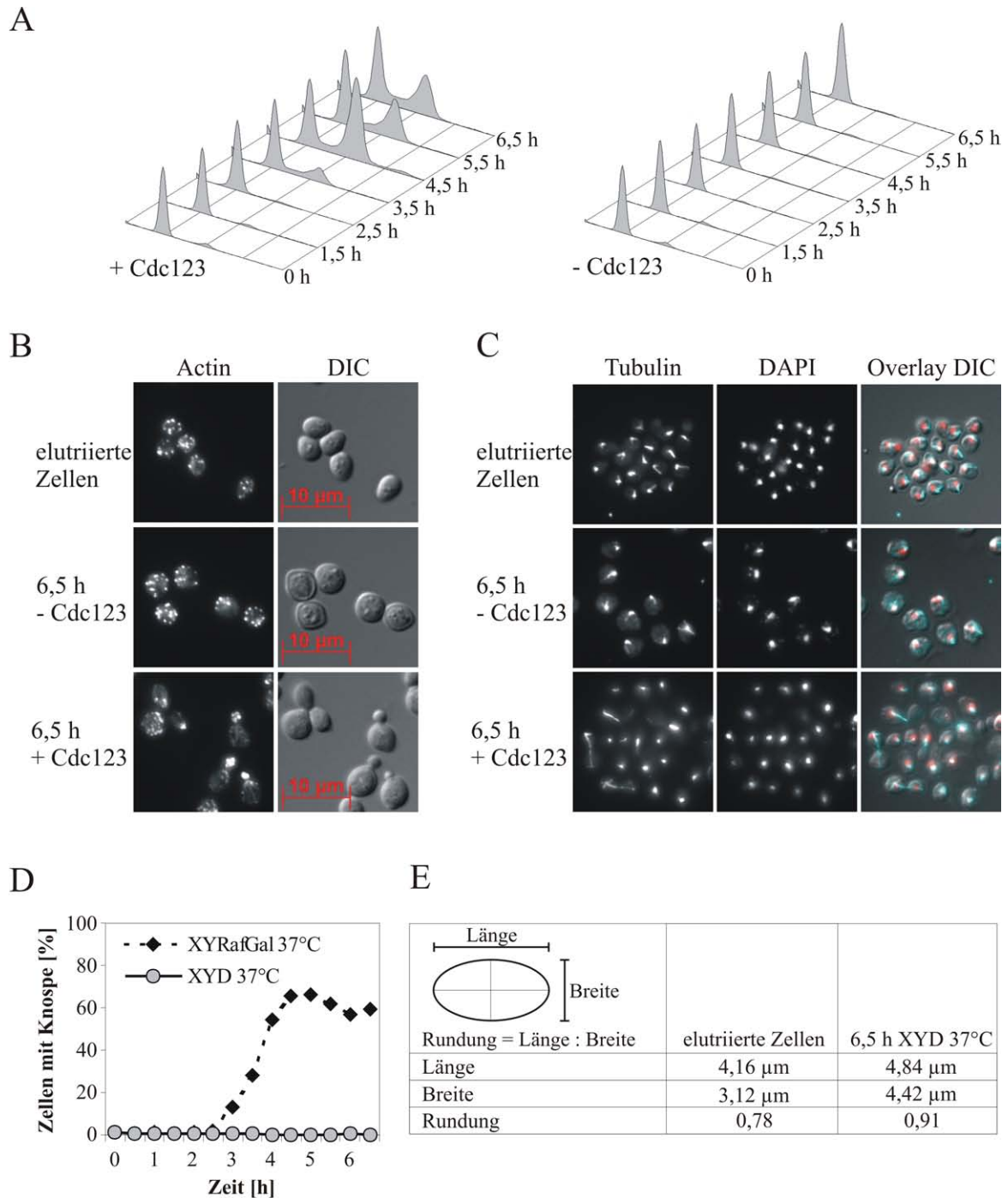
**Abbildung 4.4** Temperatursensitive Mutanten von Cdc123 akkumulieren bei restriktiver Temperatur Zellen in der G1-Phase mit hohen Mengen an Sic1

**A)** Verdünnungsreihen der Stämme BY4741 (WT) und W3440 (*cdc123::cdc123-2-HA3-URA3*) auf XYD Medium bei unterschiedlichen Temperaturen **B)** Durchflusszytometrie der Stämme BY4741 und W3440. Die Zellen wurden in XYD Medium bei 25°C bis zu einer  $OD_{600} < 1$  kultiviert. Nach Verdünnung der Kulturen auf  $OD_{600} = 0,1$  und Temperaturerhöhung zu 37°C wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Zellen für die Bestimmung des DNA-Gehalts Ethanol-fixiert. **C)** Knospungsindex der Stämme BY4741 und W3440 nach 0 h (25°C) und 8 h (37°C) bei 37°C. **D)** Die Stämme W4172.1 (*SIC1-MYC13-HIS3MX6*) und W4271 (*cdc123::cdc123-1-HA3-URA3 SIC1-MYC13-HIS3MX6*) wurden in XYD Medium bei 25°C kultiviert. Nach Temperaturerhöhung zu 37°C und weiteren 8 h Kultivierung wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert. Durch geeignete Verdünnung der Kulturen wurde sichergestellt, dass die  $OD_{600}$  nicht größer wurde als 1. Sic1 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit 9E10 Antikörper gegen die C-terminale Myc13-Epitopmarkierung und Alexa488 gekoppeltem Sekundärantikörper sichtbar gemacht.



## 4.5 Cdc123 ist essentiell für das Verlassen der G1-Phase

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cdc123 im Zellzyklus offensichtlich am meisten am G1/S-Übergang benötigt wird. Doch trotz der starken Akkumulation von Zellen in der G1-Phase verblieb in diesen Versuchen mit asynchronen Kulturen immer eine Zellpopulation mit 2C DNA-Gehalt und Knospen in unterschiedlichen Größen. Um technische Gründe, wie zum Beispiel eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine verbleibende Cdc123 Aktivität in den *ts*-Mutanten auszuschließen und zweifelsfrei zu klären, ob Cdc123 essentiell für das Verlassen der G1-Phase ist, wurden zwei Dinge unternommen. Zum Einen wurde ein Stamm hergestellt, der das *cdc123-1* Allel unter der Kontrolle des regulierbaren *GALL*-Promotors [Mumberg *et al.* 1994] als alleinige Quelle von Cdc123 im Genom integriert trägt. Somit ist Cdc123-1 durch Erhöhung der Temperatur inaktivierbar und seine Genexpression zudem durch Glucose reprimierbar. Zum Anderen wurden die Zellen nach der Inaktivierung von Cdc123-1 bei 37°C in XYD Medium mittels zentrifugaler Elutriation synchronisiert. Nun konnte, ausgehend von einer Kultur, die aus kleinen Tochterzellen ohne Knospe in der G1-Phase bestand, getestet werden, ob Zellen ohne Cdc123 in der Lage sind diese zu verlassen (Abb. 4.5). Wie man an dem DNA-Gehalt der Zellen erkennen kann (Abb. 4.5A), war es ihnen über den Versuchszeitraum von 6,5 h nicht möglich, in die S-Phase einzutreten und ihre DNA zu replizieren. Die Bestimmung des Knospungsindex (Abb. 4.5D) bestätigte zudem, dass Zellen ohne Cdc123 trotz messbarer Volumenzunahme (Abb. 4.5E) nicht in der Lage sind, Knospen auszubilden. In der Kontrollkultur mit induzierter *cdc123-1*-Expression war dies spätestens nach 3,5 h der Fall. Um den Zustand der Zellen detaillierter zu charakterisieren, wurde untersucht, ob das Actincytoskelett polarisiert wurde. Dies ist ein Indiz für das Verlassen der G1-Phase [Pruyne *et al.* 2000]. Die Färbung zeigte jedoch eine zufällige Verteilung von Actinflecken und –kabeln (Abb. 4.5B). Auch die durchgeführte indirekte Immunfluoreszenz, um Mikrotubuli sichtbar zu machen (Abb. 4.5C), zeigte eine für G1-Zellen typische Anordnung der Tubulinstrukturen. Zusammen mit den Ergebnissen aus 4.4 bestätigt dieses Experiment, dass Cdc123 essentiell für das Verlassen der G1-Phase ist.



**Abbildung 4.5 Cdc123 ist essentiell für das Verlassen der G1-Phase**

Der Stamm W4444 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*) wurde in XYGal Medium bei 25°C kultiviert. Anschließend wurde die *cdc123-1* Expression durch den Wechsel zu XYD Medium und 37°C für 6 h reprimiert, um danach die Zellen durch zentrifugale Elutriation zu synchronisieren. Anschließend wurden die Kulturen entweder in Vollmedium mit 2 % Galaktose (Induktion der *cdc123-1* Expression) oder Vollmedium mit 2 % Glucose (keine *cdc123-1* Expression) bei 37°C inkubiert und nach den angegebenen Zeitwerten Proben geerntet für die **A**) Durchflusszytometrie **B**) Actinfärbung mit Alexa488 gekoppeltem Phalloidin **C**) indirekte Immunfluoreszenz mit YOL1/34 Antikörper gegen Tubulin und anti-Ratte-Alexa488 Sekundärantikörper **D**) Bestimmung des Knospungsindex über den Zeitverlauf des Experiments **E**) Vermessung der Zellen nach der Elutriation und nach 6,5 h in XYD Medium bei 37°C (Mittelwerte von 34 unterschiedlichen Zellen).

## 4.6 SGA-Analyse: Suche nach Genen, die mit *CDC123* in Verbindung stehen

Bisher wurde Cdc123 lediglich als essentielles und konserviertes Protein identifiziert, dessen Fehlen in Zellen den Austritt aus der G1-Phase verhindert. Im Folgenden sollten nun Gene identifiziert werden, mit denen *CDC123* in Beziehung steht, um Hinweise auf dessen Funktion zu erhalten. Als Ansatz wurde die SGA (*synthetic genetic array*)-Analyse gewählt [Tong *et al.* 2001]. In *Saccharomyces cerevisiae* sind etwa 73 % der insgesamt rund 6000 Gene nicht essentiell [Giaever *et al.* 2002]. Im Rahmen eines internationalen Projekts (*Saccharomyces genome deletion project*) wurden bislang 95 % aller bekannten oder vorhergesagten offenen Leserahmen mit einer PCR-basierten Strategie deletiert [Winzeler *et al.* 1999]. Durch diese Sammlung stehen etwa 4700 lebensfähige haploide Einzeldelentionsmutanten zur Verfügung. Dieses Set an Stämmen kann für eine SGA-Analyse genutzt werden, um genetische Interaktionen zu identifizieren. Dabei zeigen zwei Gene eine synthetische genetische Interaktion, wenn die Kombination beider Mutationen zu einer Verstärkung der Effekte der jeweils einzelnen führt [Guarente 1993]. Häufig wird eine synthetische Interaktion zwischen zwei Genen beobachtet, wenn diese in unterschiedlichen Wegen zur Erfüllung einer zellulären Funktion beitragen. Defekte in einem Gen können so durch die Funktion des anderen Weges ausgeglichen werden. Ein Funktionsverlust beider führt zu einem beobachtbaren Phänotyp. Jedoch kann auch die Funktion beider Gene in ein und demselben biochemischen Weg zu einer synthetischen Interaktion führen [Hartman *et al.* 2001; Tong *et al.* 2004]. In beiden Fällen lassen sich Schlüsse über funktionelle Beziehungen zwischen den Genen ziehen. Bei den durchgeführten Analysen wurde zum einen nach Deletionen gesucht, die den Defekt des *cdc123-1* Allels supprimieren können. Zum anderen wurde nach synthetisch langsamem Wachstum bzw. synthetisch letalen Interaktionen mit den *cdc123*-Mutanten gesucht.

### 4.6.1 SGA-Analyse mit den Allelen *cdc123-1* und *cdc123ΔC*

Die Suche nach genetischen Wechselwirkungen von *CDC123* wurde mit den Stämmen W3439, der das konditionale Allel *cdc123-1* als einzige Quelle für Cdc123 unter der Kontrolle des endogenen Promotors trägt und W3129, der eine C-terminalen Verkürzung nach Aminosäure 327 anstelle des Wildtypgens vom endogenen Promotor expremiert, durchgeführt. Der Screen wurde jeweils einmal mit den ca. 4700 zur Verfügung stehenden Deletionsmutanten durchgeführt (in Zusammenarbeit mit M. Schwab aus der Arbeitsgruppe

um M. Tyers, Toronto). Es wurden 336 mögliche Kandidaten für eine synthetisch kranke oder letale Interaktion gefunden. Diese wurden anschließend nochmals einer SGA-Analyse in kleinem Maßstab unterzogen, um falsch Positive schon vor der Überprüfung in einer Tetradenanalyse auszuschließen. Zusätzlich zu W3439 und W3129 wurde der Stamm W3440, der das *cdc123-2* Allel anstelle des Wildtypgens vom endogenen Promotor expremiert, mit diesen Kandidaten gekreuzt. Nur wenn ein Kandidat mit mindestens zwei der Stämme einen Effekt zeigte wurde er einzeln mit W3129 und W3439 gekreuzt und einer Tetradenanalyse unterzogen. Es wurden teilweise weitere Mutanten anhand eines funktionalen Zusammenhangs mit in dem Screen gefundenen Kandidaten ausgewählt und einer Tetradenanalyse mit W3129 und W3439 unterzogen. Eine Liste aller 50 auf diese Weise identifizierten und bestätigten genetischen Interaktionen ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Auch bei schwächsten Wachstumsnachteilen war generell zu beobachten, dass die Effekte mit der *cdc123-1* Mutante stärker waren als mit der C-terminalen Verkürzung. Die Daten aller genetischen Interaktionen sind in Anhang 9.1 gezeigt. Die Liste der Kandidaten enthält Gene aus den unterschiedlichsten funktionalen Bereichen und Zellkompartimenten. So gibt es zum Beispiel eine Reihe mitochondrial lokalisierter Proteine (Dld2, Fmp36, Yjl131C, Ynl122C, Ypr125W, Ybl095W) [Huh *et al.* 2003; Sickmann *et al.* 2003], deren Gendelektionen teilweise sehr starke Wachstumsdefekte mit den *cdc123*-Mutanten zeigten. Eine weitere Gruppe von Genen erfüllt unterschiedlichste Funktionen während der Sekretion (*EMP24*, *SAC1*, *GGA1*, *SEC22*, *SSO1*, *SFT2*, *SFH1*). Die große Bandbreite an Genen, die synthetisch krank mit *cdc123*-Mutanten interagiert, deutet darauf hin, dass das Fehlen der Cdc123-Aktivität Auswirkungen auf die unterschiedlichsten zellulären Bereiche und Funktionen ausübt. Die weitaus interessanteste Gruppe an Genen lässt sich der Translationsinitiation zuordnen (*GCN3*, *TIF1*, *TIF2*, *TIF3*, *TIF4631*, *TIF4632*). Eine Liste einiger, an der Translationsinitiation beteiligten Faktoren ist im Anhang gezeigt (9.2). Mit Deletionen fast aller nicht-essentieller Faktoren, bis auf *HCRI1*, *FUN12* und *ANB1*, wurde ein synthetisch langsames Wachstum mit *cdc123*-Mutanten beobachtet. Tetradenanalysen mit der C-terminalen Verkürzung von Cdc123 sind in Abbildung 4.6 gezeigt. In der Durchflußzytometrie zeigten die Nachkommen einen leicht erhöhten Anteil an Zellen mit 1C DNA-Gehalt bei den *cdc123*-Mutanten. Dieser Phänotyp, der ausgeprägter auch schon mit dem *cdc123-1* Allel beobachtet wurde (Abb. 4.4), tritt in den Doppelmутanten verstärkt auf. Ebenso wurde dieser Effekt bei der Deletion von *TIF4631* alleine, die auch durch langsames Wachstum auffällt, beobachtet.

Besonders interessant ist die Gruppe der Translationinitiationsfaktoren auch deshalb, da von der Arbeitsgruppe um Mike Tyers [Ho *et al.* 2002] eine Interaktion von Cdc123 mit Gcd11, der  $\gamma$ -Untereinheit des trimeren Translationsinitiationskomplexes eIF2, nachgewiesen wurde. In dieser systematischen Interaktionsstudie wurden insgesamt 725 Flag-epitopmarkierte Proteine präzipitiert und copräzipitierende Proteinkomplexe mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Die Überexpression der entsprechenden Gene erfolgte dabei durch den Einsatz des *GALI*-Promotors.

**Tabelle 4.1 Liste der per Tetradenanalyse bestätigten genetischen Interaktionen mit *cdc123*-Mutanten**

Bilder und Auswertung der Tetraden sind in Anhang 9.1 gezeigt. Die Stärke des Effekts wurde nach der Auswertung der Tetraden mit den Stämmen W3129 und W3439 beurteilt. \*\*\*: starker Effekt, \*\*: mittlerer Effekt, \*: schwacher Effekt. Fettgedruckte Ziffern kennzeichnen Gene, die im ersten Durchgang des Screens mit allen verfügbaren Deletionsmutanten gefunden wurden. Die anderen Stämme wurden aufgrund eines funktionellen Zusammenhangs des deletierten Gens mit anderen Kandidaten zusätzlich ausgewählt und getestet.

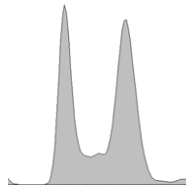
#	Systematischer Name	Standard Name	Stärke des Effekts	#	Systematischer Name	Standard Name	Stärke des Effekts
1	YNL166C	<i>BNI5</i>	*	<b>26</b>	YHR184W	<i>SSP1</i>	**
<b>2</b>	YKL092C	<i>BUD2</i>	*	27	YOR086C	<i>TCB1</i>	*
<b>3</b>	YBR036C	<i>CSG2</i>	***	<b>28</b>	YNL087W	<i>TCB2</i>	**
<b>4</b>	YDL178W	<i>DLD2</i>	***	29	YML072C	<i>TCB3</i>	*
<b>5</b>	YGL200C	<i>EMP24</i>	*	30	YKR059W	<i>TIF1</i>	**
<b>6</b>	YDR493W	<i>FMP36</i>	***	<b>31</b>	YJL138C	<i>TIF2</i>	**
<b>7</b>	YBR019C	<i>GAL10</i>	**	32	YPR163C	<i>TIF3</i>	*
<b>8</b>	YKR026C	<i>GCN3</i>	***	33	YGR162W	<i>TIF4631</i>	**
<b>9</b>	YDR358W	<i>GGA1</i>	**	34	YGL049C	<i>TIF4632</i>	*
<b>10</b>	YDR098C	<i>GRX3</i>	***	<b>35</b>	YJR066W	<i>TOR1</i>	*
11	YKL101W	<i>HSL1</i>	*	36	YEL040W	<i>UTR2</i>	*
<b>12</b>	YPL244C	<i>HUT1</i>	**	<b>37</b>	YOR083W	<i>WHI5</i>	*
13	YCL024W	<i>KCC4</i>	*	<b>38</b>	YAR029W	YAR029W	***
14	YJL183W	<i>MNN11</i>	*	<b>39</b>	YBL095W	YBL095W	*
<b>15</b>	YEL062W	<i>NPR2</i>	*	<b>40</b>	YBR030W	YBR030W	***
<b>16</b>	YDR233C	<i>RTN1</i>	***	<b>41</b>	YCL022C	YCL022C	***
<b>17</b>	YDR139C	<i>RUB1</i>	*	<b>42</b>	YNL064C	<i>YDJ1</i>	***
<b>18</b>	YKL212W	<i>SAC1</i>	***	<b>43</b>	YIR003W	YIR003W	***
<b>19</b>	YLR180W	<i>SAM1</i>	*	<b>44</b>	YJL131C	YJL131C	***
<b>20</b>	YLR268W	<i>SEC22</i>	*	<b>45</b>	YLR241W	YLR241W	*
<b>21</b>	YKL091C	<i>SFH1</i>	*	<b>46</b>	YNL122C	YNL122C	**
<b>22</b>	YBL102W	<i>SFT2</i>	**	<b>47</b>	YNL155W	YNL155W	*
23	YLR079W	<i>SIC1</i>	**	<b>48</b>	YOR331C	YOR331C	**
<b>24</b>	YDR312W	<i>SSF2</i>	**	<b>49</b>	YPL261C	YPL261C	**
<b>25</b>	YPL232W	<i>SSO1</i>	**	<b>50</b>	YPR125W	YPR125W	***

W3129 x *tif1Δ::kanMX4*

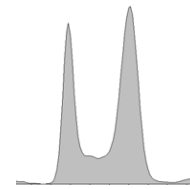
NPD T NPD T

	D	Δ	D	C
	WT	C	D	WT
	D	WT	WT	Δ
	WT	D	WT	D

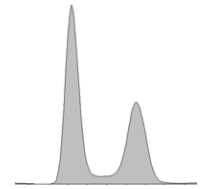
*cdc123Δ327*  
(C)



Einzelmutante  
(Δ)



Doppelmutante  
(D)

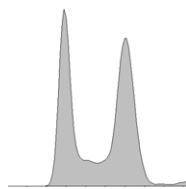


W3129 x *tif2Δ::kanMX4*

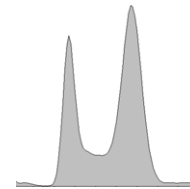
T T NPD NPD

	WT	C	WT	WT
	C	WT	D	D
	D	D	WT	D
	Δ	Δ	D	WT

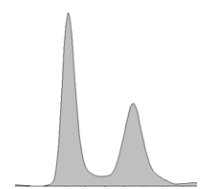
*cdc123Δ327*  
(C)



Einzelmutante  
(Δ)



Doppelmutante  
(D)

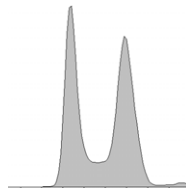


W3129 x *tif3Δ::kanMX4*

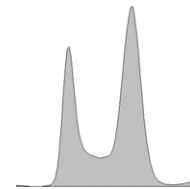
T T NPD PD

	D	D	WT	C
	WT	Δ	D	Δ
	Δ	C	WT	Δ
	C	WT	D	C

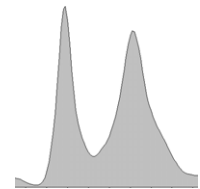
*cdc123Δ327*  
(C)



Einzelmutante  
(Δ)



Doppelmutante  
(D)

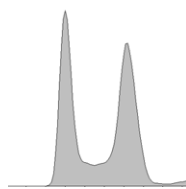


W3129 x *tif4631Δ::kanMX4*

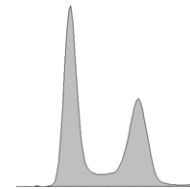
T T T PD

	WT	Δ	C	C
	D	WT	WT	C
	Δ	C	D	Δ
	C	D	Δ	Δ

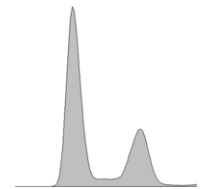
*cdc123Δ327*  
(C)

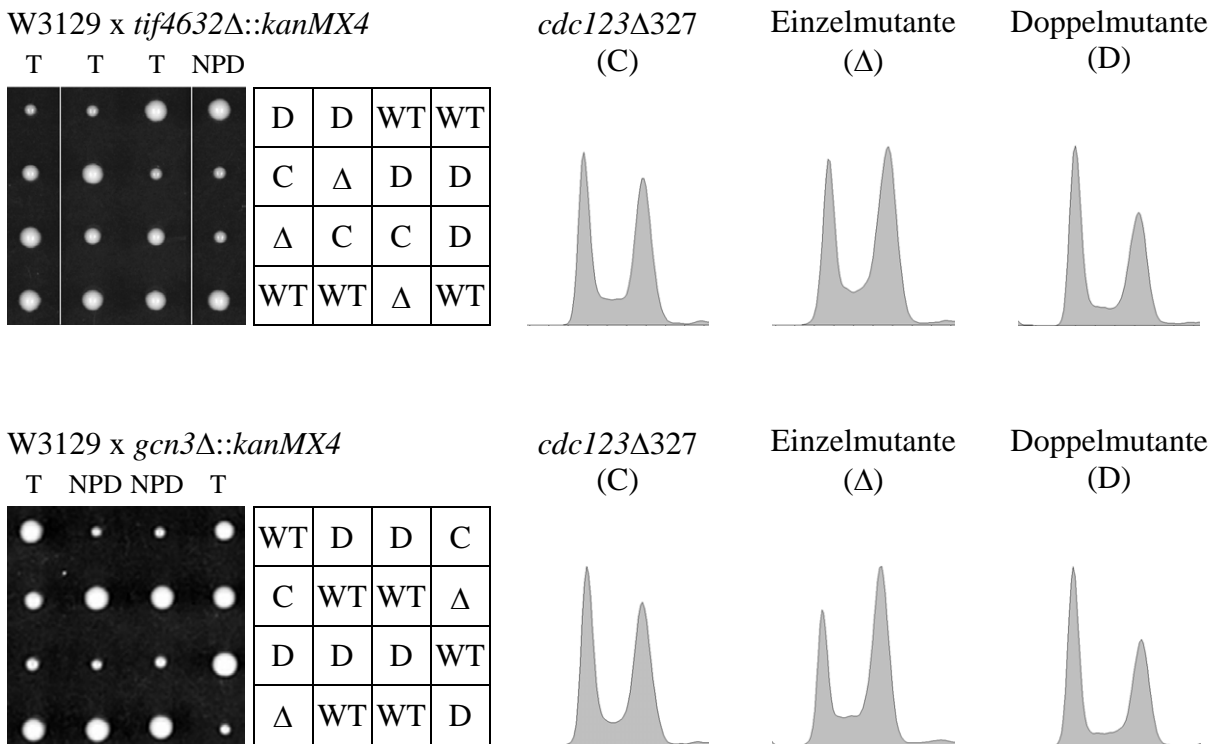


Einzelmutante  
(Δ)



Doppelmutante  
(D)





**Abbildung 4.6 Genetische Interaktionen von *cdc123Δ327-HA3* mit nicht essentiellen Translationsinitiationsfaktoren**

Einzeldeletionsmutanten aus der Euroscarf-Kollektion (S288C, *MATa*) wurden mit dem Stamm W3129 (*cdc123Δ327-HA3-natMX4*) gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht. Die Tetraden wuchsen zwei Tage auf XYD Medium bei 30°C. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt: WT (Wildtyp-Nachkommen), C (*cdc123Δ327-HA3*), Δ (Deletionsmutante der Euroscarf-Kollektion), D (Doppelmutante, C und Δ). Die genetischen Verteilungsmuster sind wie folgt bezeichnet: T Tetratyp, PD parentaler Dityp, NPD nicht-parentaler Dityp. Nachkommen der Tetraden wurden anschließend in XYD Medium bei 30°C kultiviert und bei einer  $OD_{600} < 1$  für die Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflußzytometrie geerntet.

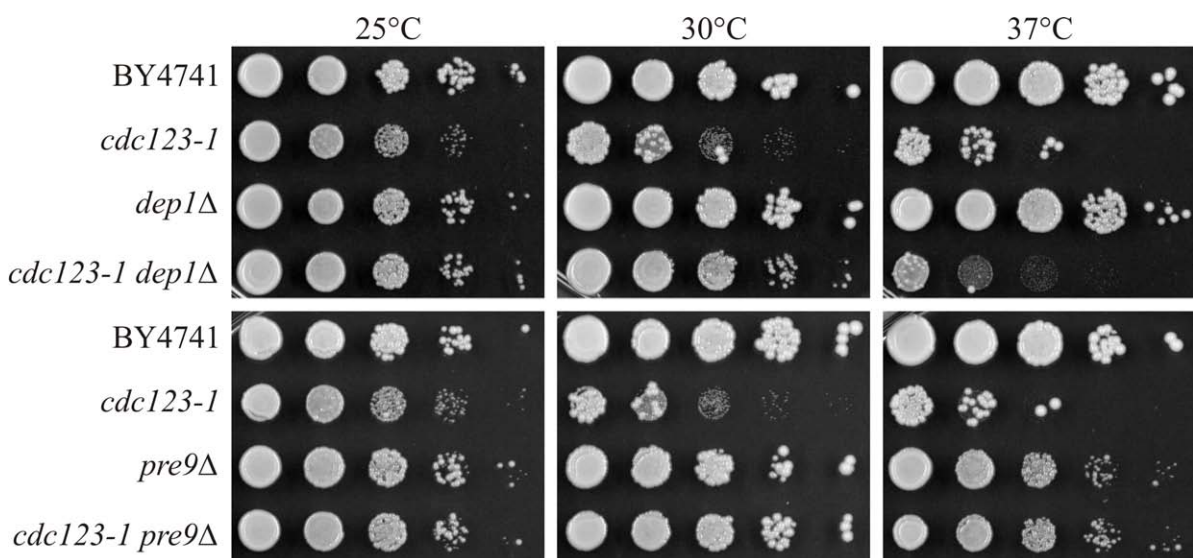
#### 4.6.2 Suche nach Suppressoren von *cdc123-1* mit Hilfe der SGA-Analyse

Neben der Identifizierung von synthetisch letal oder synthetisch krank Interaktionen lässt sich die SGA-Analyse auch für die Suche nach suppressierenden Gendeletionen verwenden. Hierzu wurden jeweils die auszuwertenden Selektionsplatten der SGA-Analyse mit dem temperatursensitiven Allel *cdc123-1* bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnten mögliche Kandidaten gefunden werden, die den Wachstumsdefekt von *cdc123-1* suppressieren können. Diese wurden wiederum einzeln mit dem Stamm W3439 gekreuzt und einer Tetradenanalyse unterzogen. Schlussendlich konnten zwei Gendeletionen identifiziert

werden, die das Wachstum von *cdc123-1* Mutanten verbessern können, *pre9Δ* und *dep1Δ* (Abb. 4.7).

*PRE9* codiert für die einzige nicht essentielle Untereinheit des 20S Proteasoms [Hochstrasser 1996]. Trotz der beobachteten Temperatursensitivität der *pre9Δ* Mutante, kann diese Deletion den Wachstumsdefekt der *cdc123-1* Mutante zu einem gewissen Grade suppremierieren.

Das Genprodukt von *DEP1* ist ein Modulator der Transkription [Lamping *et al.* 1994]. Seine beschriebenen Auswirkungen auf die Regulation der Transkription einer Vielzahl von Genen sowie 74 gefundene genetische Interaktionen [Tong *et al.* 2004] deuten auf äußerst pleiotrope Auswirkungen der Deletion von *DEP1* hin.



**Abbildung 4.7** *pre9Δ* und *dep1Δ* suppremierieren den Wachstumsdefekt von *cdc123-1*

Die Stämme BY4741 (WT), W3922 (*cdc123-1-HA3-URA3*), W5514 (*pre9Δ::kanMX4*), W3787 (*pre9Δ::kanMX4 cdc123-1-HA3-URA3*), W5515 (*dep1Δ::kanMX4*) und W3963 (*dep1Δ::kanMX4 cdc123-1-HA3-URA3*) wurden auf XYD Medium bei 25°C, 30°C und 37°C in Verdünnungsreihen gespottet. Das Wachstum wurde nach 2 Tagen (30°C und 37°C) bzw. 3 Tagen (25°C) dokumentiert.

#### 4.7 Cdc123 interagiert physisch mit Gcd11

Die bisher ermittelten Daten der genetischen Interaktionen sowie die von Ho *et al.* 2002 gefundene physische Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 deuteten auf eine enge Verbindung von Cdc123 und dem Prozess der Translationsinitiation hin. Diese Interaktionsdaten beruhen auf Versuchen mit *FLAG-GCD11* unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors. Mit Gcd11 in einem Komplex konnte in diesen Versuchen zum einen Cdc123 alleine und zum anderen



Cdc123 zusammen mit Gcd1, der  $\gamma$ -Untereinheit des GEF-Faktors eIF2B, identifiziert werden. Mit Hilfe von Coimmunpräzipitationen mit endogen epitopmarkierten Proteinen sollte nun diese Interaktionen überprüft und weiter getestet werden. Es wurde jeweils endogen am C-Terminus mit dem Myc13-Epitop markiertes Cdc123 präzipitiert und interagierende Proteine mit Hilfe eines C-terminalen HA3-Epitops nachgewiesen. Es wurden zwei Komponenten von eIF2 (Gcd11 und Sui2), zwei Untereinheiten des Nukleotidaustauschfaktors eIF2B (Gcd1 und Gcn3, die unabhängig voneinander in unterschiedlichen Subkomplexen an eIF2 binden können [Pavitt *et al.* 1998]), sowie ein Vertreter des Initiationsfaktors eIF3 (Nip1) getestet. Als Kontrolle wurden alle Interaktionen auch mit Gcd11-Myc13 überprüft (Abb. 4.8). Es konnte mit endogenen Proteinmengen gezeigt werden, dass Cdc123-Myc13 mit eIF2 (Gcd11-HA3 und Sui2-HA3) aber nicht mit Komponenten von eIF2B oder eIF3 interagiert. Mit Gcd11-Myc13 konnte in allen Fällen eine Interaktion nachgewiesen werden.

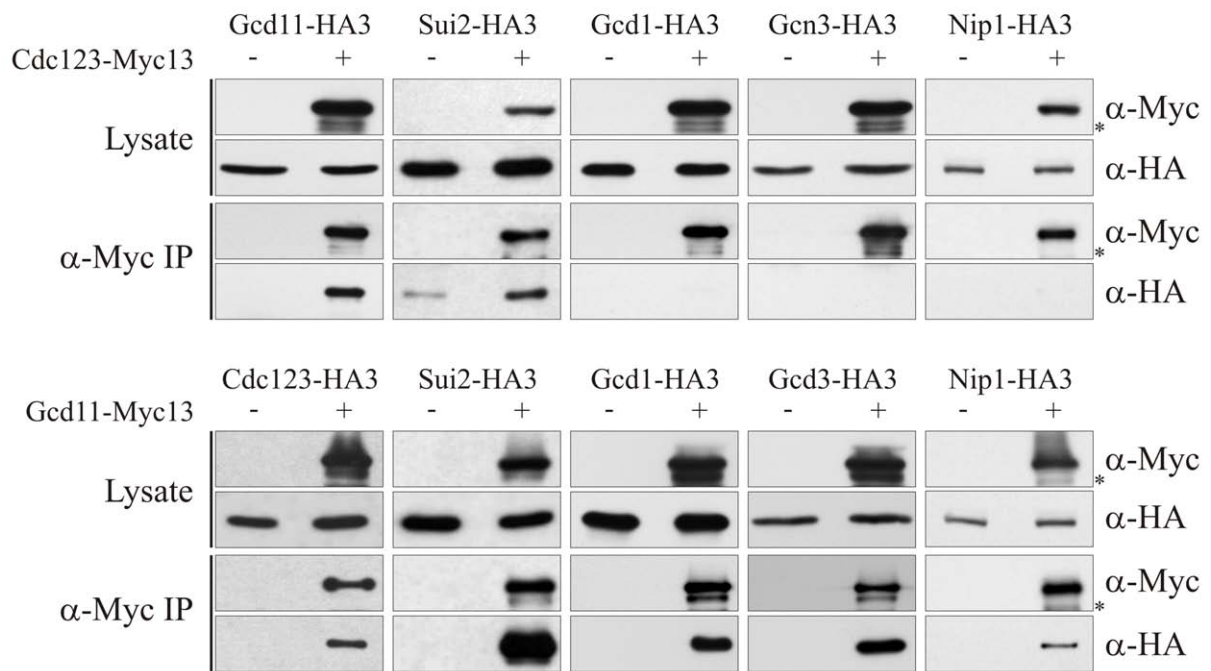
In den durchgeführten Versuchen war die Interaktion von Cdc123 mit Sui2 jeweils geringfügig schwächer als mit Gcd11. Dies legte die Vermutung nahe, dass Cdc123 direkt mit Gcd11 interagiert und die Verbindung zu Sui2 nur indirekt besteht. Dies konnte in den durchgeführten Zwei-Hybrid Analysen auch qualitativ bestätigt werden (Tabelle 4.2). Dma1 und Dma2 dienten dabei als Positiv-Kontrollen für eine Interaktion mit Cdc123 in einer Zwei-Hybrid Analyse [Uetz *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001].

**Tabelle 4.2 Cdc123 interagiert mit Gcd11 aber nicht mit Sui2 oder Sui3 in Zwei-Hybrid Interaktionsstudien**

AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne;

+: Interaktion nachweisbar; -: keine Interaktion nachweisbar; n.b.: nicht bestimmt

		pJG4-5 (AD)					
		CDC123	GCD11	SUI2	SUI3	DMA1	DMA2
pEG202 (BD)	CDC123	n.b.	+	-	-	+	+
	GCD11	-	n.b.	-	-	-	-
	SUI2	-	+	n.b.	-	n.b.	n.b.
	SUI3	-	+	-	n.b.	n.b.	n.b.
	DMA1	+	-	-	-	n.b.	-
	DMA2	+	-	-	-	-	n.b.

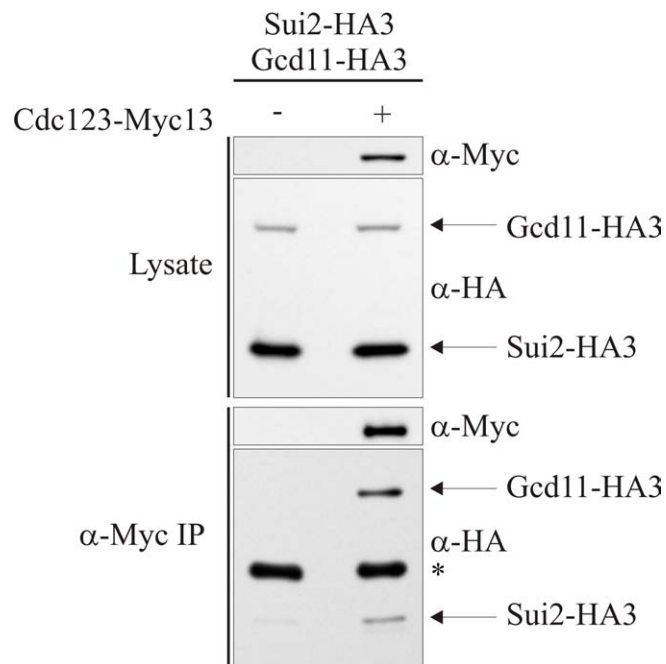


**Abbildung 4.8 Cdc123 interagiert mit Komponenten von eIF2 (Gcd11, Sui2) nicht aber mit eIF2B (Gcd1, Gcn3) oder eIF3 (Nip1)**

Die Stämme W4904 (*GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*), W4905 (*GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6*), W4906 (*GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6*), W5153 (*NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6*), W5293 (*SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6*), W5292 (*CDC123/CDC123-HA3-HIS3MX6*), W4896 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*), W5295 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6*), W4897 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6*), W4898 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6*), W5154 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6*), W5298 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/CDC123-HA3-HIS3MX6*), W4296 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6*), W4901 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6*), W4902 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6*) und W5155 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 9E10 Antikörper Cdc123-Myc13 bzw. Gcd11-Myc13 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurden Myc-epitopmarkierte Proteine mit 9E10, HA-epitopmarkierte Proteine mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen. (\* Degradationsbanden)

#### 4.8 Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 und Sui2

Sui2-HA3 schien sich in dem Experiment in Abbildung 4.8 weniger gut mit Cdc123-Myc13 präzipitieren zu lassen als Gcd11-HA3. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurden Stämme für eine Coimmunpräzipitation hergestellt, die sowohl Gcd11 als auch Sui2 C-terminal HA3-epitopmarkiert trugen. Auf diese Weise konnten die mit Cdc123-Myc13 copräzipitierenden Proteine gleichzeitig mit dem selben Antikörper nachgewiesen werden. Um eine Beeinträchtigung des Wachstums durch die Kombination der Epitopmarkierungen zu vermeiden, wurden heterozygot diploide Stämme verwendet. Wie sich zeigte, ließ sich tatsächlich deutlich mehr Gcd11-HA3 mit Cdc123-Myc13 präzipitieren, als Sui2-HA3 (Abb. 4.9). Unerwartet waren jedoch die unterschiedlichen Mengen von Sui2 und Gcd11 in diesem Experiment. Es ist nicht auszuschließen, dass die Epitopmarkierungen die Proteinmengen (vgl. 4.9) oder auch die Affinitäten der beteiligten Proteine untereinander beeinflussen.



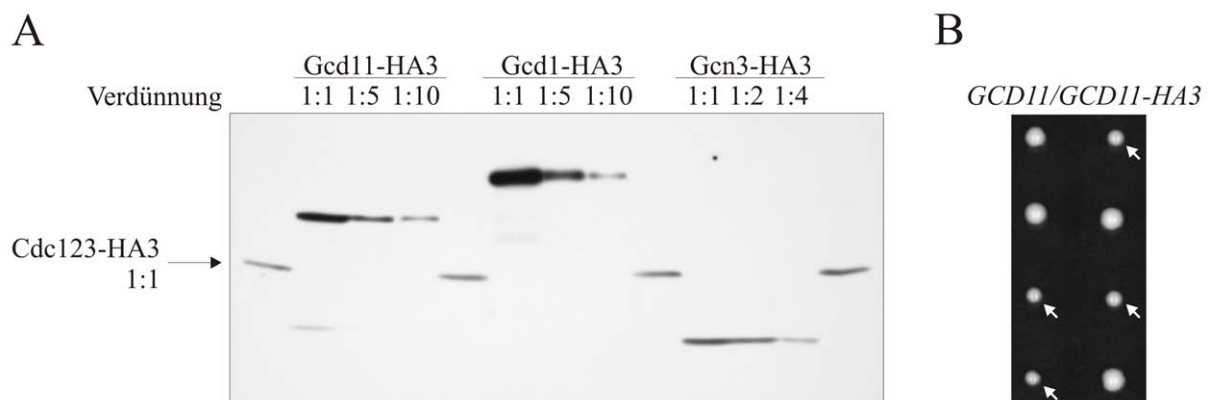
**Abbildung 4.9 Gleichzeitige Coimmunpräzipitation von Gcd11-HA3 und Sui2-HA3 mit Cdc123-Myc13**

Die Stämme W5370 (*SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*) und W5369 (*SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6 CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 9E10 Antikörper Cdc123-Myc13 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurde Cdc123-Myc13 mit 9E10, HA-epitopmarkierte Proteine mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen.

(\* schwere Kette des 9E10 Antikörpers)

## 4.9 Mengenabschätzung von Cdc123 im Vergleich zu Gcd11, Gcd1 und Gcn3

Um einen Eindruck davon zu bekommen, in welchem Mengenverhältnis Cdc123 im Vergleich zu seinem Interaktionspartner Gcd11 in der Zelle vorliegt, wurde eine grobe Abschätzung in einer Western-Blot-Analyse vorgenommen. Dazu wurden Stämme hergestellt, die entweder eine C-terminale HA3-Epitopmarkierung an Cdc123, Gcd11, Gcd1 oder Gcn3 trugen. Da der Nachweis der Proteine dadurch mit dem selben Antikörper geschah, sind die in der Zelle enthaltenen Proteinmengen direkt miteinander vergleichbar. Wie in den Kapiteln 7.5.1 und 7.5.5 beschrieben, wurde durch eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford und eine Ponceau-Färbung der Membran sichergestellt, dass äquivalente Proteinmengen auf das Gel geladen wurden. Wie man in Abbildung 4.10A erkennen kann, liegt Cdc123-HA3 in ungefähr zehnfach geringerer Menge vor als Gcd11-HA3 oder Gcd1-HA3. Das Verhältnis zu Gcn3-HA3 hingegen liegt bei ungefähr 1 : 1 bis 1 : 2. Der Vorteil der Vergleichbarkeit durch die Epitopmarkierung ist jedoch zu gleich ein Schwachpunkt dieser Abschätzung. So beeinträchtigt die HA3-Epitopmarkierung offensichtlich die Funktion von



**Abbildung 4.10 Mengenvergleich von Cdc123, Gcd11, Gcd1 und Gcn3**

**A)** Die Stämme W4266 (*CDC123-HA3*), W4883 (*GCD11-HA3*), W4885 (*GCD1-HA3*) und W4889 (*GCN3-HA3*) wurden bei 30°C in XYD Medium kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und für die Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Die Lysate wurden in den angegebenen Verdünnungen aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit 12CA5 Antikörper. **B)** Tetradenanalyse des Stammes W4904 (*GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*) auf XYD Medium bei 30°C. *GCD11-HA3-HIS3MX6*.

Gcd11 und führt zu verlangsamtem Wachstum (Abb. 4.10B). Es ist nicht auszuschließen, dass es dadurch ebenfalls zu einer Beeinflussung der Proteinmenge von Gcd11 kommt (vgl. 4.8). Aufgrund systematischer Mengenabschätzungen [Ghaemmaghami *et al.* 2003] war ein Verhältnis von Gcd1 zu Gcd11 von 1 : 2 zu erwarten und nicht umgekehrt. Ebenso wurden in der Arbeit von Ghaemmaghami *et al.* die Mengen von Gcn3 und Gcd1 ungefähr gleich eingeschätzt. Von der Haar *et al.* hingegen gaben das Verhältnis von eIF2B zu eIF2 (Gcn3 zu Sui2 oder Sui3) mit ungefähr 1 : 10 an [von der Haar *et al.* 2002]. Für die HA-epitopmarkierten Proteine in dem durchgeführten Experiment ergibt sich für das Verhältnis von Gcd1 zu Gcn3 ein Wert von 1 : 5 – 1 : 10 (Abb. 4.10A). Auch wenn absolute Proteinmengen durch diese Methode nicht bestimmt werden können und eine Unsicherheit bezüglich der genauen Verhältnisse bleibt, lässt sich dennoch in Übereinstimmung mit Ghaemmaghami *et al.* sagen, dass Cdc123 gegenüber Gcd11 in substöchiometrischen Mengen vorliegt.

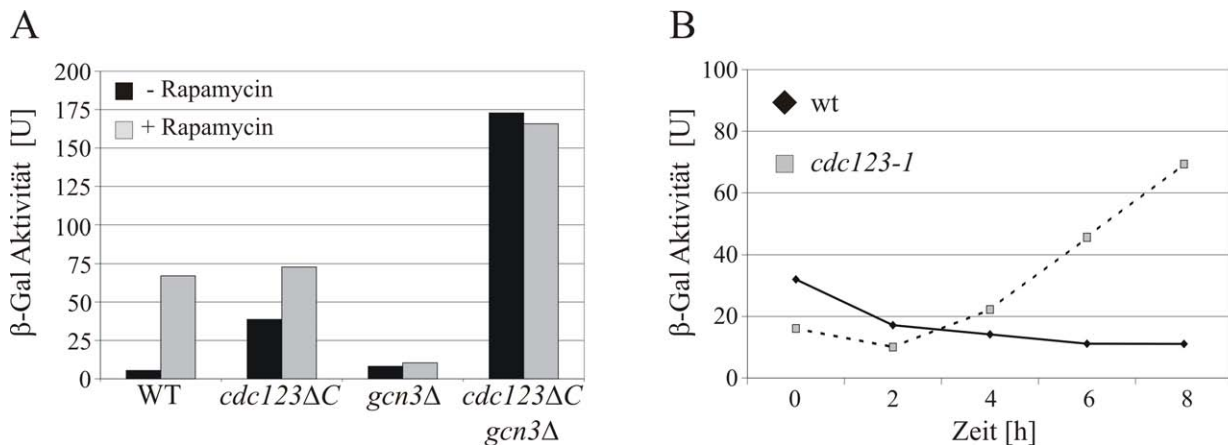
#### **4.10 *cdc123*-Mutanten zeigen Anzeichen eines Translationsinitiationsdefektes**

Die genetischen Interaktionen wie auch die Proteininteraktionsdaten legten eine enge Verbindung von Cdc123 zum Prozess der Translationsinitiation nahe. Es stellte sich die Frage, ob bei *cdc123*-Mutanten Anzeichen eines Defektes der Translationsinitiation gefunden werden können. Die beobachtete Akkumulation von Zellen in der G1-Phase der *cdc123-1* Mutanten bei erhöhter Temperatur könnte ein erster Hinweis darauf sein. So arretieren eIF4E Mutanten (*cdc33-1*) ebenso in der G1-Phase [Brenner *et al.* 1988] wie temperatursensitive *gcd1* und *gcd2* Mutanten in Zellen ohne *GCN3* [Harashima *et al.* 1987]. Zwei weitere Befunde werden im Allgemeinen als Hinweis auf einen Defekt in der Translationsinitiation oder deren Regulation gewertet. Dies ist zum einen ein sogenannter GCN (*general amino acid control non-derepressable*) oder GCD (*general amino acid control derepressed*) Phänotyp. Dies bedeutet eine nicht funktionierende Derepression der Translation des Transkriptionsfaktors Gcn4 bei Aminosäuremangel oder deren ständige Derepression ohne Mangelbedingungen [Hinnebusch 1997]. Zum anderen ist ein Defekt in der Translationsinitiation an einem veränderten Polysomenprofil zu erkennen. Dabei verschiebt sich das Verhältnis der Monosomen zu Polysomen (M/P) zu Gunsten der Monosomen. Dies geschieht, da sich 40S und 60S ribosomale Untereinheiten anhäufen, nachdem die Ribosomen nach vollendeter Proteinsynthese von der mRNA abfallen. Die Menge der 40S und 60S Untereinheiten übersteigt dann die Zahl der Initiationsfaktoren eIF3 und eIF6, die dafür verantwortlich sind eine verfrühte Interaktion der kleinen und großen ribosomalen

Untereinheit zu verhindern [Trachsel *et al.* 1979; Si *et al.* 1999], so dass sich unproduktive 80S Paare in Abwesenheit von mRNA bilden. Unter den gewählten Bedingungen bei der Zentrifugation eines mit Cycloheximid behandelten Zellextrakts (Inhibition der Translationselongation und somit auch von weiterem Abfallen der Ribosomen von der mRNA) durch einen Saccharose-Gradienten co-sedimentieren diese 80S Paare mit an mRNA gebundenen Monosomen. Im Gegensatz zu Initiationsmutanten stehen Mutanten der Translationselongation, die keine 80S Paare akkumulieren, so wie dies auch bei einer Behandlung mit Cycloheximid imitiert wird [Hartwell *et al.* 1969].

#### 4.10.1 *cdc123*-Mutanten zeigen einen GCD-Phänotyp

Um eine deregulierten Expression von Gcn4 zu überprüfen, wurde das Plasmid p180 verwendet [Hinnebusch 1985]. Dieses Konstrukt codiert für ein Gcn4-LacZ Fusionsprotein, dessen Translation unter der Kontrolle der vier kurzen uORFs [Mueller *et al.* 1988] der 5'-UTR von *GCN4* steht. Somit kann die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt und direkt auf die *GCN4*-Translation geschlossen werden. Mit Hilfe von Rapamycin kann die *GCN4* Expression gezielt dereprimiert werden. Die Behandlung mit Rapamycin resultiert unter anderem in der Aktivierung der Kinase Gcn2 [Kubota *et al.* 2003], die wiederum eIF2 $\alpha$  an Serin 51 phosphoryliert. eIF2-GDP mit phosphorylierter  $\alpha$ -Untereinheit ist dann anstelle eines Substrats für eIF2B, dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für eIF2, ein kompetitiver Inhibitor. Dies führt zu weniger aktivem eIF2-GTP und somit zu reduzierter Translationsinitiation im Allgemeinen und zur Derepression der Translation von *GCN4* im Besonderen. Es zeigte sich, dass die *cdc123* $\Delta$ 327-Mutante einen GCD Phänotyp aufweist (Abb. 4.11A). Sie hat eine erhöhte *GCN4*-Translation (36  $\beta$ -Galaktosidase Units (U)) gegenüber dem Wildtyp (4 U). Nach der Behandlung mit Rapamycin stieg der Wert jedoch auf ein ca. gleich hohes Niveau an (WT: 67 U, *cdc123* $\Delta$ C: 73 U). Der GCD Phänotyp von *cdc123* $\Delta$ C hängt nicht von *GCN3* ab. Die Translation von *GCN4* wird durch die *gcn3* $\Delta$  Mutation sogar deutlich verstärkt (173 U reprimiert, 166 U dereprimiert). Damit verhält sich Cdc123 genauso wie Gcd1 und Gcd2 [Harashima *et al.* 1987; Hannig *et al.* 1988], zwei Untereinheiten von eIF2B. Ebenso wie die C-terminale Verkürzung von Cdc123 führte auch die Inaktivierung des temperatursensitiven Allels *cdc123-1* unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors zu einem deutlichen GCD-Phänotyp, der über die Dauer des Experiments immer stärker wurde (Abb. 4.11B)



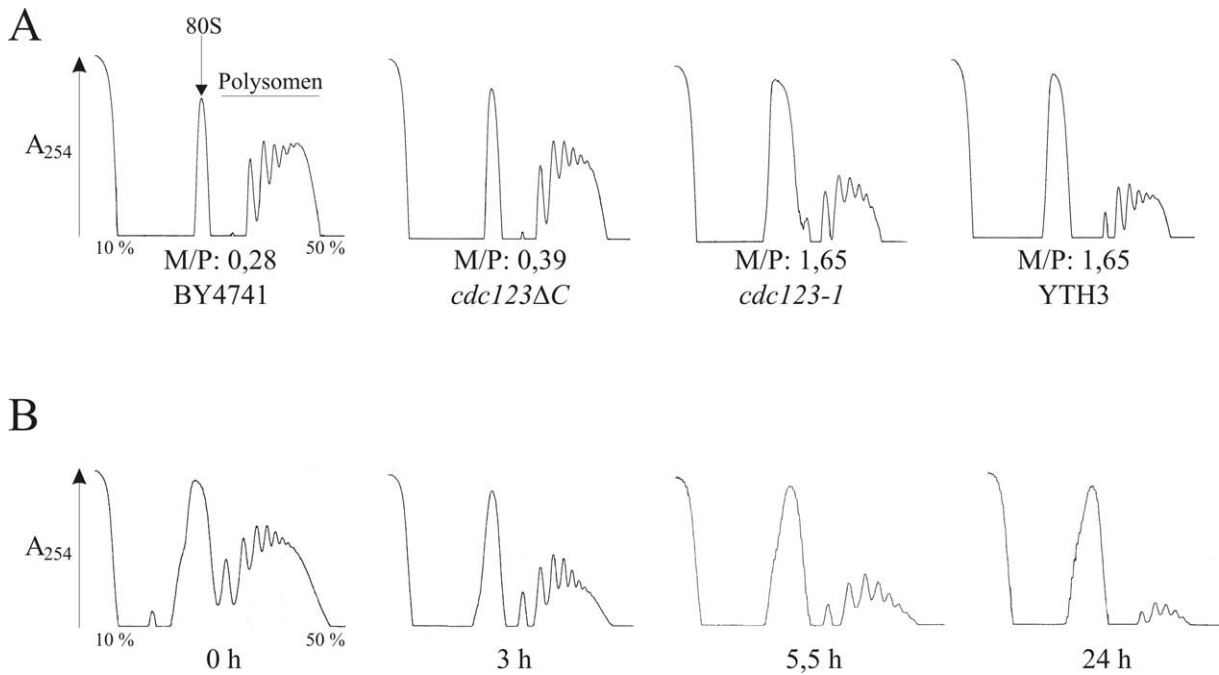
**Abbildung 4.11 *cdc123*-Mutanten zeigen eine Derepression der *GCN4*-Translation**

**A)** Der Stamm W4898 (*GCN3/gcn3Δ::kanMX4 CDC123/cdc123Δ327-HA3-natMX4* p180) wurde sporuliert und jeweils 3 unabhängige Nachkommen jeder Klasse (WT, *cdc123ΔC*, *gcn3Δ* und die Doppelmutante *cdc123ΔC gcn3Δ* jeweils mit p180) in SD Medium ohne Uracil bei 25°C kultiviert. Bei Erreichen einer  $OD_{600} \leq 1$  wurden die Kulturen geteilt und auf 0,2  $OD_{600}$  verdünnt. Jeweils einer Kultur wurden 200 ng/ml Rapamycin in DMSO zugegeben, der anderen nur DMSO. Nach 4 h Inkubation wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt. **B)** Der Stamm W4895 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pGALL-cdc123-1-HA3-LEU2* p180) wurde sporuliert und jeweils 3 unabhängige Nachkommen (WT bzw. *cdc123Δ::kanMX4 leu2::pGALL-cdc123-1-HA3-LEU2* jeweils mit p180) in SRafGal Medium ohne Uracil bei 25°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,2$  kultiviert. Die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität des 0-Wertes wurde bestimmt. Anschließend wurde den Kulturen 2 % Glucose zugegeben und bei 37°C inkubiert, um das Cdc123-1 zu inaktivieren und seine Genexpression zu reprimieren. Alle 2 h wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Bei Erreichen einer  $OD_{600} = 0,8$  wurde mit vorgewärmtem SRafGal + Glucose Medium ohne Uracil auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt.

#### 4.10.2 *cdc123*-Mutanten haben einen verringerten Anteil an Polysomen

Wie schon bei der *GCN4* Derepression, zeigte sich auch bei der Analyse des Polysomenprofils von *cdc123*-Mutanten der für eine reduzierte Translationsinitiation charakteristische Effekt (Abb. 4.12). Schon bei der C-terminalen Verkürzung *cdc123Δ327* ist ein leicht reduzierter Anteil an Polysomen zu beobachten (Abb. 4.12A). Das Monosomen-Polysomen-Verhältnis (M/P) ist von 0,28 (Wildtyp) auf 0,39 erhöht. Bei der *cdc123-1* Mutante nach Wachstum bei 30°C ist ein noch deutlicherer Verlust von Polysomen sichtbar (M/P: 1,65). Auch in diesem Versuch verhielten sich alle erzeugten ts-Allele von Cdc123 gleich. Der Verlust von Polysomen konnte ebenso bei der *cdc123-2* als auch bei der *cdc123-4* Mutante beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Je stärker die Beeinträchtigung von

Cdc123 ist, desto stärker ist auch der Verlust von Polysomen zu beobachten. Wie bei der *GCN4*-Expression (Abb. 4.11B), ist auch in der Polysomenanalyse des Stammes W4444 nach der Inaktivierung und Repression von *cdc123-1* eine, über die Zeit zunehmende Stärke des Effektes zu beobachten (Abb. 4.12B).



**Abbildung 4.12 *cdc123*-Mutanten zeigen einen Verlust an Polysomen**

**A)** Die Stämme BY4741 (WT), W3129 (*cdc123Δ327-HA3-natMX4*), W3439 (*cdc123-1-HA3-URA3*) und YTH3 (*CDC33(-182,1)::kanMX4-tTA-tetO<sub>7</sub>*) [von der Haar *et al.* 2002], Kontrolle für einen reduzierten Anteil an Polysomen) wurden in XYD Medium bei 25°C kultiviert, aus der exponentiellen Wachstumsphase auf eine  $OD_{600} = 0,1$  in XYD Medium verdünnt und anschließend 4 h bei 30°C inkubiert bevor die Polysomenprofile (10 – 50 % Saccharosegradienten) präpariert wurden. M/P : Verhältnis der Monosomen zu Polysomen. **B)** Der Stamm W4444 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*) wurde in XYRafGal Medium bei 25°C kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden Zellen für die Polysomenanalyse geerntet. Die Kultur wurde auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt, 2 % Glucose zugegeben und anschließend bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils Zellen für die Polysomenanalyse geerntet. Bei Erreichen von  $OD_{600} = 1$  wurde die Kultur mit vorgewärmtem XYD Medium verdünnt. Es wurden 10 – 50 % Saccharosegradienten verwendet.



## **4.11 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 findet frei von Ribosomen statt**

Durch die bisherigen Experimente konnte ein eindeutiger genetischer sowie funktioneller Zusammenhang mit dem Prozess der Translationsinitiation hergestellt werden. Es sollte nun durch weitere Proteininteraktionsstudien versucht werden, den Zeitpunkt bzw. Ort der Cdc123-Wirkung einzugrenzen. Da Cdc123 mit Gcd11 interagiert, nicht aber mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF2B, stellte sich die Frage, ob die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 stattfindet bevor oder nachdem der trimere Komplex eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> gebildet wird und an die kleine ribosomale Untereinheit bindet.

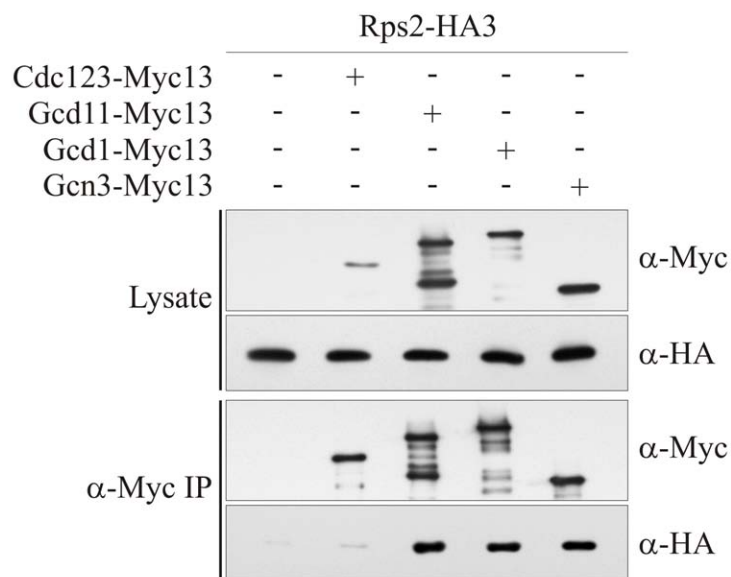
### **4.11.1 Cdc123 interagiert nicht mit Rps2**

Eine Strategie diese Frage zu klären war, eine Interaktion von Cdc123, vermittelt über Gcd11, mit der kleinen ribosomalen Untereinheit nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden C-terminal Myc13-epitopmarkierte Versionen von Cdc123, Gcd11, Gcd1 und Gcn3 präzipitiert. Der Nachweis einer Interaktion mit der 40S ribosomalen Untereinheit erfolgte über die Untereinheit Rps2, die C-terminal mit einem HA3-Epitop versehen war (Rps2-HA3) (Abb. 4.13). Im Gegensatz zu Gcd11, Gcd1 und Gcn3 konnte mit Cdc123 keine Interaktion mit Rps2 nachgewiesen werden.

### **4.11.2 Cdc123 interagiert mit Gcd11 im postribosomalen Überstand**

Der zweite Ansatz die Frage zu klären wann die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 stattfindet, war die Erzeugung postribosomaler Überstände. Hierzu wurden durch Ultrazentrifugation jegliche ribosomale Bestandteile pelletiert und zum einen die Lokalisation (Überstand bzw. Pellet) von Cdc123 und den Translationsinitiationsfaktoren eIF2 und eIF2B und zum anderen die Interaktion von Gcd11 mit Cdc123 im Überstand bzw. Pellet überprüft (Abb. 4.14). Es zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen sowohl die ribosomalen Bestandteile (ribosomale Proteine Rps2 und S8 der kleinen ribosomalen Untereinheit) im Pellet zu finden sind, als auch eIF2B (Gcd1 und Gcn3). Gcd11 verteilte sich annähernd gleich auf Überstand und Pellet. Cdc123 war zwar auch im Pellet zu finden, allerdings etwas weniger als im Überstand. Seine Interaktion mit Gcd11 hingegen fand fast ausschließlich im von Ribosomen geklärten Überstand statt (Abb. 4.14A). Die Interaktion von Gcd11 mit Rps2 sollte nur im Pellet möglich sein, da sich alle ribosomalen Bestandteile dort befinden müssten. Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung (Abb. 4.14B). Die Interaktion von Gcd11 mit eIF2B hingegen war sowohl im Pellet als auch im Überstand nachzuweisen, obwohl Gcd1-HA3 und Gcn3-HA3 selbst dort nur schwer nachweisbar waren (Abbildung 4.14C und

4.14D). Daraus folgt, dass die Interaktion von Cdc123 mit Gdc11 nicht in Gegenwart von Rps2, d.h. nicht im 43S Präinitiationskomplex, bestehend aus der 40S ribosomalen Untereinheit, dem trimeren Komplex eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und den Initiationsfaktoren eIF3, 1, 1A und 5, stattfindet.



**Abbildung 4.13 Cdc123 interagiert nicht mit der kleinen ribosomalen Untereinheit**

Die Stämme W4907 (*RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*), W4899 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*), W4903 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*), W4908 (*GCD1/GCD1-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*) und W4909 (*GCN3/GCN3-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 9E10 Antikörper Cdc123-Myc13, Gcd11-Myc13, Gcd1-Myc13 bzw. Gcn3-Myc13 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurden Myc-epitopmarkierte Proteine mit 9E10, HA-epitopmarkierte Proteine mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen.

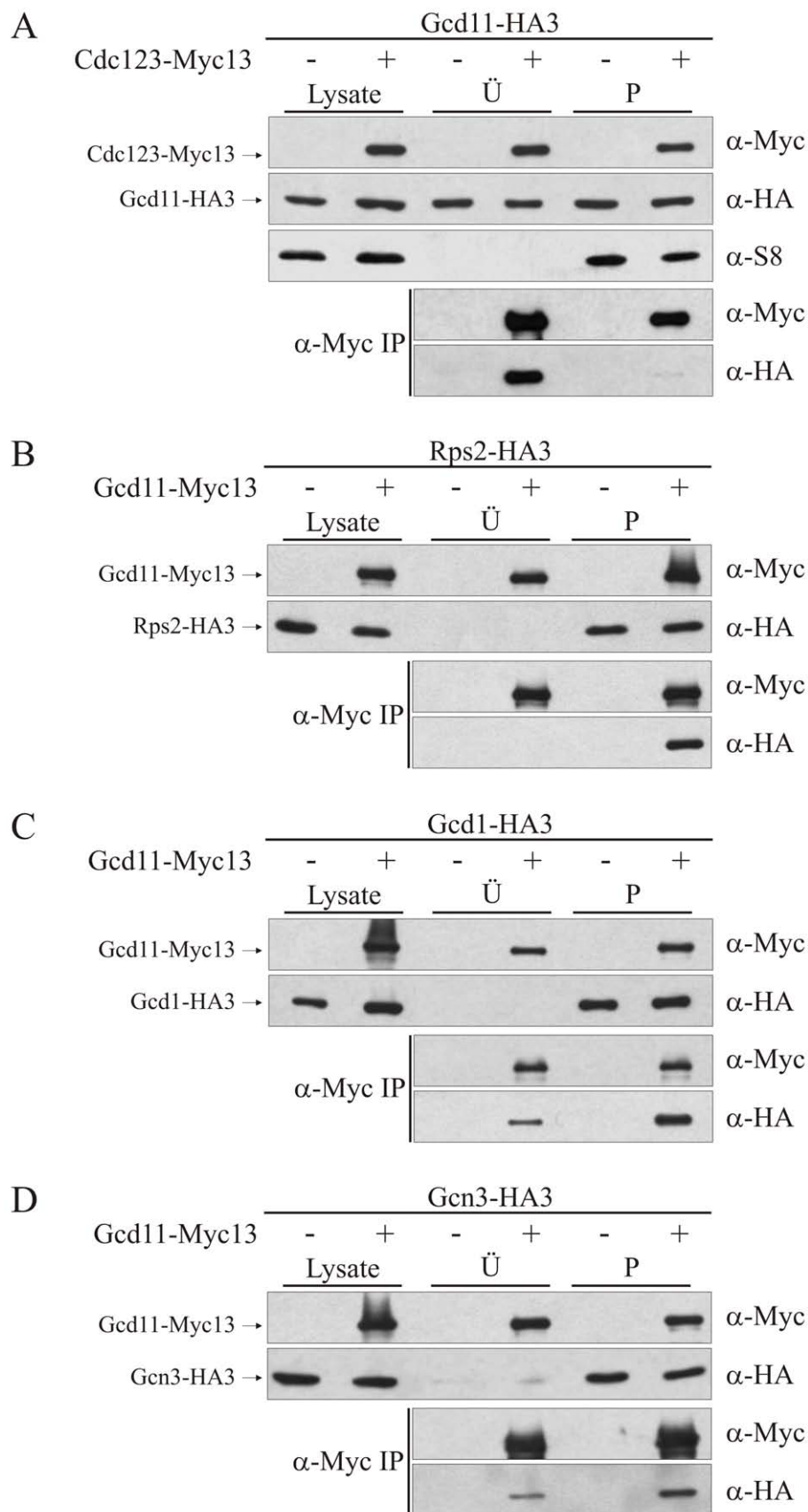


Abbildung 4.14 Cdc123 interagiert mit Gcd11 in einem von Ribosomen geklärten Überstand

#### Abbildung 4.14 Cdc123 interagiert mit Gcd11 in einem von Ribosomen geklärten Überstand

**Getestete Interaktionen:** A) Cdc123 mit Gcd11, B) Gcd11 mit Rps2, C) Gcd11 mit Gcd1, D) Gcd11 mit Gen3. Die Stämme W4904 (*GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*), W4907 (*RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*), W4905 (*GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6*), W4906 (*GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6*), W4896 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*), W4903 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*), W4901 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6*) und W4902 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Von den Lysaten wurden postribosomale Überstände und Pellets hergestellt. Aus diesen wurden die Myc-epitopmarkierten Proteine mit 9E10 Antikörper präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate erfolgte der Nachweis der Myc-epitopmarkierten Proteine mit 9E10, der HA-epitopmarkierten Proteine mit 12CA5-Antikörper und die des ribosomalen Proteins S8 mit polyklonalem Kaninchenserum. Ü: postribosomaler Überstand, P: Pellet

## 4.12 Fraktionierung von Polysomengradienten

Die Fraktionierung von Saccharosegradienten in Zusammenhang mit einer Polysomenanalyse ist eine verbreitete Technik, um Translationsinitiationsfaktoren verschiedenen Prozessen der Initiation zuordnen zu können. Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 findet in löslicher Form statt (Abb. 4.14). Da Cdc123 sich aber dennoch wie Gcd11 zu einem gewissen Teil abzentrifugieren lässt, stellt sich die Frage, ob dies als Teil der Translationsmaschinerie oder eines anderen hochmolekularen Komplexes geschieht. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde die Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in den Polysomengradienten untersucht (Abb. 4.15). Zunächst wurde eine Polysomenfraktionierung des Stammes W2841 in einem 10 – 50 % Saccharosegradienten durchgeführt (Abb. 4.15A). Dies führt zu der Auftrennung sowohl von 40S, 60S und 80S als auch den Polysomen. Als Kontrolle für die erfolgreiche Fraktionierung diente der Nachweis des ribosomalen Proteins S8. Man kann deutlich die Anreicherung des Proteins an der Stelle des (nicht sichtbaren) 40S und 80S Gipfels sowie in den Polysomen erkennen. Cdc123-HA3 und eIF2 $\gamma$  sind überwiegend im Bereich kleiner Proteine und Proteinkomplexe zu finden bis hin zu der 80S Fraktion. Wie für Gcd11 zu erwarten, ist es aber auch zu einem geringen Teil in den Polysomenfraktionen zu finden. Cdc123-HA3 wie auch Tubulin (Tub2) zieht sich ebenfalls zu einem geringen Anteil durch alle Fraktionen. Dies schloss eine gemeinsame Lokalisation von Cdc123 mit Gcd11 an den Translationsinitiationskomplexen im Gegensatz zu den Coimmunpräzipitationen nicht aus.

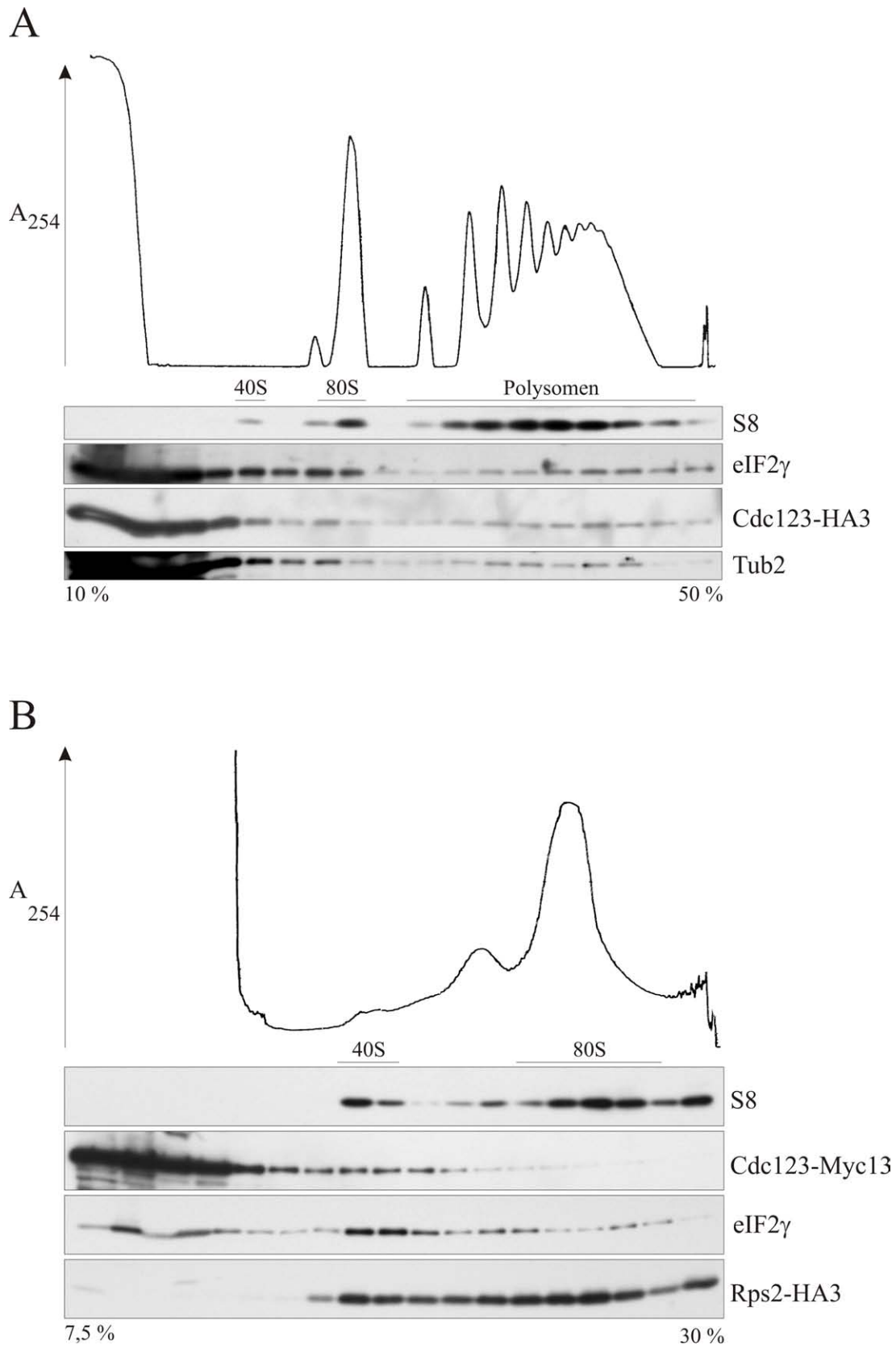


Abbildung 4.15 Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in Saccharosegradienten

**Abbildung 4.15 Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in Saccharosegradienten**

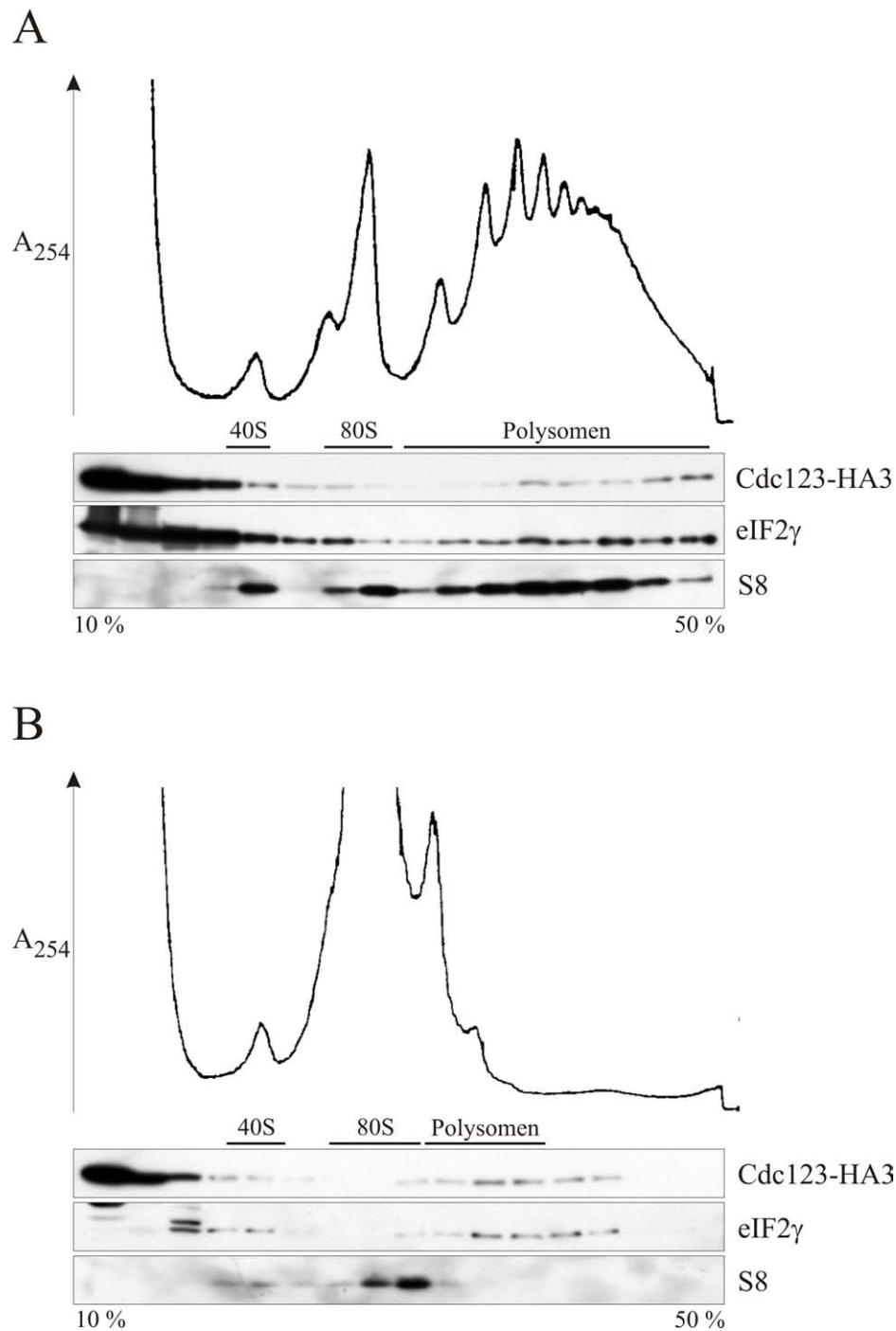
**A)** 10 – 50 % Saccharosegradient. Der Stamm W2841 (*CDC123-HA3-kanMX6*) wurde bei 25°C in XYD Medium kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden Zellen für die Polysomenanalyse geerntet.

**B)** 7,5 – 30 % Saccharosegradient. Der Stamm W4899 (*CDC123/CDC123-MYC13-kanMX4 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6*) wurde in XYD Medium bei 30°C kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden Zellen für die Polysomenanalyse geerntet.

eIF2 $\gamma$  wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum und Cdc123-Myc13 mit 9E10 Antikörper nachgewiesen. Tub2 und das ribosomale Protein S8 wurden ebenfalls mit polyklonalen Kaninchenseren, Rps2-HA3 mit 12CA5 Antikörper nachgewiesen. Die Position von 40S, 80S und den Polysomen ergibt sich aus dem Profil der Vermessung der Gradienten bei 254 nm und aus dem Nachweis des ribosomalen Proteine S8 bzw. Rps2 der 40S ribosomalen Untereinheit.

Die Auftrennung der Lysate in einem 7,5 % – 30 % Gradienten hingegen zeigten eine unterschiedliche Verteilung von Gcd11 und Cdc123 (Abb. 4.15B). In diesen Gradienten werden lediglich 40S, 60S und 80S Gipfel voneinander getrennt. Polysomen sind unter diesen Bedingungen bereits im Pellet zu finden. Für Gcd11 zeigte sich dabei die erwartete Anhäufung in den 40S Fraktionen. Cdc123-Myc13 war zwar auch in diesen und den anderen Fraktionen enthalten, zeigte aber keine deutliche Anhäufung zusammen mit Gcd11.

Eine weitere Möglichkeit die Assoziation mit Polysomen zu testen, ist deren bewusste Degradation durch eine RNase-Behandlung [Greenberg *et al.* 1998]. Hierbei bleiben zwar die Ribosomen an der RNA gebunden, jedoch wird diese in den zugänglichen Zwischenräumen abgebaut. In einem 10 – 50 % Saccharosegradienten ist danach im Idealfall nur noch ein 80S Gipfel zu erkennen. In den durchgeführten Versuchen (Abb. 4.16) zeigte sich in der Probe ohne RNase-Behandlung wieder die schon für Abbildung 4.15 beschriebene Verteilung von Gcd11 und Cdc123-HA3. Die Ergebnisse der RNase-behandelten Proben waren jedoch nicht eindeutig. Die Fraktionierung wie auch der Abbau der Polysomen hat, nach den Signalen von S8 und dem Profil bei der Wellenlänge 254 nm zu urteilen, gut funktioniert. Jedoch waren die Signale in der Western-Blot-Analyse viel schwächer und nur schwer nachweisbar. Auch die Wiederholung des Versuchs erbrachte keine Verbesserung. Auf welche Ursache dies zurückzuführen ist, ist unklar. Vernachlässigt man diesen Umstand und beurteilt die verbleibenden Signale von Gcd11 und Cdc123-HA3, legt dies eine hochmolekulare Struktur außerhalb der Polysomen nahe. In dieser könnten Gcd11 und Cdc123 gemeinsam lokalisiert sein.

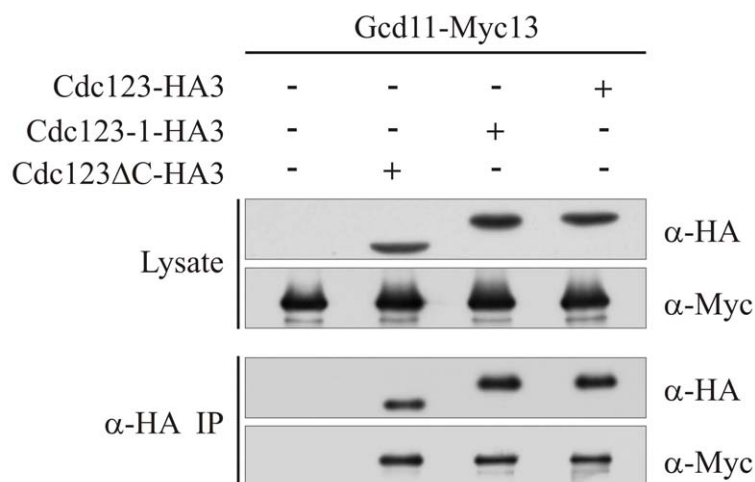


**Abbildung 4.16 Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in Saccharosegradienten mit und ohne RNase-Behandlung**

Der Stamm W2841 (*CDC123-HA3-kanMX6*) wurde in XYD Medium bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für die Polysomenanalyse geerntet. Vor der Beladung der Gradienten wurde das Lysat geteilt und entweder mit 0,3 mg/ml RNase oder ohne ½ h auf Eis inkubiert. **A)** 10 – 50 % Saccharosegradient ohne RNase-Behandlung **B)** 10 – 50 % Saccharosegradient mit RNase-Behandlung. Der Nachweis von Cdc123-HA3 erfolgte mit 12CA5 Antikörper, der von Gcd11 und des ribosomalen Proteins S8 mit polyklonalen Seren. Die Position von 40S, 80S und den Polysomen ergibt sich aus dem Profil der Vermessung der Gradienten bei 254 nm und aus dem Nachweis des ribosomalen Proteins S8 der 40S ribosomalen Untereinheit.

### 4.13 Cdc123-Mutanten können mit Gcd11 interagieren

Falls die Aufgabe, die Cdc123 in Zusammenhang mit Gcd11 erfüllt seine essentielle Funktion darstellt, dann wäre eine mögliche Erklärung für das beeinträchtigte Wachstum der Cdc123-Mutanten eine verringerte Interaktion mit Gcd11. Um dies zu klären, wurden heterozygot diploide Stämme hergestellt, die endogen Myc13-epitopmarkiertes Gcd11 sowie HA3-epitopmarkiertes Cdc123, Cdc123-1 oder die C-terminale Verkürzung nach Aminosäure 327 von Cdc123 enthielten. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation (Abb. 4.17) konnte gezeigt werden, dass beide Cdc123-Mutanten in gleichem Maße fähig sind, mit Gcd11 zu interagieren wie das Wildtypprotein.



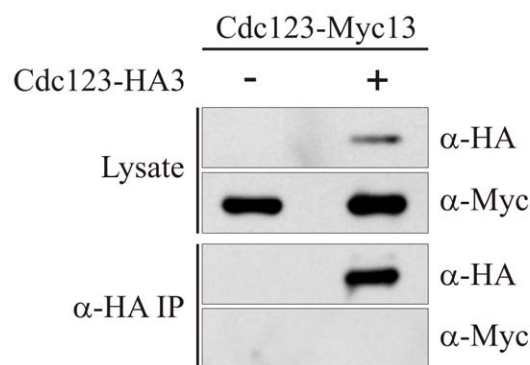
**Abbildung 4.17 Gcd11 interagiert gleichermaßen mit verschiedenen Cdc123-Mutanten**

Die Stämme W4467 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6*), W4469 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/cdc123Δ327-HA3-natMX4*), W4470 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/cdc123-1-HA3-URA3*) und W5298 (*GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/CDC123-HA3-HIS3MX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 12CA5 Antikörper Cdc123-HA3, Cdc123-1-HA3 und Cdc123Δ327-HA3 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurde Gcd11-Myc13 mit 9E10, HA-epitopmarkierte Proteine mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen.



#### 4.14 Cdc123 tritt als Monomer auf

Da die Interaktionen der Cdc123-Mutanten mit Gcd11 in heterozygot diploiden Stämmen durchgeführt wurde, bestand die Möglichkeit, dass diese Interaktion nur indirekt über das in der Zelle vorhandene Wildtyp Cdc123 stattfand. Wenn dies der Fall wäre, müsste ein Dimer bzw. Multimer von Cdc123 existieren und nachweisbar sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein Stamm hergestellt, der sowohl ein C-terminal Myc13-epitopmarkiertes als auch ein C-terminal HA3-epitopmarkiertes Cdc123 von dem jeweiligen manipulierten Gen expremierte. Wenn Cdc123 mit sich selbst interagieren würde, müsste es sich in der Immunpräzipitation copräzipitieren lassen. Da dies nicht der Fall war (Abb. 4.18), ist dies ein deutliches Indiz darauf, dass Cdc123 als Monomer auftritt und auch jeweils als Monomer an Gcd11 bindet. Dies schließt wiederum aus, dass die mutierten Versionen von Cdc123 nur indirekt an Gcd11 binden. Selbstverständlich verbleibt die Möglichkeit, dass Cdc123 ohne Epitopmarkierung doch multimerisieren kann bzw. die Möglichkeit anderer indirekter Interaktionen mit Gcd11.

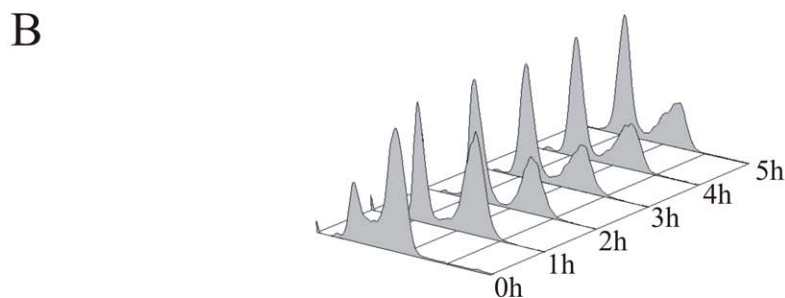
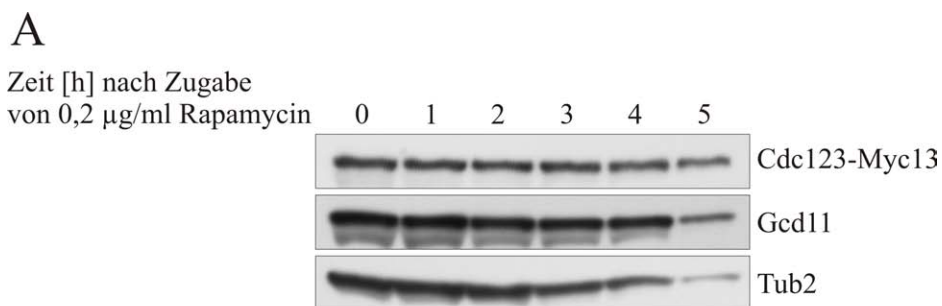


**Abbildung 4.18 Cdc123 tritt als Monomer auf**

Die Stämme W5116 (*CDC123/CDC123-MYC13-HIS3MX6*) und W5102 (*CDC123-MYC13-HIS3MX6/CDC123-HA3-kanMX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 12CA5 Antikörper Cdc123-HA3 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurde Cdc123-Myc13 mit 9E10, Cdc123-HA3 mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen.

### 4.15 Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 nach Rapamycinbehandlung

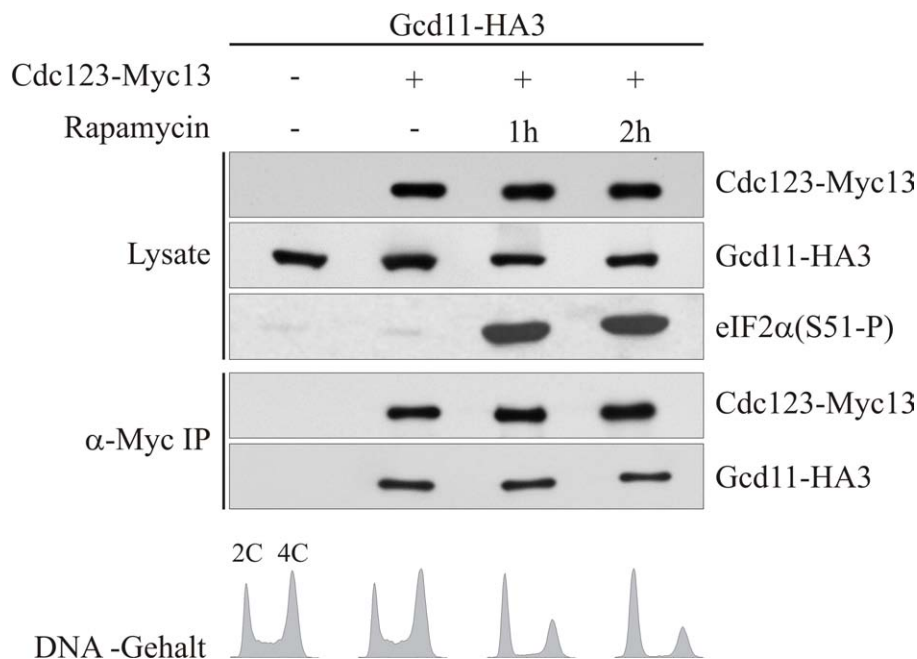
Es war von Interesse zelluläre Bedingungen zu finden, unter denen die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 verringert oder verstärkt wird. Eine leicht zu induzierende Veränderung von eIF2 stellt die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  an dem konservierten Serinrest 51 dar. Durch die Zugabe von Rapamycin zu einer Kultur lässt sich diese innerhalb weniger Minuten um ein Vielfaches erhöhen (siehe Abb. 4.23) [Kubota *et al.* 2003]. Zunächst wurden die Proteinmengen von Myc13-epitopmarkiertem Cdc123 und Gcd11 nach der Zugabe von 200 ng/ml Rapamycin untersucht (Abb. 4.19). Es zeigte sich, dass sowohl die Mengen von Cdc123-Myc13 als auch von Gcd11 über den experimentellen Zeitraum von 5 Stunden geringfügig abnehmen. Diese Ursache der Abnahme scheint aber, nicht zuletzt aufgrund ihrer Dauer und der ebenfalls abnehmenden Menge von Tubulin (Tub2), eine globale Proteinabnahme und keine spezifische Degradation zu sein. Die Messung des DNA-Gehalts in diesem Versuch diente der Kontrolle der Rapamycinwirkung. Man erkennt deutlich die Akkumulation von Zellen mit 1C DNA-Gehalt und eine Abnahme von Zellen zwischen 1C und 2C DNA-Gehalt (S-Phase).



**Abbildung 4.19 Proteinmengen von Gcd11 und Cdc123-Myc13 nach Behandlung mit Rapamycin**

Der Stamm W5077 (*CDC123-MYC13-HIS3MX6*) wurde bei 26°C in XYD Medium kultiviert. Bei Erreichen von OD<sub>600</sub> = 0,3 wurden Zellen für die Western-Blot-Analyse und die Durchflusszytometrie geerntet. Anschließend wurden 200 ng/ml Rapamycin zugegeben und die Zellen weiter bei 26°C inkubiert. Stündlich wurden Proben entnommen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit 9E10 Antikörper (Cdc123-Myc13) bzw. spezifischen Seren gegen Gcd11 und Tub2.

Für die eigentliche Fragestellung der Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 wurden erneut C-terminal epitopmarkierte Versionen der Proteine verwendet (Abb. 4.20). Die Kulturen der Stämme W4904 und W4896 wurden vor der Immunpräzipitation 1 und 2 h mit Rapamycin behandelt. Zur Kontrolle der Rapamycinwirkung wurde zum einen der DNA-Gehalt in der Durchflusszytometrie bestimmt und zum anderen direkt die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  mit einem phosphospezifischen Antiserum nachgewiesen. Wie man in Abbildung 4.20 erkennen kann, gab es weder einen Unterschied in der präzipitierten Menge von Cdc123-Myc13 noch in der copräzipitierten Menge von Gcd11-HA3 zwischen Rapamycin-behandelten und -unbehandelten Proben. Es wurde ebenfalls versucht direkt eine Interaktion von Cdc123-Myc13 mit phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  nachzuweisen. Dies gelang nicht (Daten nicht gezeigt). Entweder ist das auf den unsensitiven Nachweis mit dem phosphospezifischen Antiserum zurückzuführen, oder darauf, dass diese Interaktion tatsächlich nicht stattfindet.

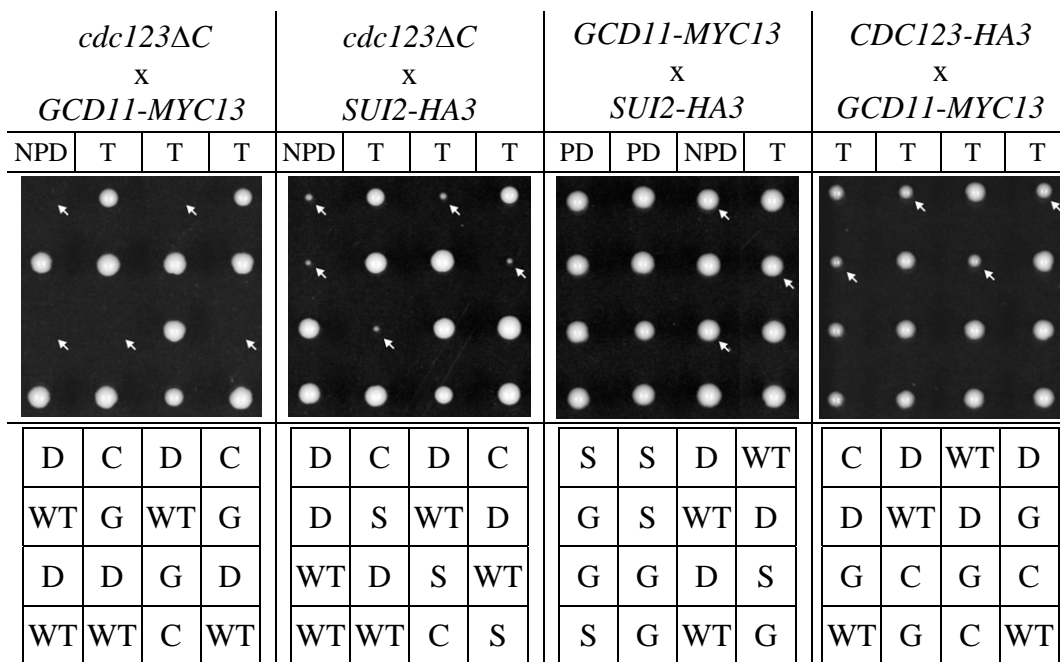


**Abbildung 4.20 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von eIF2 $\alpha$ .**

Die Stämme W4904 (*GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6*) und W4896 (*GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6 CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,9 wurden die Zellen für den Wert ohne Rapamycin geerntet. Die Kultur von W4896 wurde auf OD<sub>600</sub> = 0,2 verdünnt und 200 ng/ml Rapamycin zugegeben. Nach 1 h und 2 h wurden erneut Zellen geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 9E10 Antikörper Cdc123-Myc13 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurde Cdc123-Myc13 mit 9E10 Antikörper, Gcd11-HA3 mit 12CA5 Antikörper und phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  mit einem phosphospezifischem Kaninchenserum nachgewiesen. Der DNA-Gehalt der geernteten Zellen wurde jeweils mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

### 4.16 *cdc123* zeigt eine genetische Interaktion mit *gcd11* und *sui2*

Bei der Herstellung der Stämme für die Immunpräzipitationen von Gcd11 mit Cdc123-Mutanten fiel auf, dass es nicht möglich war, einen haploiden Stamm herzustellen, der sowohl *GCD11-MYC13* als auch eine *cdc123*-Mutante (*cdc123Δ327* bzw. *cdc123-1*) trägt. In den daraufhin durchgeführten Tetradenanalysen (Abb. 4.21) zeigte sich, dass diese Zellen nicht lebensfähig sind. Gleiches gilt für die Kombination einer *cdc123*-Mutante mit HA3-epitopmarkiertem *GCD11* (Daten nicht gezeigt). Selbst bei der Kombination von *CDC123-HA3* mit *GCD11-MYC13* kommt es zu einem leicht verlangsamtem Wachstum. Ebenso resultierte eine Kombination von *cdc123Δ327* mit *SUI2-HA3* in stark beeinträchtigtem Wachstum. Eine Kombination von *GCD11-MYC13* mit *SUI2-HA3* hingegen zeigte keinen Effekt. Auch die Deletionen *tif1Δ::kanMX4* und *gcn3Δ::kanMX4* konnten mit *GCD11-MYC13* gekreuzt werden, ohne dass ein Wachstumsdefekt auftrat (Daten nicht gezeigt). Diese genetischen Interaktionen verstärkten die Vermutung, dass Cdc123 in Zusammenhang mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF2 seine essentielle Funktion erfüllt.



**Abbildung 4.21 Genetische Interaktion von *CDC123* mit *SUI2* und *GCD11***

Folgende Stämme wurden miteinander gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht: W3129 mit W4177, W3702 mit W5290, W4177 mit W5290 und W3679 mit W4177. Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt: (WT) Wildtyp, (G) *GCD11-MYC13*, (S) *SUI2-HA3*, (C) *CDC123-HA3*, (D) bzw. (D) Doppelmutante. Die genetischen Verteilungsmuster sind wie folgt bezeichnet: (T) Tetratyp, (PD) parentaler Dityp, (NPD) nicht-parentaler Dityp

## 4.17 Auswirkungen eines Verlusts von Cdc123

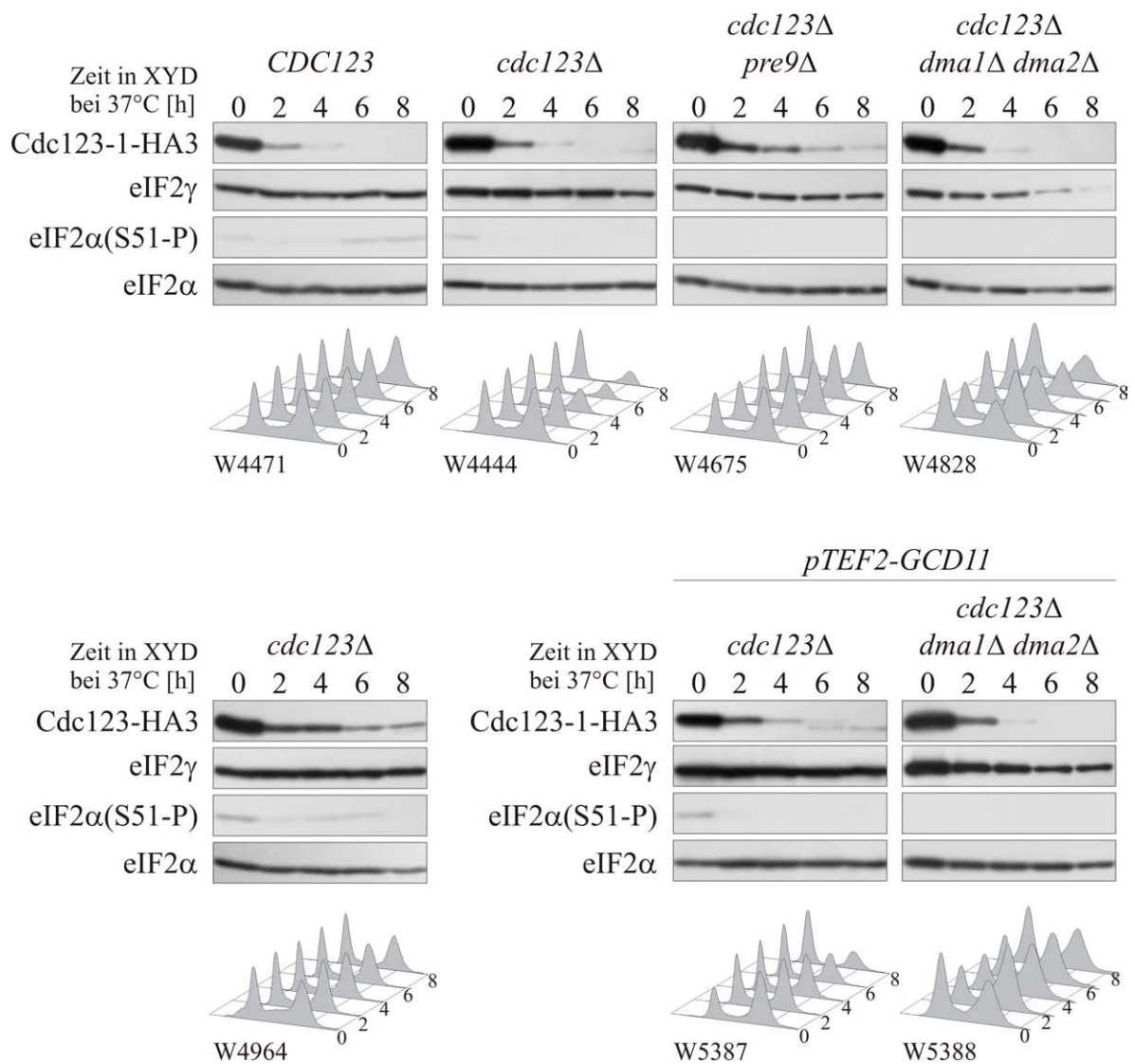
Eine weitere Möglichkeit, den beobachteten Phänotyp der *cdc123*-Mutanten zu erklären, wäre die Abnahme der Gcd11-Menge. Diese würde ebenfalls in einer reduzierten Menge an verfügbarem eIF2 und somit einem Verlust von Polysomen und erhöhter *GCN4*-Expression resultieren [Dever *et al.* 1995]. Um diese Frage detailliert klären zu können, wurden zunächst diverse Stämme mit dem *cdc123-1* Allel unter der Kontrolle des durch Glucose reprimierbaren *GALL*-Promotors hergestellt. Dies stellte sicher, dass durch Temperaturerhöhung und Zugabe von Glucose eine Situation ohne Cdc123-Aktivität erreicht werden konnte, solange keine andere Quelle von Cdc123 in dem jeweiligen Stamm zur Verfügung stand. In den Experimenten mit diesen Stämmen ließen sich die im Folgenden erörterten Beobachtungen machen (Abb. 4.22).

### 4.17.1 Cdc123-1 ist bei hoher Temperatur instabil

Wenn man die Abnahme von Cdc123 in dem Stamm W4444, der das temperatursensitive Allel *cdc123-1-HA3* unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors als alleinige Quelle von Cdc123 expremiert, mit dem Stamm W4964, der statt *cdc123-1* das Wildtypprotein Cdc123 mit einer C-terminalen HA3-Epitopmarkierung vom *GALL*-Promotor expremiert, vergleicht, lässt sich beobachten, dass Cdc123-1-HA3 wesentlich schneller abgebaut wird. Ein Grund für den ts-Charakter des *cdc123-1* Allels ist somit seine höhere Instabilität. Diese Instabilität lässt sich zu einem gewissen Grad durch die supprimierende Deletion *pre9Δ* aufheben (Abb. 4.22, W4675). Es liegt die Vermutung nahe, dass der Abbau von Cdc123-1 durch das Proteasom vermittelt wird und *pre9Δ* diese Funktion beeinträchtigt. Allerdings sind die Auswirkungen dieser Deletion schwer zu interpretieren, da sie selbst eine Temperatursensitivität vermittelt (siehe Abb. 4.7) und sich die beobachteten Effekte somit überlagern.

### 4.17.2 Die verminderte Translationsinitiation in *cdc123*-Mutanten wird nicht durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ vermittelt.

Einen weiteren Schluss, der aus diesen Experimenten (Abb. 4.22) gezogen werden kann ist, dass die reduzierte Translationsinitiation und die damit verbundene Erhöhung der *GCN4*-Expression nach dem Verlust der Cdc123-Aktivität (siehe Abb. 4.11B) nicht die Folge einer Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 ist. So ist in dem Stamm W4471, in dem das Wildtypgen *CDC123* im Gegensatz zu W4444 nicht deletiert wurde, über den gesamten Versuchszeitraum eine minimale Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  an Serin 51 nachzuweisen. In

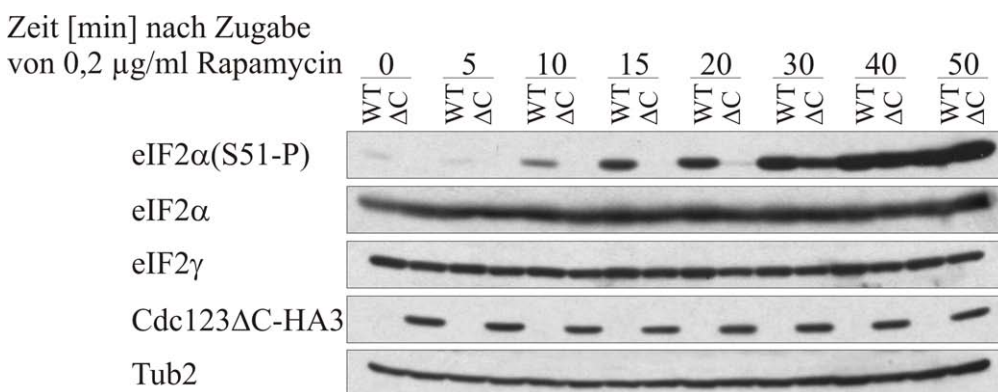


**Abbildung 4.22 eIF2α und eIF2γ Mengen nach dem Abbau von Cdc123-1**

Die Stämme W4471 (*CDC123 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*), W4444 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*), W4675 (*cdc123Δ::kanMX4 pre9Δ::natMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*), W4828 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::HIS3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*), W4964 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-CDC123-HA3-URA3*), W5387 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*) und W5388 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::HIS3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*) wurden in Vollmedium mit 2 % Raffinose und 2 % Galaktose bei 25°C kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen - nach Ernten des 0-Wertes - auf OD<sub>600</sub> = 0,1 verdünnt. Anschließend wurden 2 % Glucose zugegeben, um den *GALL*-Promotor zu reprimieren, und die Schüttelkolben bei 37°C inkubiert, um das Cdc123-1 Allel zu inaktivieren. Alle 2 h wurden Zellen für die Western-Blot-Analyse und die Durchflusszytometrie geerntet. Bei Erreichen von OD<sub>600</sub> = 1 wurden die Kulturen mit vorgewärmtem XYD Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,1 verdünnt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit folgenden Antikörpern: 12CA5 (HA-Epitop), α-Gcd11 Serum (eIF2γ), α-Sui2 Serum (eIF2α) und einem phosphospezifischen Serum gegen eIF2α(S51-P)

dem Stamm W4444 hingegen, ebenso wie den anderen Stämmen mit einer Deletion von *CDC123*, ist lediglich in der ersten Spur eine Phosphorylierung zu erkennen. Dies bedeutet, dass nach dem Verlust der Cdc123 Aktivität die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  nicht zu- sondern abnimmt. Die Menge von unphosphoryliertem eIF2 $\alpha$  bleibt über den gesamten Zeitraum in allen getesteten Stämmen stabil. Dieses Ergebnis wird ebenfalls durch die Beobachtung in dem Stamm W4964 bestätigt, der das stabile Wildtyp *CDC123* mit C-terminaler HA3-Epitopmarkierung unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors exprimiert. Dort ist die Phosphorylierung ebenfalls noch nach 4 h und 6 h nachzuweisen.

Um die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  in *cdc123*-Mutanten noch genauer zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von Serin 51 nach der Zugabe von Rapamycin über einen Zeitraum von 50 Minuten untersucht. Ein Stamm mit einer C-terminalen Verkürzung von Cdc123 nach Aminosäure 327 (W3702) wurde dabei mit Wildtyp (BY4741) verglichen. Wie man in Abbildung 4.23 erkennen kann, ist die basale Menge an phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  von in Vollmedium mit Glucose gewachsenen Kulturen in W3702 gegenüber Wildtyp erniedrigt. Ebenso setzt die Phosphorylierung später ein, erreicht jedoch nach 40 – 50 min das gleiche Niveau. Die Mengen von eIF2 $\alpha$  selbst, sowie von eIF2 $\gamma$  oder Tubulin blieben über den gesamten Versuchszeitraum konstant.



**Abbildung 4.23 Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  an Serin 51 ist in Stämmen mit *cdc123* $\Delta$ C verringert**

Die Stämme BY4741 (WT) bzw. W3702 (*cdc123* $\Delta$ 327-HA3;  $\Delta$ C) wurden bei 25°C in 150 ml XYD Medium bis OD<sub>600</sub> = 0,5 kultiviert. Es wurden 25 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet und in jeweils in 10 ml frischem XYD Medium aufgenommen. Nach der Ernte für die 0-Probe wurden jeweils 100 ng/ml Rapamycin zugegeben und die Kulturen weiter bei 25°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils Zellen für die Western-Blot-Analyse geerntet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen Seren gegen phosphoryliertes eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$  eIF2 $\gamma$  bzw. Tub2. Cdc123 $\Delta$ C-HA3 wurde mit 12CA5 Antikörper detektiert.

### 4.17.3 Die Verbindung von Cdc123 zu Dma1 und Dma2 bleibt unklar

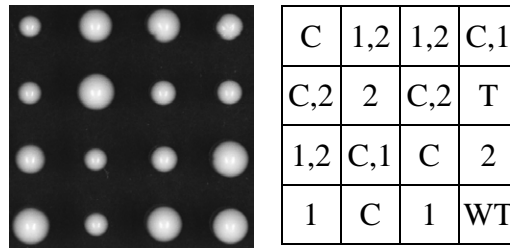
#### 4.17.3.1 Eine Deletion von *DMA1* und *DMA2* zeigt keine suppressierende Wirkung auf *cdc123*-Mutanten

Aufgrund von Zwei-Hybrid Studien [Uetz *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001] bestand eine Verbindung von Dma1 und Dma2 mit Cdc123. Diese Interaktionen konnten durch Coimmunpräzipitationen (Schwab, M., unpublizierte Ergebnisse) ebenso wie durch weitere Zwei-Hybrid Analysen [Bieganowski *et al.* 2004] bestätigt werden. Bieganowski *et al.* stellten die These auf, dass die Interaktion von Cdc123 mit Dma1 und Dma2 für deren Instabilität notwendig sind. Danach hätte der Verlust von Cdc123-Aktivität eine Akkumulation von Dma1 und Dma2 zur Folge. Die Anhäufung dieser beiden Proteine würde wiederum für die Instabilität von Gcd11 verantwortlich sein und den Grund für den essentiellen Charakter von Cdc123 darstellen. Wäre dies der Fall, müsste das Fehlen von Dma1 und Dma2 Gcd11 in *cdc123*-Mutanten stabilisieren. Die durchgeführten Experimente (Abb. 4.22) mit den Stämmen W4828 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::HIS3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*) und W5388 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::His3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*) widersprechen dieser These. Nach Verlust der Cdc123-Aktivität ist keine Stabilisierung von Gcd11 zu beobachten. Ganz im Gegenteil nimmt die Menge von Gcd11 sogar schneller ab. Die Abnahme von Cdc123-1-HA3 ist unbeeinflusst. Wären Dma1 und Dma2 der Grund für den essentiellen Charakter von Cdc123 würde man außerdem eine suppressierende Wirkung der Doppeldeletion *dma1Δ dma2Δ* auf *cdc123*-Mutanten erwarten. Wie durch eine Tetradenanalyse gezeigt werden konnte, ist dies nicht der Fall (Abb. 4.24). Auch ist es Zellen ohne Cdc123-Aktivität mit den Deletionen *dma1Δ dma2Δ* weiterhin nicht möglich, aus der G1-Phase auszutreten. Dies konnte mittels einer, durch zentrifugale Elutriation synchronisierten Kultur nachgewiesen werden (Abb. 4.25, vgl. Abb. 4.5).

Durch die Überexpression von Gcd11 ist es möglich eine *CDC123*-Deletion zu retten (siehe 4.18). Dies ist ebenfalls in den Stämmen W5387 und W5388 bei reprimierter *cdc123-1* Expression in Anwesenheit von Glucose möglich (Abb. 4.26). Vergleicht man das Wachstum der Stämme W5387 und W5388, ist die suppressierende Wirkung der *GCD11*-Expression in dem Stamm mit den Deletionen von *DMA1* und *DMA2* auf Medium mit Glucose geringer. Vermutlich ist dies auf die größere Instabilität von Gcd11 in Abwesenheit von Dma1 und Dma2 zurückzuführen (siehe Abb. 4.22 W4828 und W5388 im Vergleich zu W4444 bzw. W5387).

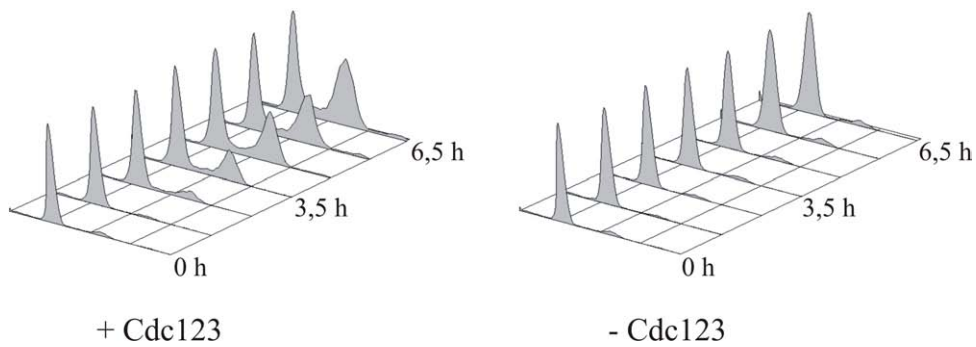


*cdc123-4* x *dma1Δ dma2Δ*



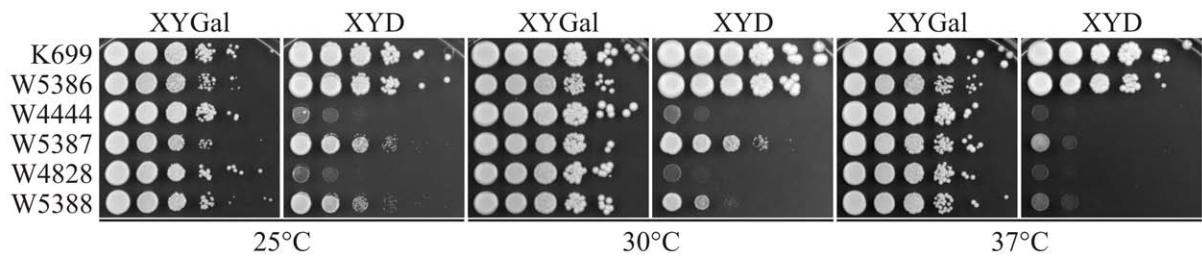
**Abbildung 4.24 Die Deletionen *dma1Δ* und *dma2Δ* können *cdc123-4* nicht suppressieren**

Die Stämme W3228 (*cdc123-4-HA3-URA3*) und W2347 (*dma1Δ::His3MX6 dma2Δ::TRP1*) wurden miteinander gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht: Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 4 Tage bei 25°C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt: (WT) Wildtyp, (C) *cdc123-1-HA3-URA3*, (1) *dma1Δ::His3MX6*, (2) *dma2Δ::TRP1*, (T) Tripelmutante.



**Abbildung 4.25 Zellen ohne Cdc123-Aktivität mit den Deletionen *dma1Δ dma2Δ* ist es nicht möglich, die G1-Phase zu verlassen**

Der Stamm W4828 (*ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::HIS3MX6 dma2Δ::TRP1*) wurde in XYGal Medium bei 25°C kultiviert. Anschließend wurde die *cdc123-1* Expression durch den Wechsel zu XYD Medium und 37°C für 6 h reprimiert, um danach die Zellen durch zentrifugale Elutriation zu synchronisieren. Anschließend wurden die Kulturen entweder in XYGal Medium (Induktion der *cdc123-1* Expression) oder XYD Medium (keine *cdc123-1* Expression) bei 37°C inkubiert und beginnend nach 1,5 h wurden stündlich Proben für die Durchflusszytometrie geerntet.

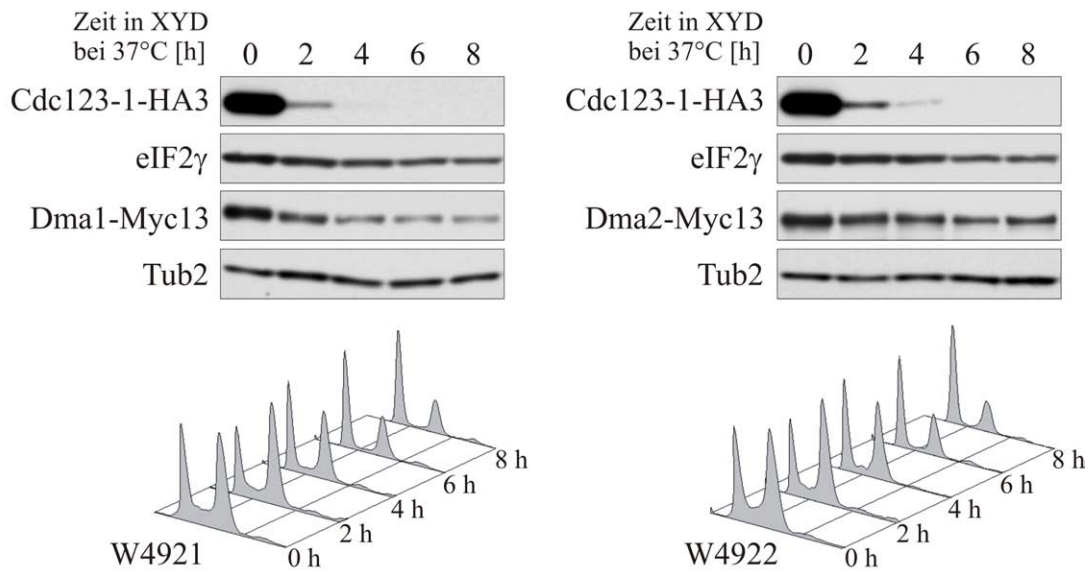


**Abbildung 4.26 Wachstum auf XYGal bzw. XYD Medium bei unterschiedlichen Temperaturen**

Die Stämme K699 (WT), W5386 (*leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*), W4444 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*), W5387 (*cdc123Δ::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*), W4828 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::HIS3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3*) und W5388 (*cdc123Δ::kanMX4 dma1Δ::His3MX6 dma2Δ::TRP1 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2*) wurden in Verdünnungsreihen auf XY Medium mit Galaktose (Gal) für die Induktion der *cdc123-1*-Expression oder Glucose (D) für die Repression der *cdc123-1*-Expression gespottet und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert.

#### 4.17.3.2 Ohne Cdc123-Aktivität sind die Proteine Dma1 und Dma2 instabil

Die Überprüfung eines weiteren Punktes der Publikation von Bieganowski *et al.*, die Akkumulation von Dma1 und Dma2 nach Verlust der Cdc123-Aktivität, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Wie schon in Abbildung 22 wurden Stämme hergestellt, die eine Deletion von *CDC123* sowie das vom *GALL*-Promotor exprimierbare Allel *cdc123-1-HA3* trugen. Zusätzlich wurden C-terminale Myc13-Epitopmarkierungen an *DMA1* bzw. *DMA2* eingeführt. Analog zu den oben beschriebenen Experimenten wurde das temperatursensitive Allel *Cdc123-1* durch Inkubation bei 37°C inaktiviert und die Transkription von *pGALL-cdc123-1-HA3* durch Zugabe von 2 % Glucose reprimiert, um dann die Mengen von Dma1-Myc13 und Dma2-Myc13 in der Western-Blot-Analyse zu überprüfen (Abb. 4.27). Entgegen der Aussage von Bieganowski *et al.* war allerdings keine Stabilisierung, sondern eine deutliche Abnahme beider Proteine zu beobachten. Dma1-Myc13 scheint dabei etwas instabiler zu sein, als Dma2-Myc13. Bisher ist der Unterschied zu den publizierten Ergebnissen nicht plausibel zu erklären. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Dma1 und Dma2 kurzlebige Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit sind (Schwab, M., unveröffentlichte Ergebnisse). Der Verlust der Cdc123-Aktivität führt zu einer reduzierten Translationsinitiation und damit einhergehend vermutlich auch zu einer verminderten Translation der mRNAs von *DMA1* und *DMA2*. Dies könnte indirekt dazu führen, dass aufgrund der Instabilität von Dma1 und Dma2, deren Menge mit der Zeit abnimmt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen direkten Effekt einer verminderten Interaktion von Cdc123 mit Dma1 oder Dma2 handelt.

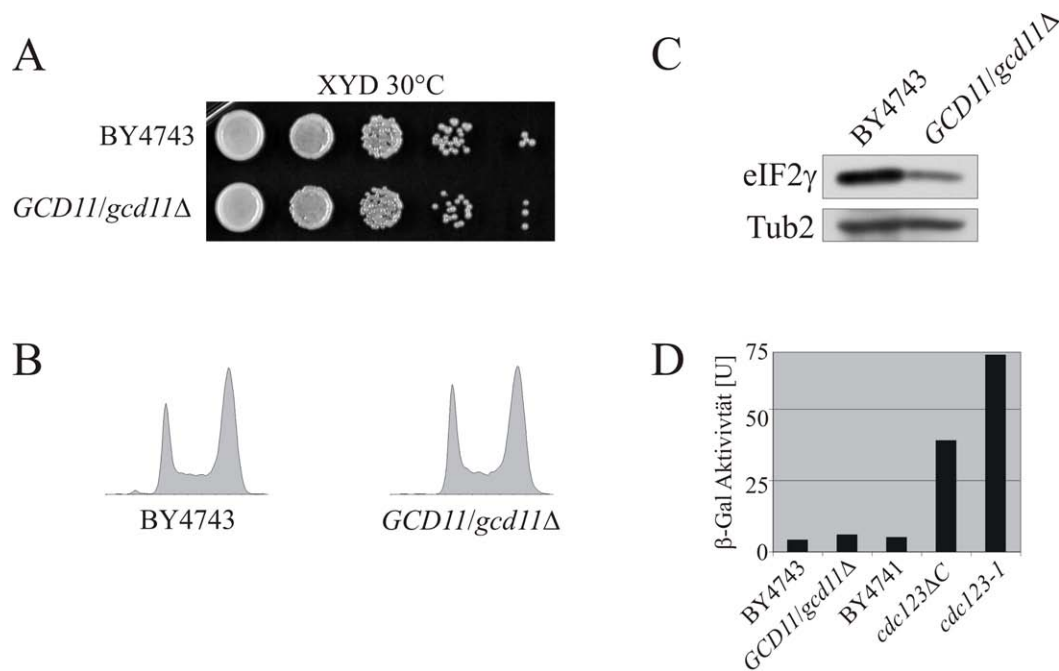


**Abbildung 4.27** Der Verlust von Cdc123-Aktivität hat eine Abnahme der Mengen von Dma1 und Dma2 zur Folge

Die Stämme W4921 (*ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 DMA1-MYC13-HIS3MX6*) und W4922 (*ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 DMA2-MYC13-HIS3MX6*) wurden in Vollmedium mit 2 % Raffinose und 2 % Galaktose bei 25°C kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen, nach Ernten des 0-Wertes, auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt. Anschließend wurden 2 % Glucose zugegeben, um den *GALL*-Promotor zu reprimieren, und die Schüttelkolben bei 37°C inkubiert, um das Cdc123-1 Allel zu inaktivieren. Alle 2 h wurden Zellen für die Western-Blot-Analyse und die Durchflusszytometrie geerntet. Bei Erreichen von  $OD_{600} = 1$  wurden die Kulturen mit vorgewärmtem XYD Medium auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit folgenden Antikörpern: 12CA5 (HA-Epitop), 9E10 (Myc13-Epitop), anti-Gcd11 Serum (eIF2γ) und anti-β-Tubulin Serum (Tub2) als Ladekontrolle.

#### 4.17.4 Leicht reduzierte Mengen von Gcd11 in *cdc123*-Mutanten können nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich gemacht werden

Im Gegensatz zu eIF2α war eIF2γ nach dem Verlust von Cdc123 in W4444 nicht stabil sondern nahm geringfügig ab. Dies war nicht der Fall in W4471, in dem ständig Cdc123 vorhanden ist oder auch in W4964, in dem auch noch nach 8 h bei 37°C in Vollmedium mit Glucose eine substantielle Menge von Cdc123-HA3 nachgewiesen werden konnte. Daraus folgt, dass Gcd11 ohne Cdc123 bei 37°C instabiler ist als mit Cdc123. Allerdings war die Abnahme über den Versuchszeitraum gering (näherungsweise um den Faktor 2) und kann nicht die bei W4444 zu beobachtende deutliche Akkumulation von Zellen in der G1-Phase glaubhaft erklären.



**Abbildung 4.28 Die Halbierung der Gcd11-Menge hat nur minimale Auswirkungen**

**A)** Verdünnungsreihen der Stämme BY4743 (WT, diploid) und W4992 (*GCD11/gcd11Δ::kanMX4*) auf Vollmedium mit 2 % Glucose bei 30°C. **B)** Durchflusszytometrie der Stämme BY4743 und W4992 nach Wachstum in Vollmedium mit 2 % Glucose bei 30°C. **C)** Western-Blot-Analyse der Lysate der Stämme BY4743 und W4992 nach Wachstum in Vollmedium mit 2 % Glucose bei 30°C. Der Nachweis von eIF2γ erfolgte mit einem polyklonalen anti-Gcd11 Serum. Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde mit einem polyklonalen Serum gegen β-Tubulin nachgewiesen. **D)** Die Stämme BY4743 und W4992 wurden mit p180 transformiert und die *GCN4*-Expression über den β-Galaktosidase-Reporter bestimmt (siehe Abb. 4.11). Die Werte für BY4741 (WT, haploid) sowie für die C-terminale Verkürzung von Cdc123 nach Aminosäure 327 (*cdc123ΔC*) und für 8 h bei 37°C in XYD Medium inaktiviertes pGALL-*cdc123-1-HA3* (*cdc123-1*) sind dem Experiment in Abbildung 4.11 entnommen und dienen dem Vergleich.

Diese Vermutung wurde durch weitere Fakten gestützt. Zum einen konnte die Überexpression von *GCD11* unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors die Akkumulation von G1-Zellen nicht vollständig verhindern (Abb. 4.22, W5387), obwohl die Menge von Gcd11 in diesem Stamm auch nach 8 h über der Gcd11-Menge eines Wildtyps lag (vgl. W4471). Zum anderen hatte die Reduktion der Gcd11 Menge auf die Hälfte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen oder die Regulation der *GCN4*-Expression. Um dies zu zeigen, wurde der für die Deletion von *GCD11* heterozygot diploide Stamm aus der Euroscarf-Kollektion verwendet, der aufgrund seiner genetischen Ausstattung per Definition nur die Hälfte an Gcd11 expremiert wie der vergleichbare Wildtyp (BY4743) (Abb. 4.28C). Das Wachstum dieses Stammes war mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 4.28A). Das Profil der Durchflusszytometrie zeigte eine minimale Erhöhung des Anteils von Zellen mit 1C DNA-Gehalt (Abb. 4.28B). Dies steht in

keinem Verhältnis mit einem Stamm, in dem Cdc123-1 vier Stunden lang inaktiviert wurde. Dieser zeigt eine deutlich Erhöhung des Anteils an Zellen in der G1-Phase, obwohl die Menge von Gcd11 weniger als halbiert ist (Abb. 4.22, W4444). Auch die *GCN4*-Expression wurde durch die Halbierung der Gcd11-Menge nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 4.22D).

#### **4.18 Die Überexpression von eIF2 oder dessen Untereinheiten kann eine Deletion von *CDC123* bedingt komplementieren**

##### **4.18.1 Überexpression von eIF2 $\gamma$ / Gcd11 in W303**

Die These, dass Cdc123 lediglich für die Kontrolle der Mengen von Gcd11 in der Zelle verantwortlich ist [Bieganowski *et al.* 2004] führt zu der Annahme, dass durch die Überexpression von Gcd11 eine Deletion von *CDC123* vollständig komplementiert werden könnte, so lange man durch eine Überexpression eine dem Wildtyp vergleichbare Menge Gcd11 erreichen kann. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde *GCD11* unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors in einen für die Deletion von *CDC123* heterozygot diploiden Stamm eingebracht. Nach Sporulation und Analyse der Nachkommen stellte sich heraus, dass Zellen ohne Cdc123 tatsächlich lebensfähig sind, wenn Gcd11 überexpremiert wird (Abb. 4.29). Allerdings wuchsen diese Stämme äußerst langsam und waren temperatursensitiv. Bei 30°C war es ihnen noch möglich Kolonien zu bilden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C war letal (Abb. 4.29A). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die vom *TEF2*-Promotor expremierte Menge von Gcd11 keinen negativen Einfluss auf das Wachstum ausübt (W5497, W5498). Zu erkennen ist dies einerseits am Wachstum auf Vollmediumsplatten mit Glucose bei unterschiedlichen Temperaturen und andererseits am Profil des DNA-Gehalts, das sich nicht von dem von Wildtypkulturen unterscheidet (Abb. 4.29B). Die langsam wachsenden Stämme mit komplementierter *cdc123*-Deletion dagegen zeigen erneut eine deutliche Erhöhung des Anteils an Zellen mit 1C DNA-Gehalt. Die Proteinmengen von Gcd11 in diesen Stämmen bei 25°C sind in Abbildung 4.29C gezeigt. Sie liegen deutlich über der Menge von Gcd11 in dem Wildtypstamm K699. Des weiteren sind sie unabhängig davon, ob in der Zelle Cdc123 vorhanden ist oder nicht. Dieser Befund war zunächst unerwartet, da in zuvor durchgeführten Experimenten (Abb. 4.22) die Menge von Gcd11 nach Verlust der Cdc123-Aktivität abnahm. Allerdings wurden alle diese Versuche bei 37°C durchgeführt, um das temperatursensitive Cdc123-1 zu inaktivieren. Die durch die Überexpression von Gcd11 komplementierten *cdc123*-Deletionsmutanten (W5495 & W5496) waren ebenfalls bei 37°C nicht mehr lebensfähig. Dies galt ebenso für die durch die *GCD11*-Überexpression geretteten

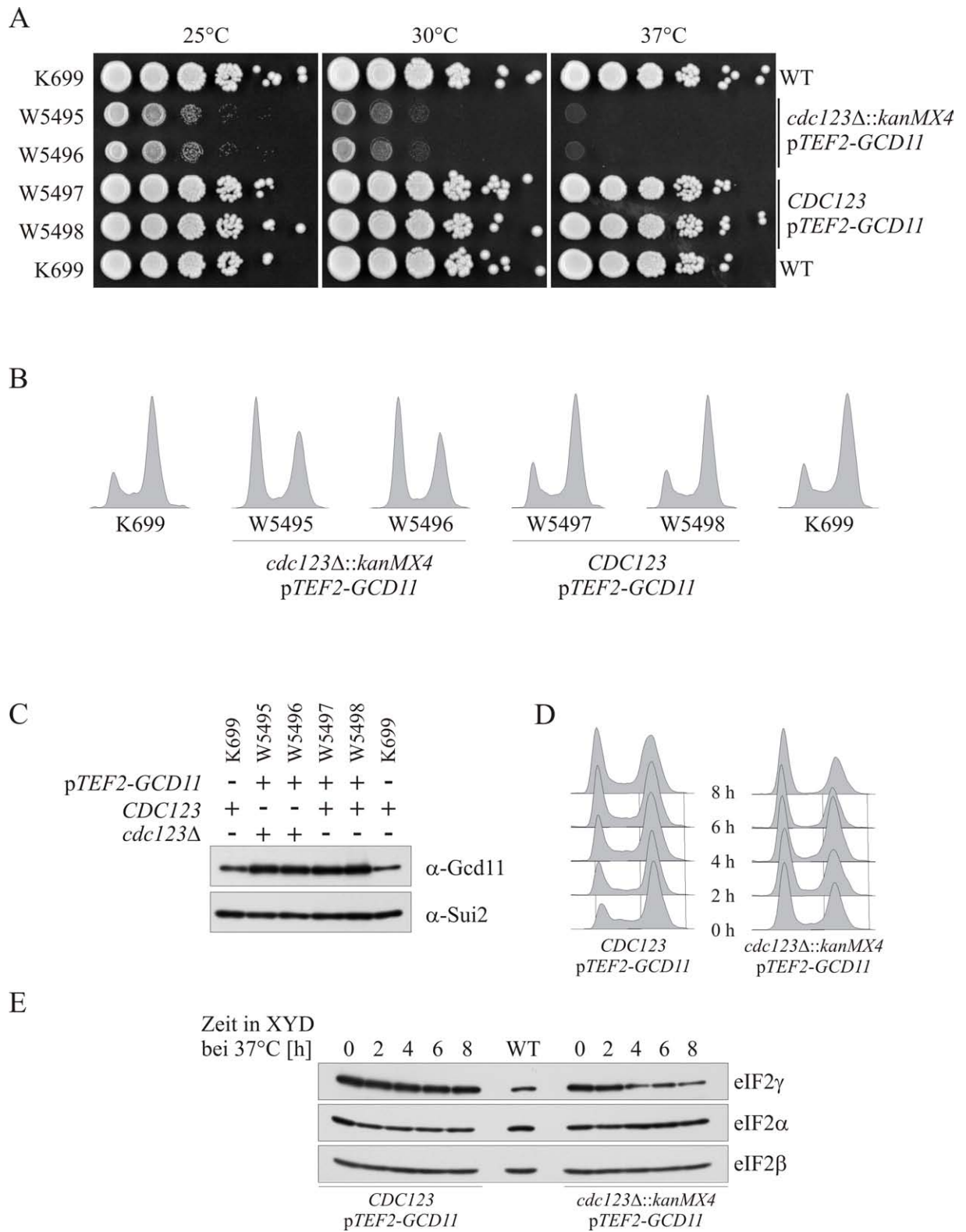


Abbildung 4.29 Komplementation von *cdc123Δ* durch die Überexpression von *GCD11*

**Abbildung 4.29 Komplementation von *cdc123Δ* durch die Überexpression von *GCD11***

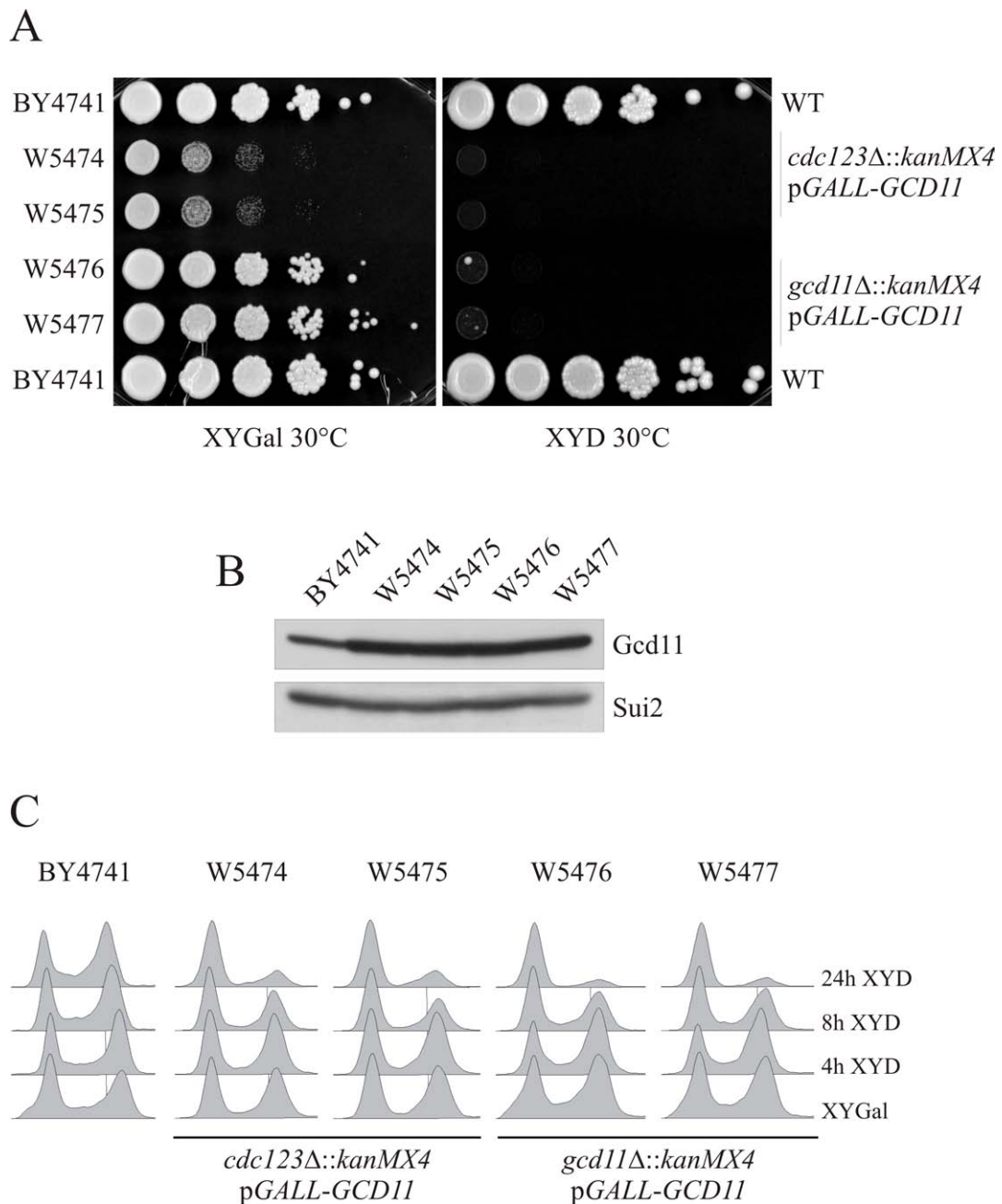
Der Stamm W5473 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD1-tCYC1-LEU2*) wurde zur Sporulation gebracht. Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 4 Tage bei 25°C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und die entsprechenden Klone identifiziert: W5495 und W5496 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD1-tCYC1-LEU2*) sowie W5497 und W5498 (*CDC123 leu2::pTEF2-GCD1-tCYC1-LEU2*). **A)** Verdünnungsreihen auf XYD Medium. Die Platten wurden 3 Tage bei 25°C bzw. 2 Tage bei 30° und 37°C inkubiert. **B)** Die Stämme W5495, W5496, W5497, W5498 und K699 (WT) wurden in XYD Medium bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für die Durchflusszytometrie und für die **C)** Western-Blot-Analyse geerntet. **D)** und **E)** Die Stämme W5495 und W5497 wurden in XYD Medium bei 25°C kultiviert. Aus der exponentiellen Phase wurde Zellen für den 25°C-Wert geerntet und die Kulturen auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen bei 37°C inkubiert und alle 2 h Zellen für die Durchflusszytometrie (**D**) und die Western-Blot-Analyse (**E**) geerntet. Bei Erreichen von  $OD_{600} = 1$  wurden die Kulturen mit vorgewärmtem XYD Medium auf  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit folgenden Antikörpern: anti-Gcd11 Serum (eIF2 $\gamma$ ), anti-Sui2-Serum (eIF2 $\alpha$ ) bzw. anti-Sui3-Serum (eIF2 $\beta$ ).

Stämme in Abbildung 4.26 (W5387 und W5388). Daraufhin wurden die Mengen von Gcd11 in den Stämmen W5495 und W5497 nach Temperaturerhöhung zu 37°C verglichen (Abb. 4.29E). In dem Stamm mit endogen exprimiertem *CDC123* war keine Abnahme von Gcd11 zu beobachten. In dem Stamm mit der Deletion *cdc123Δ* hingegen nahm die Menge von Gcd11 über den Versuchszeitraum um mehr als die Hälfte ab. Die Mengen von eIF2 $\alpha$  blieben, wie schon in der vorhergehenden Experimenten, ebenso wie die Mengen von eIF2 $\beta$  über den Versuchszeitraum konstant. Dies zeigt, dass Gcd11 durch das Fehlen von Cdc123 bei erhöhter Temperatur verstärkt instabil wird, bei 25°C hingegen nur unwesentlich.

**4.18.2 Überexpression von eIF2 $\gamma$  / Gcd11 in S288C**

Die Überexpression von Gcd11 in dem Stammhintergrund S288C erbrachte ein entsprechendes Ergebnis wie in W303 (siehe 4.18.1). Für die Herstellung der Stämme wurde in diesem Fall *GCD11* in das Plasmid p415-GALL [Mumberg *et al.* 1994] kloniert. Das entstandene Plasmid pWS1663 wurde anschließend in die Stämme W4745 (*CDC123/cdc123Δ*) bzw. W4992 (*GCD11/gcd11Δ*) transformiert. Die Transformanden wurden zur Sporulation gebracht und entsprechende Nachkommen ausgewählt. Wie man in Abbildung 4.30A sehen kann, ist das Plasmid, d.h. die Überexpression von *GCD11* vom *GALL*-Promotor in der Lage, die Deletion von *GCD11* vollständig und die Deletion von *CDC123* nur unvollständig zu komplementieren. Auf Vollmedium mit Glucose, d.h. mit





**Abbildung 4.30 Zellen ohne eIF2 $\gamma$  arretieren in der G1-Phase**

**A)** Die Stämme BY4741 (WT), W5474 und W5475 (*cdc123Δ::kanMX4* pGALL-GCD11-LEU2) bzw. W5476 und W5477 (*gcd11Δ::kanMX4* pGALL-GCD11-LEU2) wurden in Verdünnungsreihen auf XY Medium mit Galaktose (*GCD11*-Expression) bzw. Glucose (*GCD11*-Repression) gespottet und bei 30°C inkubiert. **B)** und **C)** Die Stämme BY4741, W5474, W5475, W5476 und W5477 wurden in XYRafGal Medium bei 30°C kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden Zellen für die Western-Blot-Analyse und die Durchflusszytometrie geerntet. Anschließend wurden 2 % Glucose zugegeben, um die *GCD11*-Expression zu reprimieren. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert. Nach 4, 8, und 24 Stunden wurden erneut Zellen für die Durchflusszytometrie geerntet. Bei Erreichen von OD<sub>600</sub> = 1 wurden die Kulturen mit vorgewärmtem XYD Medium verdünnt, um das exponentielle Wachstum aufrecht zu erhalten. Der Nachweis von Gcd11 bzw. Sui2 erfolgte durch spezifische Antisera.

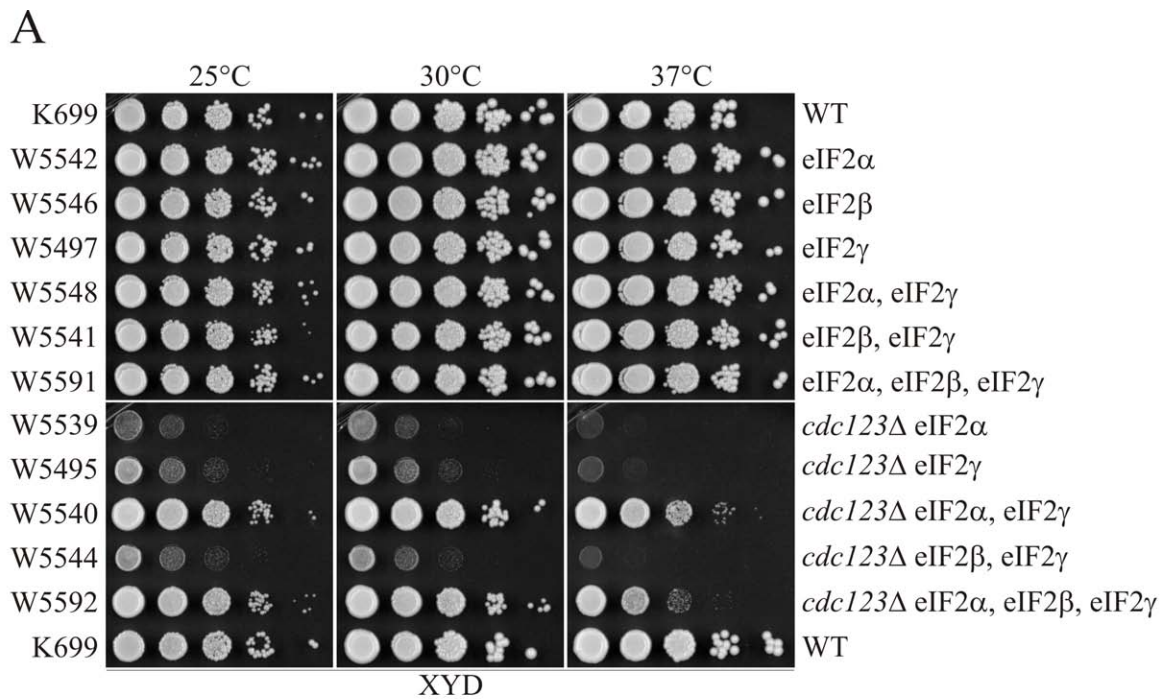


repremierter Expression von *GCD11*, ist kein Wachstum möglich. Die Mengen von Gcd11 (Abb. 4.30B) in den Stämmen W5474 und W5475 (*cdc123Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2*) sind denen der Stämme W5476 und W5477 (*gcd11Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2*) vergleichbar. Die Menge liegt in beiden Fällen deutlich über der Menge in Wildtyp. Abbildung 4.30C zeigt das Verhalten der Zellen im Zellzyklus nach der Repression der *GCD11*-Expression. Wie nach dem Abschalten der *cdc123-1* Expression (siehe Abb. 4.22) arretieren die Stämme W5476 und W5477 nach einiger Zeit mit 1C DNA-Gehalt. Ihre Morphologie ähnelt stark den Zellen ohne Cdc123. Sie sind groß, rund und ohne Knospe mit großen Vakuolen (nicht gezeigt).

Die Stämme W5474 und W5475 zeigen bei induzierter *GCD11*-Expression nur einen leicht erhöhten Anteil an Zellen mit 1C DNA-Gehalt und eine reduzierte Anzahl von Zellen in der S-Phase gegenüber Wildtyp oder W5476 und W5477. Das Verhalten der DNA-Profile der Stämme mit oder ohne *CDC123* über den Zeitraum des Experiments ist jedoch in etwa vergleichbar.

#### 4.18.3 Überexpression aller drei eIF2-Untereinheiten ( $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ ) in W303

Da die Überexpression von eIF2 $\gamma$  alleine nur ein minimales Wachstum erlaubte, wurden auch die anderen Untereinheiten von eIF2 ( $\alpha$  und  $\beta$ ) jeweils alleine und alle drei Untereinheiten in verschiedenen Kombinationen auf die Suppression der *cdc123*-Deletion hin getestet. Es wurden entsprechende Expressionskonstrukte hergestellt, die den jeweiligen ORF unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors expremierten. Um sie durch Kreuzung miteinander kombinieren zu können, wurden unterschiedliche Marker verwendet (*pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2* (siehe oben), *pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3* und *pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1*). Das Wachstumsverhalten der erhaltenen Stämme ist in Abbildung 4.31A gezeigt. Es stellte sich heraus, dass auch eIF2 $\alpha$  alleine ein minimales Wachstum von Zellen mit einer Deletion von *CDC123* erlaubt, jedoch in geringerer Masse als eIF2 $\gamma$ . Die Überexpression von eIF2 $\beta$  hingegen ermöglichte dies nicht. Die Kombination der Überexpression von eIF2 $\gamma$  und eIF2 $\alpha$  stellte bei 25°C das Wachstum von *cdc123Δ*-Zellen dem Wildtyp vergleichbar wieder her. Bei erhöhten Temperaturen waren diese Zellen jedoch, wie schon bei der Überexpression von *GCD11* alleine (Abb. 4.29), in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Die Kombination von eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\beta$  suppremierte die Deletion von *CDC123* nicht besser oder schlechter als eIF2 $\gamma$  alleine. Die Überexpression von eIF2 $\gamma$  und eIF2 $\beta$  in Zellen mit *CDC123* wirkte bei 25°C leicht toxisch (Abb. 4.31, W5541) und führte zu etwas langsamerem Wachstum. Die Expression aller drei eIF2-Untereinheiten in Zellen ohne *CDC123* verbesserte ebenfalls das



**Abbildung 4.31 Komplementation von *cdc123* $\Delta$  durch die Überexpression von eIF2-Untereinheiten**

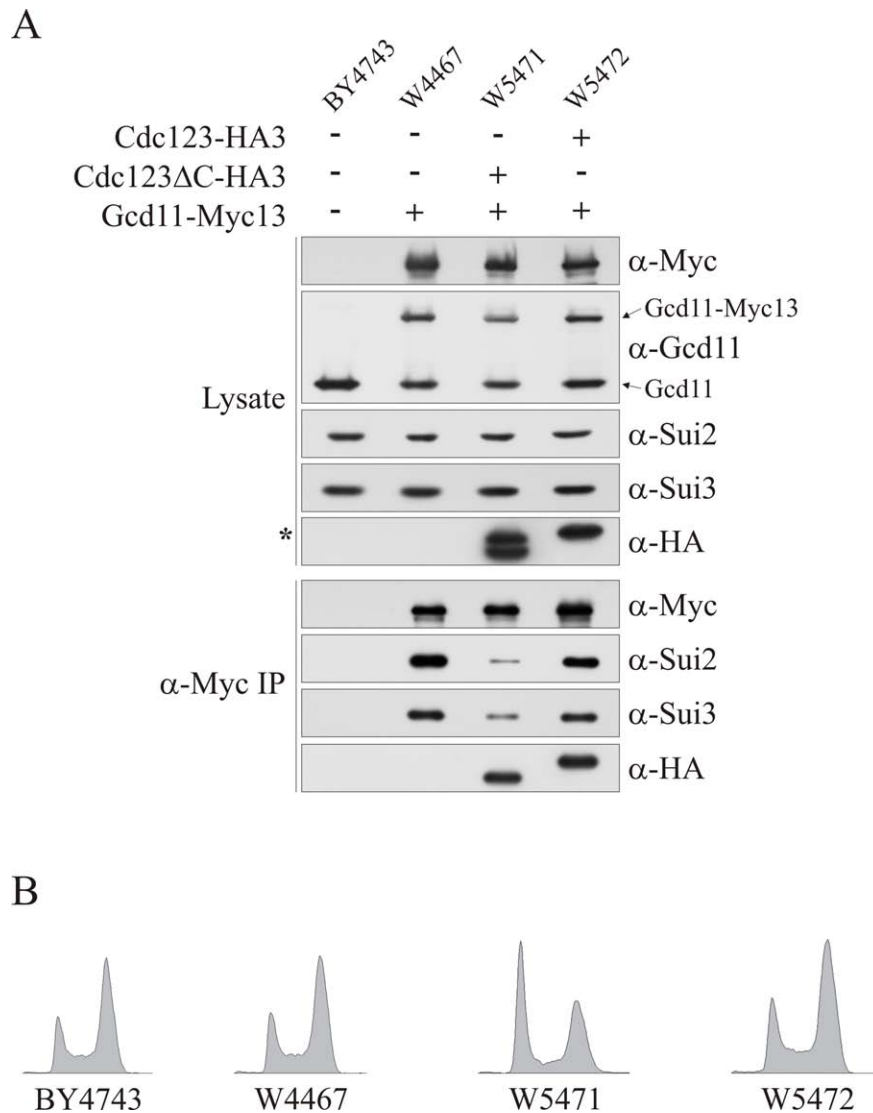
**A)** Die Stämme K699 (WT), W5542 (*ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3*), W5546 (*trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1*), W5497 (*leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5548 (*ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5541 (*trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5591 (*ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5539 (*cdc123* $\Delta$ ::*kanMX4 ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3*), W5495 (*cdc123* $\Delta$ ::*kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5540 (*cdc123* $\Delta$ ::*kanMX4 ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W5544 (*cdc123* $\Delta$ ::*kanMX4 trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) und W5592 (*cdc123* $\Delta$ ::*kanMX4 ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD Medium gespottet und 2 Tage bei 25°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert. **B)** Alle Stämme wurden in XYD Medium bei 25°C inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Der Nachweis der Untereinheiten von eIF2 ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) in der Western-Blot-Analyse erfolgte durch spezifischen Antiseren.

Wachstum gegenüber der Überexpression von eIF2 $\alpha$  und eIF2 $\gamma$  nicht. Durch die Inkubation bei 37°C wird deren Wachstum gegenüber den Zellen mit nur eIF2 $\gamma$ - und eIF2 $\alpha$ -Überexpression verschlechtert (vgl. W5592, W5520 Abb. 4.31A). Die Kombination der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  ergab keine Veränderung gegenüber der Expression von  $\alpha$  alleine (nicht gezeigt). Alle Stämme zeigen eine vergleichbare Expression der Gene der eIF2-Untereinheiten vom *TEF2*-Promotor (Abb. 4.31B). Dabei spielt es keine Rolle, ob *CDC123* anwesend ist oder nicht.

#### **4.19 Die Interaktion der eIF2-Untereinheiten $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ ist in *cdc123*-Mutanten verringert**

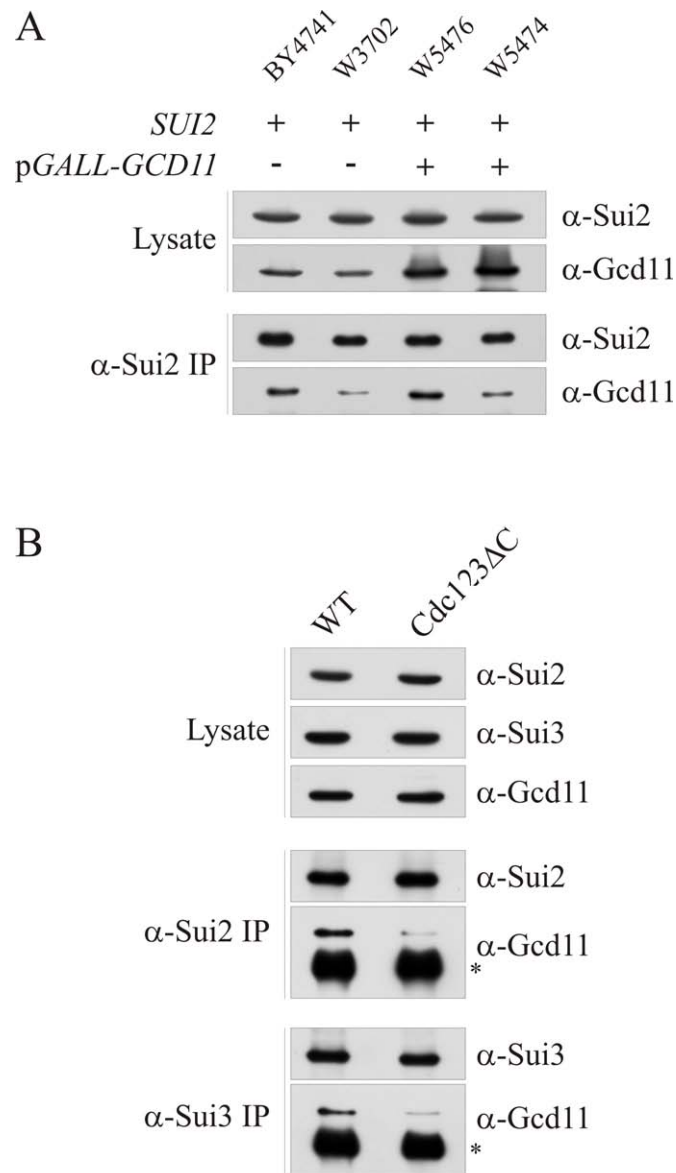
Eine Überexpression von *GCD11* alleine konnte die Deletion von *CDC123* nicht vollständig supprimieren. Einer Überexpression der Gene aller drei Untereinheiten von eIF2 gelang dies fast vollständig. Ebenfalls waren die Mengen von eIF2 $\alpha$  und eIF2 $\beta$  durch die *cdc123*-Deletion unverändert geblieben und eIF2 $\gamma$  verlor bei 25°C nur unwesentlich an Stabilität. Dies legt eine Funktionsbeeinträchtigung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 bei einem Funktionsverlust von Cdc123 nahe. Da eine Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 und Sui2 nachgewiesen wurde, nicht aber mit Untereinheiten des Nukleotidaustauschfaktors eIF2B (Gcn3 bzw. Gcd1), eIF3 (Nip1) oder dem 40S Ribosom (Rps2), wurde eine Funktion vor der Bildung des 43S Präinitiationskomplexes oder der Regeneration von eIF2-GDP zu eIF2-GTP angenommen. Diese könnte die Bildung des eIF2-Trimers beinhalten oder auch eine Modifikation von z.B. Gcd11, die die Funktion oder die Stabilität des eIF2-Komplexes positiv beeinflusst. Mit Hilfe von Coimmunpräzipitationen sollte die Interaktion der eIF2-Untereinheiten untereinander ermittelt werden. Zuerst wurde eine Präzipitation zur Überprüfung der Interaktion von Sui2 bzw. Sui3 mit Gcd11-Myc13 in Wildtypzellen und Zellen mit der C-terminalen Verkürzung von Cdc123 durchgeführt (Abb. 4.32). Es mussten diploide Stämme verwendet werden, die homozygot für die Verkürzung von Cdc123 nach Aminosäure 327 und heterozygot für die Myc13-Epitopmarkierung an Gcd11 waren, da Zellen mit einer Kombination von beidem im haploiden Zustand nicht lebensfähig sind (siehe Abb. 4.21). Als Kontrollen dienten Stämme, die entweder Wildtyp Cdc123 oder Cdc123 mit einem C-terminalen HA3-Epitop trugen. In diesem Experiment zeigte sich, dass in Stämmen mit einer Funktionsbeeinträchtigung von Cdc123 die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3 verringert war, wobei der Effekt im Falle von Sui2 ausgeprägter erschien. Der Nachweis der Interaktion von Cdc123-HA3 und Cdc123 $\Delta$ 327-HA3 mit Gcd11-Myc13 zeigte deutlich, dass es sich um eine spezifische Reduktion der Bindungen der eIF2-Untereinheiten

untereinander und nicht um eine generell reduzierte Interaktion von Proteinen mit Gcd11 handelte. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden weitere Coimmunpräzipitationen durchgeführt (Abb. 4.33 und 4.34). In allen konnte der Befund einer reduzierten Assoziation von eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\alpha$  oder eIF2 $\beta$  in Zellen mit gestörter Cdc123-Funktion bestätigt werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Epitopmarkierung von Gcd11 für den beobachteten molekularen Phänotyp nicht von Bedeutung ist, da spezifische Antiseren zur Präzipitation und zum Nachweis der eIF2 Untereinheiten verwendet wurden. Zum anderen wurde ein Einfluss der präzipitierten Untereinheit ausgeschlossen, da sowohl bei der Präzipitation von Sui2 oder Sui3 (Abb. 4.33 und 4.34) ebenso wie von Gcd11 (Abb. 4.32) eine verringerte Interaktion zu beobachten war. Auch konnte durch das Experiment in Abbildung 4.33A ein weiterer Beweis erbracht werden, dass nicht reduzierte Mengen von Gcd11 für den beobachteten Phänotyp von *cdc123*-Mutanten verantwortlich sind. Selbst bei der Überexpression von *GCD11* vom *GALL*-Promotor und somit bei Mengen von Gcd11, die über der von Gcd11 in Wildtyp liegen, konnte eine reduzierte Interaktion von Sui2 mit Gcd11 nachgewiesen werden sobald kein Cdc123 in der Zelle vorhanden war (Abb. 4.33A W5476 verglichen zu W5474).



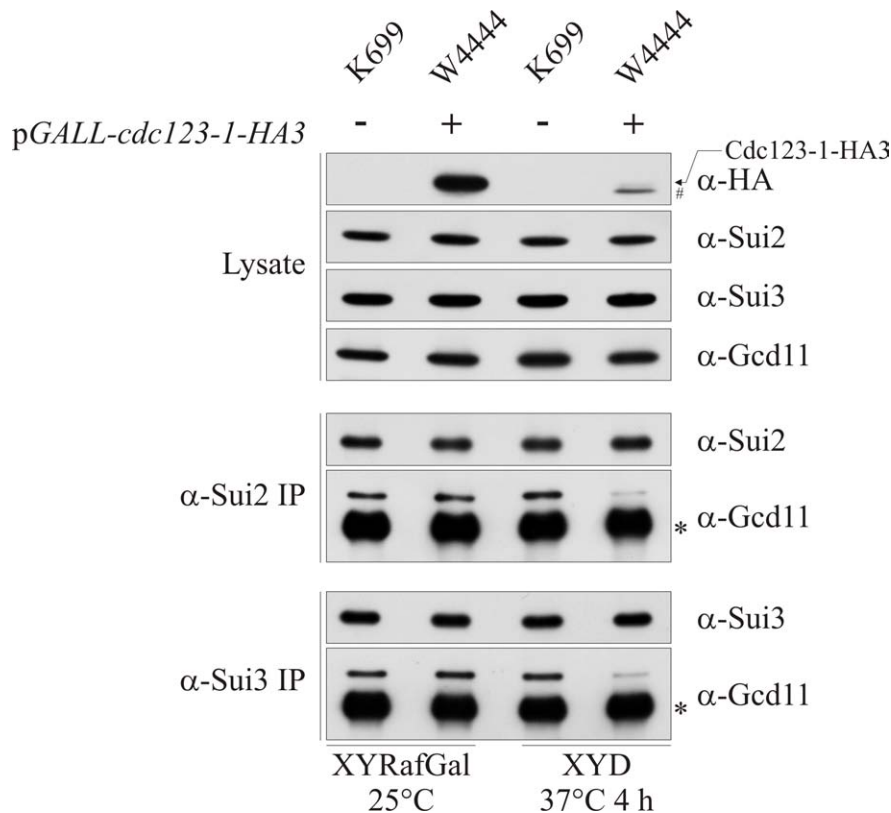
**Abbildung 4.32 In *cdc123*-Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 1**

Die Stämme BY4743 (WT), W4467 (*CDC123/CDC123 GCD11/GCD11-MYC13*), W5471 (*cdc123 $\Delta$ 327-HA3/cdc123 $\Delta$ 327-HA3 GCD11/GCD11-MYC13*) und W5472 (*CDC123-HA3/CDC123-HA3 GCD11/GCD11-MYC13*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für die Coimmunpräzipitation (A) und Durchflusszytometrie (B) geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit 9E10 Antikörper Gcd11-Myc13 präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurde Gcd11-Myc13 mit 9E10, HA3-epitopmarkierte Proteine mit 12CA5, Gcd11 und Sui2 jeweils mit spezifischen Antisera nachgewiesen. \* Kreuzreaktion des 12CA5-Antikörpers



**Abbildung 4.33 In *cdc123*-Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 2**

**A)** Die Stämme BY4741 (WT) und W3702 (*cdc123 $\Delta$ 327-HA3*) wurden in XYD Medium, W5476 (p*GALL-GCD11*) und W5474 (*cdc123 $\Delta$*  p*GALL-GCD11*) in XYGal Medium bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit Sui2-spezifischem Antiserum eIF2 $\alpha$  präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurden Gcd11, und Sui2 jeweils mit spezifischen Antisera nachgewiesen. **B)** Die Stämme BY4741 (WT) und W3702 (*cdc123 $\Delta$ 327-HA3*) wurden in XYD Medium bei 25°C kultiviert und aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit Sui2-spezifischem Serum eIF2 $\alpha$  und mit Sui3-spezifischem Serum eIF2 $\beta$  präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurden Gcd11, Sui2 und Sui3 jeweils mit spezifischen Antisera nachgewiesen. \* schwere Kette der für die Präzipitation verwendeten Antikörper



**Abbildung 4.34 In *cdc123*-Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 3**

Die Stämme K699 (WT) und W4444 (*cdc123Δ* pGALL-*cdc123-1-HA3*) wurden bei 25°C in XYRafGal Medium kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden Zellen für die Immunpräzipitation geerntet. Des Weiteren wurden die Kulturen auf  $OD_{600} = 0,1$  in XYRafGal Medium verdünnt. Nach Zugabe von 2 % Glucose (Repression der Transkription von *cdc123-1*) wurden die Kulturen bei 37°C 4 h lang inkubiert (Inaktivierung von Cdc123-1) und anschließend geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde mit Sui2-spezifischem Antiserum eIF2 $\alpha$  und mit Sui3-spezifischem Antiserum eIF2 $\beta$  präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Lysate und Präzipitate wurden Gcd11, Sui2 und Sui3 jeweils mit spezifischen Antiseren und Cdc123-1-HA3 mit 12CA5 Antikörper nachgewiesen. \* schwere Kette der für die Präzipitation verwendeten Antikörper, # Degradierete Form von Cdc123-1

## 5 DISKUSSION

Die Suche nach Faktoren, die in die Regulation der Zellproliferation involviert sind, führte 1984 zu einer Reihe von temperatursensitiven Mutanten der Rattenfibroblastenzelllinie 3Y1 [Ohno *et al.* 1984]. Diesen Mutanten, unter anderem Klon D123 (3Y1tsD123), war es bei restriktiver Temperatur nicht möglich, aus der Ruhephase in den Zellzyklus einzutreten. Proliferierende Zellen arretierten unter restriktiven Bedingungen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Mutation des Klons D123 konnte identifiziert und das entsprechende Gen kloniert werden [Okuda *et al.* 1996]. Die Mutation resultierte in einem Aminosäureaustausch (A109V) in dem Genprodukt D123. Es folgten weitere Publikationen, die eine Proteasom-abhängige Instabilität dieses mutierten Proteins nachwiesen, sowie eine teilweise granuläre Lokalisation von D123 im Cytoplasma und einen Kernsausschluss beobachteten. Durch Sequenzvergleiche wurden mögliche Phosphorylierungsstellen, sowie eine Homologie zu dem, bis zum Beginn dieser Arbeit unbekanntem ORF YLR215C in *S. cerevisiae* gefunden [Onisto *et al.* 1998; Okuda *et al.* 1999; Okuda *et al.* 2001]. YLR215C erhielt den Namen *CDC123* in der Saccharomyces Genom Datenbank (SGD; Brenner, C.).

Durch die vorliegende Arbeit war es möglich die Konserviertheit der Cdc123 Funktion nachzuweisen, also die Übertragbarkeit der in Hefe erhaltenen Ergebnisse auf Säugerzellen abzusichern. Des weiteren konnte Cdc123 eindeutig mit der Funktion des Translations-initiationsfaktors eIF2 in Verbindung gebracht werden. Um die Verbindung zu dieser Funktion und der Interaktion mit eIF2 $\gamma$  deutlich zu machen, wird der Name 2 $\gamma$ -AP (eIF2 $\gamma$  assoziiertes Protein, engl. *eIF2 $\gamma$  associated protein*) für das Genprodukt von *CDC123* vorgeschlagen. 2 $\gamma$ -AP stellt einen essentieller Faktor für die Funktion von eIF2 und daher für die Translationsinitiation dar.

### 5.1 2 $\gamma$ -AP/Cdc123 – Ein essentieller Faktor für die Translationsinitiation

In dieser Arbeit konnte 2 $\gamma$ -AP eindeutig mit eIF2 und seiner Funktion in Verbindung gebracht werden. Dies war sowohl durch genetische Interaktionen, als auch durch direkte Hinweise auf einen Defekt in der Translationsinitiation sowie Protein-Protein Interaktionen möglich. Auch findet sich in der Region *upstream* von *CDC123* an Position -163 bis -158 ein TACGTA-Motiv. Regulatorische Sequenzen in Promotorregionen liegen laut Cliften *et al.* [Cliften *et al.* 2003] häufig in einer Region von -125 bis -250 *upstream* des Startcodons. Das TACGTA-Motiv konnte oft bei Genen, die in der Translation eine Rolle spielen gefunden werden. Da diese Ergebnisse lediglich auf einem phylogenetischen Vergleich von sechs verschiedenen



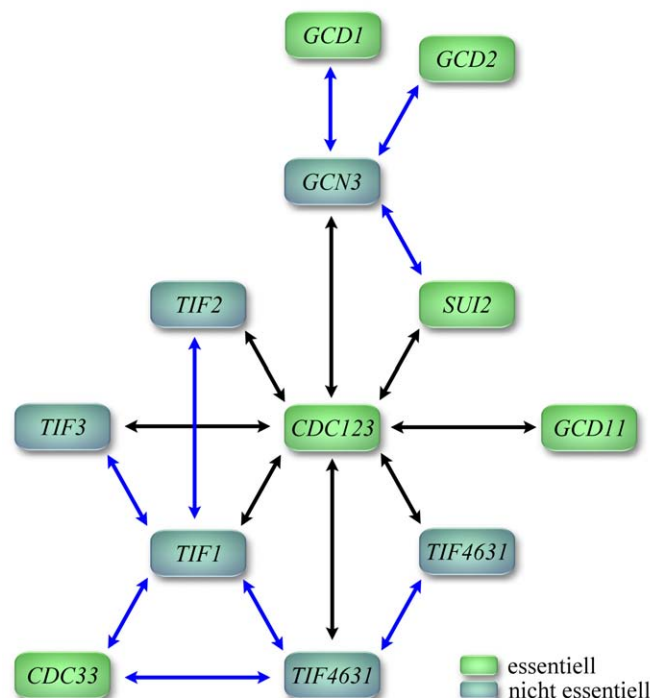
*Saccharomyces* Spezies beruhen, kann bisher keine Aussage über eine Funktionalität dieser Sequenz getroffen werden. Es ist jedoch ein weiteres Puzzleteil, das auf eine Funktion von 2 $\gamma$ -AP in der Translationsinitiation hinweist.

### 5.1.1 Genetische Interaktionen

Ausgehend von der SGA-Analyse war es möglich, aus den ca. 4700 durch die Euroscarf-Sammlung verfügbaren Gendeletionen 50 zu identifizieren, die einen synthetisch krank oder auch synthetisch letal Phänotyp in Kombination mit einer *cdc123*-Mutante aufwiesen. Darunter befanden sich die Gene der sechs Translationsinitiationsfaktoren *TIF4631*, *TIF4632*, *TIF1*, *TIF2*, *TIF3* und *GCN3* (Abb. 4.6). Dies sind die meisten der nicht essentiellen Translationsinitiationsfaktoren (siehe Anhang 9.2). Mit Deletionen anderer nicht essentieller Gene, die mit dem Prozess der Initiation in Verbindung gebracht werden, wurde kein synthetischer Effekt in der Tetradenanalyse beobachtet. Das war der Fall bei *anb1 $\Delta$*  und könnte darauf zurückzuführen sein, dass sein Fehlen durch das essentielle *HYP1*, das die gleiche Funktion erfüllt [Schwelberger *et al.* 1993], ausgeglichen werden kann. Mit *hcr1 $\Delta$*  wurde ebenfalls keine genetische Interaktion beobachtet. Die Datenlage hierfür ist jedoch recht dünn, da Doppelmutanten aufgrund der Lage der Gene auf dem gleichen Chromosomenarm selten zu erzeugen waren. Hcr1 gilt als substöchiometrische Untereinheit von eIF3 und wird mit der Bildung des Präinitiationskomplexes und auch der Ribosomenbiogenese in Verbindung gebracht [Phan *et al.* 2001; Valasek *et al.* 2001]. Die mit *fun12 $\Delta$*  (eIF5B) durchgeführten Tetradenanalysen waren ebenfalls nicht eindeutig, so dass über eine eventuelle genetische Interaktion mit *cdc123* keine Aussage getroffen werden kann. Aus den identifizierten genetischen Interaktionen kann man jedoch ableiten, dass jegliche Beeinträchtigung der Translationsinitiation in Zusammenhang mit einem Defekt von Cdc123 zu einem deutlichen Wachstumsnachteil führt. Eine genauere Zuordnung der Cdc123-Funktion wurde durch die beobachtete synthetische Letalität von *GCD11-MYC13* mit *cdc123 $\Delta$ C-HA3* (Abb. 4.21) und *cdc123-1-HA3* (nicht gezeigt) bzw. das synthetisch langsame Wachstum von *SUI2-HA3* in Kombination mit *cdc123 $\Delta$ C-HA3* möglich (Abb. 4.21). Die Epitopmarkierungen von Gcd11 und Sui2 alleine, wie auch deren Kombination zeigen keinerlei Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Dies deutet auf eine enge Verbindung von Cdc123 und der Funktion von eIF2 hin. Gestützt wird diese These durch früher beschriebene genetische Interaktionen anderer Translationsinitiationsfaktoren. Zum Beispiel führt eine Deletion von *GCN3*, die auch mit Cdc123-Mutanten einen sehr starken Effekt zeigte, in Zusammenhang mit dem Allel *sui2-1* [Williams *et al.* 1989] ebenso wie mit *gcd1* [Hannig *et*

*al.* 1988] oder *gcd2* [Harashima *et al.* 1987] nicht aber mit *sui3-2* [Williams *et al.* 1989] zu einer synthetischen Letalität. Weitere genetische Interaktionen unter den Translationsinitiationsfaktoren sind in Abbildung 5.1 gezeigt.

Eine eindeutige Einordnung der zahlreichen anderen genetischen Interaktionen mit *cdc123* ist bis dato nicht möglich. Denkbar wäre, dass Cdc123 neben der Translationsinitiation weitere Aufgaben erfüllt. Ausserdem wäre es möglich, dass alle gefundenen Gendelektionen die Translations-initiation im Allgemeinen oder bezüglich der Cdc123-Funktion im Besonderen negativ beeinflussen. Dies könnte zumindest für einen Teil der entdeckten Gene zutreffen, bedarf aber weiterer Untersuchungen. Möglich wäre dies zum Beispiel für Gene aus dem sekretorischen Weg (*EMP24*, *SAC1*, *GGA1*, *SEC22*, *SSO1*, *SFT2*, *SFH1*) oder für verschiedene Gene von mitochondrial lokalisierten Proteinen (*DLD2*, *FMP36*, *YJL131C*, *YNL122C*, *YPR125W*, *YBL095W*). So gibt es deutliche Hinweise darauf, dass sowohl die Translationsinitiation als auch die Ribosomenbiogenese sensibel auf Defekte bei der Sekretion reagieren [Zhao *et al.* 2003; Deloche *et al.* 2004] oder auch auf eine intakte Mitochondrienfunktion angewiesen sind [Kispal *et al.* 2005]. In wie weit die entdeckten Deletionen diese Prozesse beeinflussen ist jedoch zur Zeit noch unklar.



**Abbildung 5.1 Synthetisch genetische Interaktionen von Komponenten der Translationsinitiation**

schwarze Pfeile: diese Arbeit, blaue Pfeile: [Harashima *et al.* 1987; Hannig *et al.* 1988; Williams *et al.* 1989; de la Cruz *et al.* 1997]

### 5.1.2 Direkte Hinweise auf einen Translationsinitiationsdefekt

Es gibt unterschiedliche Methoden, um Indizien für einen Defekt in der Translationsinitiation zu bekommen. Zwei der am häufigsten verwendeten Methoden ist die Analyse des Polysomenprofils [Hartwell *et al.* 1969] und die Überprüfung der *GCN4*-Expression [Hinnebusch 2000]. Man kann von einer reduzierten Translationsinitiationseffizienz ausgehen, wenn das Polysomenprofil einen Verlust an Polysomen zeigt. Zu erkennen ist dies an einem größeren Verhältnis von Monosomen zu Polysomen. Ebenso kann ein Defekt in der Initiation über die Derepression der *GCN4*-Expression mit Hilfe eines geeigneten Reporterkonstruktes nachgewiesen werden. Beides konnte im Falle der verwendeten *cdc123*-Allele beobachtet werden. Je stärker dabei die Beeinträchtigung von Cdc123, desto stärker ist der beobachtete Effekt auf die Translationsinitiation. So zeigt das C-terminal verkürzte Cdc123 $\Delta$ C, beurteilt nach Wachstum und Anteil von Zellen mit 1C DNA-Gehalt, nur einen leichten Funktionsverlust. Trotzdem ist eine deutliche Erhöhung der *GCN4*-Expression messbar (Abb. 4.11) und ein minimaler Verlust an Polysomen zu beobachten (Abb. 4.12). Dieser ist bei einem temperatursensitiven Allel schon deutlich ausgeprägt. Mit Hilfe des inaktivierbaren und reprimierbaren *cdc123-1* Allels unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors konnte über einen Zeitraum von 8 Stunden belegt werden, dass die *GCN4*-Expression kontinuierlich zunimmt. Dies trifft ebenfalls für die Abnahme der Polysomen zu. Auch zieht eine Kombination von *cdc123* $\Delta$ C mit der Deletion *gcn3* $\Delta$  nicht nur ein deutlich langsames Wachstum nach sich (Abb. 4.6), sondern auch eine deutliche Erhöhung der *GCN4*-Expression (Abb. 4.11). Dies bedeutet, dass Gcn3 entgegen anders lautender Meinungen auch in Hefe nicht nur eine regulatorische Funktion zu eIF2B beisteuert, sondern auch unter Bedingungen, unter denen eIF2 $\alpha$  nicht phosphoryliert ist, eine wichtige Funktion erfüllt. In Einklang mit diesem Befund steht die Aussage von Craddock *et al.*, dass eIF2B aus Kaninchen ohne die zu Gcn3 homologe  $\alpha$ -Untereinheit inaktiv ist und nicht mit eIF2 aufgereinigt werden kann [Craddock *et al.* 1996].

Diese Befunde belegen deutlich eine reduzierte Translationsinitiation bei einer Beeinträchtigung von Cdc123. Je stärker diese ausfällt, desto stärker ist auch der beobachtete Effekt auf die Initiation der Proteinsynthese.

### 5.1.3 Die Interaktion von 2 $\gamma$ -AP mit eIF2

Neben der funktionalen Verbindung zu der Translationsinitiation konnte für 2 $\gamma$ -AP auch eine physische Beziehung zu eIF2 nachgewiesen werden. Durch Coimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass 2 $\gamma$ -AP mit eIF2 (eIF2 $\alpha$  und eIF2 $\gamma$ ) interagiert (Abb. 4.8 und 4.9). Mit

Hilfe der Zwei-Hybrid Technik wurde die Interaktion auf die  $\gamma$ -Untereinheit eingeschränkt, so dass man annehmen muss, dass die Interaktion mit eIF2 über die  $\gamma$ -Untereinheit vermittelt wird und eIF2 $\alpha$  nur indirekt über Gcd11 an  $2\gamma$ -AP binden kann. Diese Sicht wird durch Daten anderer Arbeitsgruppen unterstützt [Ho *et al.* 2002; Bieganowski *et al.* 2004]. Abgesehen von eIF2 konnte mit keiner anderen getesteten Komponente der Translationsinitiation eine Interaktion nachgewiesen werden. Nach diesen Ergebnissen interagiert  $2\gamma$ -AP weder mit eIF2B (Gcd1 bzw. Gcn3) noch mit eIF3 (Nip1) oder der kleinen ribosomalen Untereinheit (Rps2), sondern ausschließlich mit eIF2 (Abb. 4.8, 4.13). Konsistent mit dieser These sind die Ergebnisse der Erzeugung postribosomaler Überstände (Abb. 4.14). Während alle ribosomalen Bestandteile pelletiert werden konnten (S8 und Rps2) befand sich der größte Anteil von  $2\gamma$ -AP im Überstand. Trotz der Tatsache, dass auch eine substantielle Menge im Pellet zu finden war, fand auch die Interaktion mit eIF2 $\gamma$  überwiegend im Überstand statt. Der Befund, dass die Interaktion in einem von ribosomalen Bestandteilen geklärten Überstand stattfindet, ordnet die Interaktion von eIF2 und  $2\gamma$ -AP zeitlich vor der Bildung des 43S Präinitiationskomplexes ein. Eine Beteiligung von  $2\gamma$ -AP an dem MFC kann zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund keiner nachweisbaren Interaktion mit eIF3 (Nip1) fragwürdig. Weitere Interaktionsstudien mit zum Beispiel eIF5 oder eIF1 wären zur Absicherung dieses Punktes sicherlich sinnvoll.

Ausgeschlossen werden kann eine Interaktion von  $2\gamma$ -AP mit eIF2 $\gamma$  während des Nukleotid-austausches von eIF2-GDP zu eIF2-GTP durch eIF2B. Zum einen befindet sich eIF2B (Gcd1 und Gcn3), anders als  $2\gamma$ -AP, nicht im postribosomalen Überstand sondern fast ausschließlich im Pellet (Abb. 4.14 C und D). Aufgrund dessen ist auch die Interaktion von eIF2B mit eIF2 fast ausschließlich in der Pelletfraktion nachzuweisen. Zum anderen war eine Interaktion von eIF2B, nicht aber von  $2\gamma$ -AP mit dem ribosomalen Protein Rps2 der 40S Untereinheit zu beobachten (Abb. 4.13). Abgesehen davon unterstützen diese Interaktionsdaten die eingangs diskutierte Funktion von eIF2B bei der Freisetzung von eIF2-GDP vom 80S Ribosom [De Benedetti *et al.* 1983; Gross *et al.* 1985; Gross *et al.* 1987; Mueller *et al.* 1998]. Würde eIF2-GDP nach der GTP-Hydrolyse spontan freigesetzt, wäre eine Interaktion von eIF2B mit dem 40S Ribosom überflüssig.

Die in Abbildung 4.9 gezeigte Interaktion von  $2\gamma$ -AP mit eIF2 $\gamma$  bzw. eIF2 $\alpha$  lässt unterschiedliche Interpretationen zu. Mit der Annahme, dass die Affinität von  $2\gamma$ -AP zu eIF2 $\gamma$  geringer ist, als die von eIF2 $\alpha$  zu eIF2 $\gamma$ , lässt sich folgern, dass  $2\gamma$ -AP überwiegend mit freiem Gcd11 interagiert bevor der trimere Komplex eIF2 aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$

gebildet wird. Eine andere Erklärung wäre die Verringerung der Affinität von eIF2 $\gamma$  zu eIF2 $\alpha$  durch den Einfluss der Epitopmarkierungen. In diesem Fall wäre die Bindung von eIF2 $\gamma$  an 2 $\gamma$ -AP tatsächlich stärker als an eIF2 $\alpha$ . Der trimere Komplex wäre instabil und man würde während der Immunpräzipitation einen Teil der  $\alpha$ -Untereinheit „verlieren“. Die abschließenden Experimente mit *cdc123*-Mutanten zeigten eine verminderte Interaktion von eIF2 $\gamma$  mit den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (Abb. 4.32, 33 und 34). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eIF2 $\gamma$ , nicht aber eIF2 $\alpha$  oder eIF2 $\beta$  ohne Cdc123, insbesondere bei erhöhter Temperatur, instabil ist. Geht man davon aus, dass nicht das Fehlen der Cdc123-Aktivität direkt diese Instabilität verursacht, sondern diese eine Folge der verminderten Interaktion der eIF2-Untereinheiten ist, könnte eine verminderte Interaktion den Mengenunterschied von Gcd11-HA3 zu Sui2-HA3 in dem Experiment in Abbildung 4.9 erklären.

#### **5.1.4 Proteinmengen von eIF2 $\gamma$ in *cdc123*-Mutanten**

Gcd11 ist in *cdc123*-Mutanten instabil. Dies konnte mit dem inaktivier- und repremierbaren *cdc123-1* Allel unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors in unterschiedlichen Stämmen gezeigt werden (Abb. 4.22 und 4.27). Diese Instabilität identifizierten Bieganowski *et al.* als Ursache für den essentiellen Charakter von Cdc123 [Bieganowski *et al.* 2004]. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit durch verschiedene Experimente widerlegt werden. eIF2 $\gamma$  nimmt in den Experimenten in Abbildung 4.22 (W4444) über einen Zeitraum von 8 Stunden um ca. die Hälfte ab. Schon nach 4 h jedoch ist eine deutliche Akkumulation von Zellen mit 1C DNA-Gehalt zu beobachten, während eine Abnahme von Gcd11 zu diesem Zeitpunkt nur schwer nachzuweisen war. Die *GCN4*-Expression ist zu diesem Zeitpunkt ebenfalls schon dereprimiert (Abb. 4.11). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Gcd11-Menge auf die Hälfte nur marginale Auswirkungen sowohl auf das Wachstum, den DNA-Gehalt als auch die *GCN4*-Expression hat (Abb. 4.28). Durch die Annahme, dass Cdc123 allein für die Aufrechterhaltung einer bestimmten Menge von Gcd11 notwendig ist, folgt, dass eine Deletion von Cdc123 durch die Überexpression von *GCD11* vollständig komplementiert werden kann. Dies setzt voraus, dass man durch die Überexpression mindestens die Menge an Gcd11 bereitstellen kann, die in Wildtyp vorzufinden ist. Diese Voraussetzung konnte durch die Expression von *GCD11* unter der Kontrolle des *TEF2*- oder auch *GALL*-Promotors mehr als erfüllt werden (Abb. 4.29 und 4.30). Obwohl die Mengen von Gcd11 über der von Wildtyp liegen, ist den Zellen mit einer Deletion von *CDC123* nur ein minimales Wachstum möglich. Die geringfügige Überexpression von Gcd11 verursacht selbst

keinen Wachstumsnachteil. Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht die Mengen von Gcd11 die Ursache der beobachteten Phänotypen in *cdc123*-Mutanten sind.

Weiter konnte nachgewiesen werden, dass Gcd11 zwar ohne Cdc123 instabil ist, nicht aber die anderen eIF2-Untereinheiten Sui2 und Sui3. Diese Instabilität von Gcd11 wird in ausgeprägtem Maße jedoch nur bei 37°C nicht aber bei 25°C beobachtet (Abb. 4.29E). Ein Umstand der erklärt, weshalb diese Instabilität gerade in Zusammenhang mit temperatursensitiven Mutanten auffällig wurde.

### 5.1.5 Verringerte Interaktion der eIF2-Untereinheiten in *cdc123*-Mutanten

Nachdem die Ergebnisse verschiedener Experimente belegen, dass nicht allein eine reduzierte Menge von Gcd11 für den beobachteten Phänotyp der *cdc123*-Mutanten verantwortlich ist, stellt sich die Frage nach der eigentlichen Ursache. Diese konnte als verringerte Interaktion der eIF2-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  untereinander identifiziert werden. Es konnte in verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen *cdc123*-Allelen eine verminderte Assoziation von eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\alpha$  oder eIF2 $\beta$  bei einer verminderten Verfügbarkeit von Cdc123 nachgewiesen werden (Abb. 4.32-34). In Übereinstimmung damit kann eine Deletion von *CDC123* durch die Überexpression von eIF2 gerettet werden (Abb. 4.29-31). Die Überexpression von eIF2 $\gamma$  erlaubt jedoch nur ein geringfügiges Wachstum, obwohl in diesen Zellen mehr Gcd11 nachzuweisen ist als in dem entsprechenden Wildtyp. Eine Erklärung liefert in diesem Falle erneut die verminderte Interaktion der eIF2-Untereinheiten. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Cdc123 trotz der großen Menge an eIF2 $\gamma$  weniger eIF2 $\gamma$  mit eIF2 $\alpha$  copräzipitiert werden kann als in dem vergleichbaren Wildtyp ohne Überexpression (Abb. 4.33A).

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei einem Fehlen von Cdc123 eIF2 $\gamma$  und eIF2 $\alpha$  zusammen am wichtigsten sind. So hat die gemeinsame Überexpression von eIF2 $\gamma$  und eIF2 $\alpha$  die größte Wirkung bei der Suppression der Deletion von *CDC123*. Überraschend war, dass gegenüber diesen Stämmen die Überexpression aller drei Untereinheiten sogar einen leichten Wachstumsnachteil offenbarte (Abb. 4.31). Ebenso erlaubt die einzelne Überexpression von sowohl eIF2 $\alpha$  als auch eIF2 $\gamma$ , nicht aber von eIF2 $\beta$ , zumindest ein minimales Wachstum. Da die Überexpression der Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  zusammen auch in Wildtypzellen ein reduziertes Wachstum verursachen, scheint es dieses Dimer zu sein, das auf die Zellen toxisch wirkt. Zwar konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sogar eine Deletion von *SUI2* durch die Überexpression von eIF2 $\gamma$  und eIF2 $\beta$  gerettet werden kann. Dies war jedoch nur möglich wenn zusätzlich tRNA<sub>i</sub> überexprimiert

wurde [Erickson *et al.* 2001]. Dies legt nahe, dass zwar die essentielle Funktion von eIF2 $\alpha$  durch entsprechend hohe Mengen an eIF2( $\beta\gamma$ ) beladen mit tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> ersetzt werden, unbeladenes eIF2( $\beta\gamma$ ) jedoch toxisch wirken kann. Die Wichtigkeit der eIF2 $\alpha$ -Funktion in Cdc123-Mutanten wird ebenfalls durch die oben beschriebene genetische Interaktion der *cdc123*-Mutanten und *sui2-1* mit *gcn3* $\Delta$  nahegelegt.

### 5.1.6 Arrest der *cdc123*-Mutatanten in der G1-Phase

Die erzeugten temperatursensitiven Allele von Cdc123 akkumulieren bei restriktiver Temperatur Zellen ohne Knospe (Abb. 4.4, 4.22 und 4.27). Den Zellen ist weiterhin ein Wachstum möglich, so dass sie an Volumen zunehmen können. Ihre Vakuole ist groß und das Actincytoskelett nicht polarisiert (Abb. 4.5). Sie enthalten hohe Mengen des Clb-Cdc28-Kinase-Inhibitors Sic1 (Abb. 4.4). Zusammen mit der Pheromonsensitivität an diesem Punkt ähnelt dies dem Arrest durch Nährstoffmangel in der G1 Phase vor dem Übergang von START. Durch die Synchronisation des Zellzyklus mittels Elutriation konnte eindeutig gezeigt werden, dass es Zellen ohne Cdc123 nicht möglich ist, die G1-Phase zu verlassen (Abb. 4.5). Außerdem zeigte dieses Experiment, dass der Arrest durch den Verlust von Cdc123 ebenso wie in Säugerzellen [Okuda *et al.* 1999] reversibel ist. Im Gegensatz zu Bieganowski *et al.* [Bieganowski *et al.* 2004] konnte mit keinem der erzeugten Cdc123-Allele eine Verzögerung in der G2-Phase beobachtet werden. Lediglich in den Stämmen, in denen die Deletion von *CDC123* durch die Expression des humanen *D123* komplementiert wird, ist ein vermehrtes Auftreten von Zellen mit 2C DNA-Gehalt zu beobachten (Abb. 4.2). Die Untersuchung der Kernmorphologie stimmt jedoch nicht mit einer Verzögerung in der G2-Phase überein. Gegenüber Wildtyp enthielten diese Zellen vermehrt elongierte, ungetrennte Kerne, was für eine verlangsamte Mitose spricht. Ungeachtet des genauen Zeitpunkts der Verzögerung spricht jedoch alles für eine wichtige Funktion von Cdc123 während des gesamten Zellzyklus, auch wenn ein Funktionsverlust in Zusammenhang mit dem Übergang von START durch den Arrest in der G1-Phase besonders auffällig wird. Auch die Komplementation von *cdc123* $\Delta$  durch die Überexpression von eIF2 $\gamma$  in S288C (siehe Abb. 4.30) unterstützt diese These. Trotz annähernd gleicher Mengen von Zellen mit 1C und 2C DNA-Gehalt, d.h. der Suppression des Defektes, der zu einem Arrest in der G1-Phase führt, ist diesen Zellen nur ein stark verlangsamtes Wachstum möglich.

Ein Arrest in der G1-Phase kann ebenfalls bei einem Verlust von eIF2 $\gamma$ , d.h. der Reduktion der eIF2-Funktion und somit einer reduzierten Translationsinitiation, beobachtet werden (Abb. 4.30). Da auch Mutationen in Genen anderer Translationinitiationsfaktoren wie zum

Besispiel *CDC33* oder *CDC63/PRT1* zu einem Arrest in der G1-Phase führen [Hanic-Joyce *et al.* 1987; Brenner *et al.* 1988], kann man daraus folgern, dass auch der in *cdc123*-Mutanten beobachtete Arrest in der G1-Phase primär auf eine Reduktion der Funktion von eIF2 und einer beeinträchtigten Translationsinitiation zurückzuführen ist.

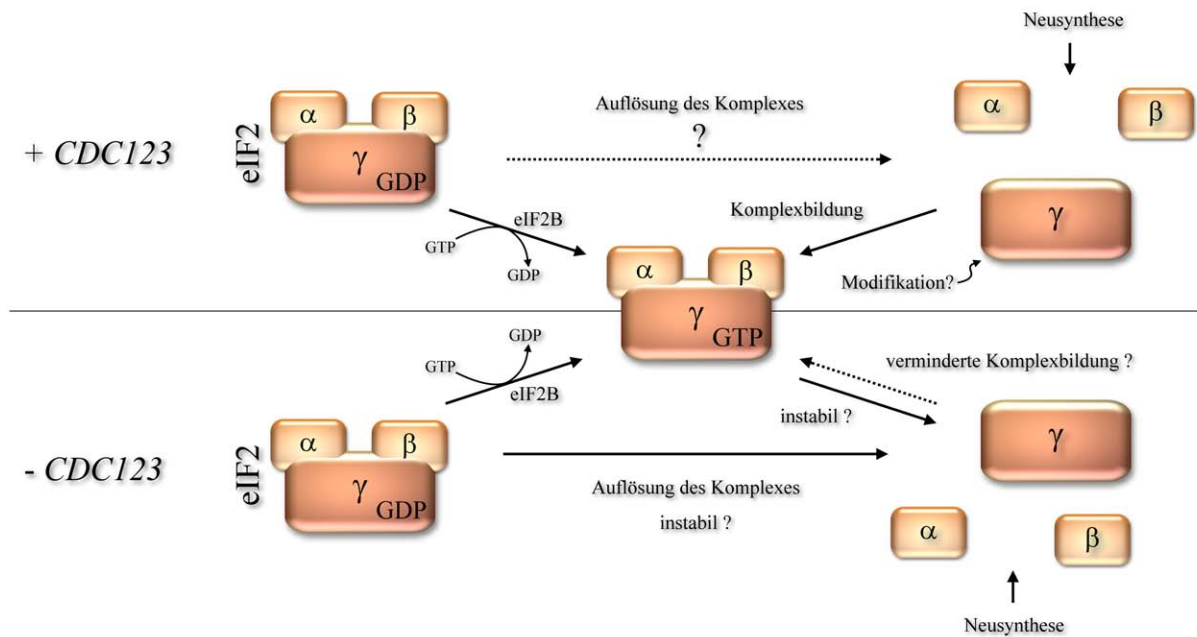
## 5.2 Die Verbindung von 2 $\gamma$ -AP zu Dma1 und Dma2

2 $\gamma$ -AP interagiert mit Dma1 und Dma2 [Schwab, M., unpublizierte Ergebnisse; Nachtsheim, 2000, Bieganowski *et al.* 2004]. Dma1 und Dma2 sind zu 58% identisch und homolog zu Chfr1 im Menschen und Dma1 in *Schizosaccharomyces pombe* [Fraschini *et al.* 2004]. Allen gemeinsam ist eine *Forkhead-associated* Domäne und ein Ring-Finger Motiv. Letzteres ist typisch für Untereinheiten von Ubiquitin-Ligasen [Joazeiro *et al.* 2000].

In dieser Arbeit konnten einige der Ergebnisse von Bieganowski *et al.* [Bieganowski *et al.* 2004] nicht bestätigt werden. Die Veröffentlichung beschreibt eine Cdc123-abhängige Instabilität von Dma1 und Dma2. Nach 16-stündiger Inaktivierung des ts-Alles Cdc123-4 beobachteten sie eine Akkumulation von Dma1 und Dma2. Sie konnten ebenfalls einen G1-Arrest nach 20-stündiger Inaktivierung von Cdc123-4 bei 37°C dokumentieren. Der Arrest wird ihrer Erörterung zur Folge durch eine Deletion von *DMA2* aufgehoben. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in den durchgeführten Experimenten keine Stabilisierung von Dma1 oder Dma2 beobachtet werden (Abb. 4.27). Vielmehr nimmt die Menge beider Proteine nach Inaktivierung und Repression des *cdc123-1* Allels kontinuierlich ab. Ebenfalls wurde die Notwendigkeit von Cdc123 für das Verlassen der G1-Phase durch die Deletion von *DMA1* und *DMA2* nicht beeinflusst (Abb. 4.25). Die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase aus einer asynchron wachsenden Kultur fällt ohne die Ring-Proteine jedoch geringer aus. Allerdings ist kein suppressiver Effekt der Deletionen auf *cdc123*-Mutanten zu beobachten (Abb. 4.24). Dieser Befund spricht gegen eine Dma1-Dma2-vermittelte Degradation von Gcd11. Im Gegenteil, ein positiver Einfluss von Dma1 und Dma2 auf die Instabilität von Gcd11 kann ausgeschlossen werden. eIF2 $\gamma$  wird durch eine Deletion von *DMA1* und *DMA2* nicht stabilisiert (Abb. 4.22). Vielmehr ist seine Abnahme durch das Fehlen der beiden Ring-Proteine noch beschleunigt. Auf welche Ursache diese Beobachtung zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Daten noch nicht beurteilt werden. Die Funktion der Interaktion von 2 $\gamma$ -AP mit Dma1 und Dma2 bleibt demnach unklar.



### 5.3 Modell der Wirkungsweise von Cdc123



**Abbildung 5.2 Ein mögliches Modell der Wirkungsweise von Cdc123**

Die zentrale Beobachtung in *cdc123*-Mutanten ist die verringerte Interaktion der eIF2-Untereinheiten α, β und γ. Dadurch steht weniger eIF2 für die Translationsinitiation zur Verfügung, die somit verhindert/beeinträchtigt wird. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: (1) Cdc123 modifiziert Gcd11 oder unterstützt diese Modifikation. Diese könnte für die Komplexbildung oder für die Stabilität des eIF2-Komplexes notwendig sein. (2) Cdc123 unterstützt die Komplexbildung durch seine Bindung an Gcd11. (3) Es ist bisher nicht geklärt, ob sich der Komplex eIF2 in seinem Recyclingzyklus in seine Untereinheiten auflösen kann. Cdc123 könnte diesen Zerfall unterbinden und eIF2 durch seine Bindung an Gcd11 stabilisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass 2γ-AP für die Bereitstellung von eIF2 notwendig ist. In welcher Form dies geschieht, ob durch Stabilisierung vorhandenen eIF2s oder durch eine Funktion, die die eIF2-Komplexbildung unterstützt, ist nicht geklärt. 2γ-AP interagiert mit eIF2, möglicherweise mit freiem eIF2γ. Dies könnte neu synthetisiertes eIF2 sein oder auch eIF2γ aus einem zerfallenen Komplex der Untereinheiten α, β und γ. Es ist bis dato unklar, ob *in vivo* die gesamte Menge an eIF2α, β und γ oder nur ein Teil als trimerer Komplex eIF2 vorliegt [Hashimoto *et al.* 2002]. Es ist bisher ebenfalls nicht gezeigt, ob eIF2 innerhalb des Recyclingzyklus in seine Untereinheiten zerfallen kann oder ob die Auflösung des eIF2-Komplexes als regulatorischer Ansatzpunkt verwendet wird. 2γ-AP könnte eine Konformationsänderung von Gcd11 hervorrufen oder es modifizieren, so dass die Bildung eines stabilen trimeren Komplexes ermöglicht wird. Mögliche Funktionen von Cdc123 sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Nachdem 2γ-AP in der stationären Phase des Wachstums nicht

mehr nachzuweisen ist [Nachtsheim 2002; Bieganowski *et al.* 2004], wird auf diese Weise die Translation in dieser Phase neben der Degradation von eIF4G, die in Abhängigkeit des TOR-Signalweges erfolgt [Berset *et al.* 1998] durch einen weiteren Mechanismus reguliert, der unabhängig von der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ist. Ist dies eine Reaktion auf bestimmte Mangelbedingungen, gilt es nun, diese zu identifizieren. Ob in diesem Zusammenhang die Ring-Proteine Dma1 und Dma1 eine Rolle spielen und ob 2 $\gamma$ -AP ein mögliches Substrat für den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau durch das 26S-Proteasom darstellt, bleibt abzuwarten.

## 6 MATERIAL

### 6.1 Nukleinsäuren

1 kb Plus DNA-Längenstandard	Invitrogen
dNTPs	Pharmacia
Heringssperma-DNA	Roche
Oligonukleotide	MWG-Biotech

### 6.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Fluka
Novozym 234	NovoBiolabs
Pfu-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Roche und New England Biolabs
RNase A	Roche
T4-DNA-Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Biomaster
Zymolyase 20T	Seikagaku, Tokyo

### 6.3 Antikörper und Seren

9E10	1:100 Western-Blot	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-myc-Epitop [Evan <i>et al.</i> 1985]
12CA5	1:100 Western-Blot	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA-Epitop [Field <i>et al.</i> 1988]
Anti-Gcd11	1:5000 Western-Blot	Polyklonales Kaninchenserum gegen Gcd11 aus Hase #6, August 1991 (E.Hannig) [Hannig <i>et al.</i> 1993]
Anti-Sui2	1:5000 Western-Blot	Polyklonales Kaninchenserum gegen Sui2 (T.F. Donahue) [Cigan <i>et al.</i> 1989]
Anti-Sui3	1:5000 Western-Blot	Polyklonales Kaninchenserum gegen Sui3 (B.A. Castilho) [Hashimoto <i>et al.</i> 2002]
Anti-S8	1:1000 Western-Blot	Polyklonales Kaninchenserum gegen die S8-Untereinheit der kleinen ribosomalen Untereinheit (H. Tschochner) [Milkereit <i>et al.</i> 2003]
Anti-eIF2 $\alpha$ -S51P	1:1000 Western-Blot	Phosphospezifisches polyklonales Kaninchenserum gegen an Serin 51 phosphoryliertes Sui2 (eIF2 $\alpha$ ) (Biosource)
Anti-Tub2	1:5000 Western-Blot	Polyklonales Kaninchenserum gegen $\beta$ -Tubulin (Eurogentec)

Schaf-Anti-Maus-IgG- HRP	1:2500 Western-Blot		Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen- IgG-HRP	1:2500 Western-Blot		Dianova, Hamburg
Yol1/34p	1:100	IF	Monoklonaler Ratteantikörper gegen Tubulin
Anti-Ratte-Alexa488	1:250	IF	MoBiTec, Göttingen

## 6.4 Chemikalien

1-Butanol p.a.	Merck, Darmstadt
Aceton p.a.	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 30 %/ Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem, Darmstadt
Agarose ultra pure	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Aminosäuren	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Fluka, Deisenhofen
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Pepton	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit
Bradfordreagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Canavanin	Sigma, St.Louis
clonNAT (Nourseothricin)	Werner BioAgents
Cycloheximid	Sigma, St. Louis
Sytox Green	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Sigma, St. Louis
D-Galaktose	Gerbu, Gaiberg
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Serva, Heidelberg
D-Raffinose	Serva, Heidelberg
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
D-Sorbitol	Serva, Heidelberg
EDTA	Fluka, Deisenhofen

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Euroagar	Difco, Detroit
Formaldehyd (37 %)	Fluka, Deisenhofen
G418-Sulfat	Calbiochem
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hydroxyharnstoff	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Humana Milchunion Lasana
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phalloidin Alexa488	Molecular Probes
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma, St. Louis
Polylysin	Sigma, St. Louis
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
ProteinA-Agarose	Santa Cruz
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Rapamycin	Sigma, St. Louis
Salzsäure	Merck, Darmstadt
TEMED	Fluka, Deisenhofen
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Deisenhofen
Uracil	AppliChem, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base	Difco, Detroit
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen

## 6.5 Sonstige Materialien

Blotting Substrate	Roche
BM Chemiluminescence	Roche
CEA RP Röntgenfilme	CEA
Dialysemembran VS 0,025 µm	Millipore
Elektroporationsküvetten	Equibio
Glasperlen (0,45-0,5 mm)	Braun Biotech
JETSPIN Kit	Genomed
Miniprep Kit	Qiagen
Multiwell Objektträger	ICN
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
S/W Filmentwickler und Fixierer	Tetenal
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell
Whatman GB004	Schleicher & Schuell

## 6.6 Geräte

Dark Reader	Clare Chemical Research
Digitalkamera Camedia E10	Olympus
Durchflusszytometer CA-III	Partec
Elektroblotapparatur 2117 Multiphor II LKB	Bromma
Elektroporationsapparatur Easyject Prima	Equibio
Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel Twin G42	Biometra
Gelapparatur für Agarosegele, Modell HE33	Hofer
Mikromanipulator	MSM System Singer Instruments
Mikroskop Axioplan2	Zeiss
Mikroskop Standard 25	Zeiss
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific
Retschmühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific
Sonicator W385	Ultrasonics
Spannungsgerät E122 und E844	Consort
Spektrophotometer Novaspec II	LKB
Thermocycler	Techne Genius Thermo DUX
Thermomixer	Eppendorf
UV Stratalinker 1800	Stratagene
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore
Wippe	Bachhofer
Wippe Rocky	MS Laborgeräte

**Zentrifugen:**

Megafuge 1.0	Heraeus
Kühlzentrifuge RC-5b	Sorvall
Tischzentrifuge Biofuge pico und fresco	Heraeus
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge Optima™ TL	Beckman Coulter

**6.7 Medien, Puffer und Lösungen****6.7.1 Bakterienmedien**

LB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
dYT-Flüssigmedium	Bacto Trypton	16 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	NaCl	5 g/l
TB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	12 g/l
	Bacto Yeast Extract	24 g/l
	Glycerin	4 ml
	Wasser	ad 900 ml
	[autoklaviert] 0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,72 M K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	100 ml

Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7 % (w/v) Euroagar zugegeben. Zur Selektion auf ampicillinresistente Klone wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin beigefügt. Auf Kanamycinresistenz wurde durch Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin selektiert.

**6.7.2 Hefemedien**

Vollmedium flüssig (XY)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	Adeninsulfat	0,1 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	[autoklaviert] Zucker	20 g/l
Selektivmedium flüssig (S)	Yeast Nitrogen Base (10x)	100 ml/l
	Dropout-5 (10x)	100 ml/l
	Zucker	20 g/l

Je nach Auxotrophiemarker der verwendeten Stämme wurde Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) zugesetzt. Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7 % (w/v) Bacto Agar zugegeben.

Toxine zur Selektion resistenter Hefeklone wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

G418	500 µg/ml für den Stammhintergrund W303 200 µg/ml für den Stammhintergrund S288C	
clonNAT	100 µg/ml	
Canavanin	50 µg/ml	
Prä-Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract Bacto Pepton Adeninsulfat Glucose [sterilfiltriert]	8 g/l 3 g/l 50 mg/l 100 g/l
Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract Kaliumacetat Dropout++ (10x) Glucose [sterilfiltriert]	1 g/l 10 g/l 10 ml/l 0,5 g/l

### 6.7.3 Puffer und Lösungen

Cycloheximid-Stammlösung	Cycloheximid in EtOH	20mg/ml
DNA-Auftragspuffer	Tris/HCl, pH 7,8 EDTA Bromphenolblau Glycerin	10 mM 1 mM 2,5 mg/ml 300 mg/ml
Dropout-5 (10x)	Alanin Arginin Asparagin Aspartat Cystein Glutamin Glutamat Glycin (myo-)Inositol Isoleucin Lysin Methionin p-Aminobenzoesäure Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tyrosin Valin	0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 1 g/l 0,5 g/l 50 mg/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 1 g/l 0,5 g/l 1 g/l
	[über Nacht gelöst, dann sterilfiltriert]	



Mounting-Medium	Glycerin	900 mg/ml
	PBS	0,1 %
	p-Phenylendiamin	1 mg/ml
	DAPI	100 µg/ml
EasyPrep-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	15 % (w/v)
	Lysozym	2 mg/ml
	RNase A	0,2 mg/ml
	BSA	0,1 mg/ml
	[aufbewahrt bei -20 °C]	
Zuckerlösungen	20 % Glucose-Lösung wurde autoklaviert, alle anderen Zuckerlösungen (20 % Galaktose und 10 % Raffinose) wurden sterilfiltriert	
LSB (Lämmli Auftragspuffer, 2x)	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	10 %
LRB (Lämmli Laufpuffer, 10x)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
Lyse-Puffer (Polysomenpräparation)	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	30 mM
	Tris/HCl, pH 7.5	10 mM
Novozym-Lösung	Sorbitol	1 M
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml
PBS-Puffer	NaCl	100 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
	[mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt]	
Ponceau S	Ponceau S	1 g
	Eisessig	50 ml
	Wasser	ad 1 l
Puffer B	Sorbitol	1,2 M
	Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5)	100 mM
Puffer 3	NaCl	100 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	Igpal CA-630	0,1 %

RNase A	RNase A Tris/HCl, pH 7,5 NaCl [15 min gekocht, langsam abgekühlt]	10 mg/ml 10 mM 15 mM
TAE (50x)	Tris/Acetate, pH 8,0 EDTA TBS (10x) Tris/HCl, pH 7,6 NaCl	2 M 50 mM 200 mM 1,37 M
Transferpuffer	Glycin Tris-Base SDS (10 %) Methanol Wasser	2,9 g 5,8 g 3,7 ml 100 ml ad 1 l
TBS-T	TBS (10x) Tween 20 (10 %) Wasser	100 ml 10 ml ad 1 l
TE (10x)	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
Z-Puffer (pH 7.0)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM 50 mM
Sammelgel für SDS-PAGE (10 ml)	Wasser 30 % Acrylamid-Mix 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 SDS (10 %) APS (10 %) TEMED	6,8 ml 1,7 ml 1,25 ml 0,1 ml 0,1 ml 0,01 ml
Trenngel (10 %) für SDS-PAGE (20 ml)	Wasser 30 % Acrylamid-Mix 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 SDS (10 %) APS (10 %) TEMED	7,9 ml 6,7 ml 5,0 ml 0,2 ml 0,2 ml 0,008 ml

Für andere Prozentigkeiten wurden ebenso wie für das beschriebene Protokoll die Angaben aus *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* herangezogen [Maniatis *et al.* 1989]

## 6.8 Oligonukleotide

Tabelle 6.1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS0638	TCTCAACAGGCAAAGGAAGAAAGCAGTGATAGTGAGAATGAAAC TCGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC123</i> mittels pFA6-System
WS0639	ACAGGGTAATAAAAAGACGAATATATTCAAATGCGGGTTCTAAA TGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC123</i> mittels pFA6-System
WS0681	AAATCATGTTCCACAGGATCTCGTAGAAGCTAGTTTAAA 5'-Primer zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>CDC123</i>
WS0826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG <i>MAT</i> -Lokus-PCR [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS0827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG <i>MAT</i> -Lokus-PCR, $\alpha$ -spezifisch [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS0828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG <i>MAT</i> -Lokus-PCR, $\alpha$ -spezifisch [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS0831	GCGGATCCATGTCCTCACAAGAATATACAACCTTT 5'-Primer für die Amplifikation von <i>CDC123</i> mit einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS0832	GCTAAAGCTTTTAAGTTTCATTCTCACTATCACTGC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>CDC123</i> mit einer <i>Hind</i> III-Schnittstelle nach dem <i>TAA</i> Stopcodon
WS0978	GGTTGGGCAACCATTAAAAAGGGTACTACATTGGAACCCATCGCT CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCD11</i> mittels pFA6-System
WS0979	CCAGAAGTGTCAGTTTCCCTTCCTCCTAGCCCGTTTCTTATCTTC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCD11</i> mittels pFA6-System
WS1015	GAAGATTGCTTTGTCGAGACGTATC 5'-Primer zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>GCD11</i>
WS1018	GGCGAGCTCAAGCTTTCATAACCTGTG Fwd-Primer für die Amplifikation des <i>CDC123</i> -Promotors mit <i>Sac</i> I-Schnittstelle
WS1019	GGCGGATCCGTAATTTATGTCAGCGCT Rev-Primer für die Amplifikation des <i>CDC123</i> -Promotors mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
WS1025	GGCCCCTTGTTAATAATTCTTGCACGCATAC 5'-Primer zur Amplifikation der <i>cdc123</i> $\Delta$ : <i>kanMX4</i> Deletionskassette

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS1026	CAGGCATAATAAGCGGATATTTCCGATGTCC 3'-Primer zur Amplifikation der <i>cdc123Δ::kanMX4</i> Deletionskassette
WS1122	GGAATTCATGTCCTCACAAGAATATACAA 5'-Primer für die Amplifikation von <i>CDC123</i> mit einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1123	CCGCTCGAGCTAAGTTTCATTCTCACTATCA 3'-Primer für die Amplifikation von <i>CDC123</i> mit einer <i>XhoI</i> -Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1129	TTGGACATCTACTCCGATGAAGCTTCTGCTCAAAGAAGAGATTC CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>RPS2</i> mittels pFA6-System
WS1130	ATGGTTGATTATAAAAACTATTTTATAATTTGTAGACAACAAGC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>RPS2</i> mittels pFA6-System
WS1139	GGGAATTCGGATCCATGAGTGACTTACAAGACCAAGAACC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>GCD11</i> mit <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> -Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1140	CGTAGTCGACTTAAGCGATGGGTTCCAATGTAGTAC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>CDC123</i> mit einer <i>SalI</i> -Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1155	TATACCGACGAGTACGAGTACGAAGATGACGGATTATTTGAGCGT CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCD1</i> mittels pFA6-System
WS1156	TACTTACTTGGTCTCTATTAAGAGACTGAAGGAATATACATAAG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCD1</i> mittels pFA6-System
WS1157	ACTCCAAGTGCCGTTTCAGAAGAGTTAATCAAGATGTGGTATGAT CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCN3</i> mittels pFA6-System
WS1158	CTTTTCTCCTTTTCTATTAAGTCATTGCGTGCATATATTATGTG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>GCN3</i> mittels pFA6-System
WS1170	GCGAATTCATGTCCACTTCTCATTGCAG 5'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI2</i> mit einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1171	CCGCTCGAGTTACTCGTCGTCTGACTCATC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI2</i> mit einer <i>XhoI</i> -Schnittstelle nach dem Stoppcodon

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS1172	GCGGATCCCAATTGATGTCCTCCGATTTAGCTGC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI3</i> mit einer <i>Bam</i> HI und <i>Mun</i> I-Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1173	CCGCTCGAGTCACATTCTCCTTCTCTTACC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI3</i> mit einer <i>Xho</i> I-Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1188	TATAAAATCGCTAAAGAACGTCTTAACCCACCATCAAATCGTCGT CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>NIP1</i> mittels pFA6-System
WS1189	GATTTTTTGTTAAGAATGCTTTCGAAGTAGTTTTTGATTTTATTG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>NIP1</i> mittels pFA6-System
WS1215	AATAGATCTGACTCTGAAGACGATGAGGATGAGTCAGACGACGA G CGGATCCCCGGGTAAATTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SUI2</i> mittels pFA6-System
WS1216	AGTATGACACTTGAAAACACCTAGAAAAATTAGGCGCGGCAATG A GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SUI2</i> mittels pFA6-System
WS1240	GCGGATCCATGTCCACTTCTCATTGCAG 5'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI2</i> mit einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1241	CCGCTGCAGTTACTCGTCGTCTGACTCATC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI2</i> mit einer <i>Pst</i> I-Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1242	CCGCTGCAGTCACATTCTCCTTCTCTTACC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>SUI3</i> mit einer <i>Pst</i> I-Schnittstelle nach dem Stoppcodon

## 6.9 Plasmide

**Tabelle 6.2 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide**

(Sammlung: Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pWS1259	pGAL1-GFP-CDC123	pRS316	diese Arbeit
pWS1260	pGAL1-GFP-hD123	pRS316	diese Arbeit
pWS1261	EGFP-hD123	pEGFP-C3	Hoja <i>et al.</i> 2000
pWS1376	pCDC123-tCYC1	pRS416	diese Arbeit
pWS1377	pCDC123-hD123-tCYC1	pRS416	diese Arbeit
pWS1378	pCDC123-CDC123-tCYC1	pRS416	diese Arbeit
pWS1391	pGALL-cdc123-1-HA3	pRS306	diese Arbeit
pWS1241	ATGΔ-cdc123-1-HA3	pRS306	diese Arbeit
pWS1242	ATGΔ-cdc123-2-HA3	pRS306	diese Arbeit
pWS1317	ATGΔ-cdc123-4-HA4	pRS306	diese Arbeit
p180	GCN4-lacZ	Y Cp50	Hinnebusch 1985
pWS1468	pGALL-cdc123-1-HA3	pRS305	diese Arbeit
pWS1667	pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2	pWS968	diese Arbeit
pWS1722	pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3	pRS306	diese Arbeit
pWS1723	pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1	pRS304	diese Arbeit
pWS968	KpnI Schnittstelle in LEU2 des Plasmids pRS305 durch Mutagenese entfernt	pRS305	Sammlung
pWS1664	pGALL-GCD11-URA3	p416-GALL	diese Arbeit
pWS1053	ATGΔcdc123-HA3	pRS306	Sammlung
pWS1461	BD -DMA2	pEG202	Sammlung
pWS1463	BD -CDC123	pEG202	Sammlung
pWS1464	AD-CDC123	pJG4-5	Sammlung
pWS1465	BD -DMA1	pEG202	Sammlung
pWS1513	AD-GCD11	pJG4-5	Sammlung
pWS1535	BD -SUI3	pEG202	Sammlung
pWS1536	AD-SUI3	pJG4-5	Sammlung
pWS1537	BD-SUI2	pEG202	Sammlung
pWS1538	AD-SUI2	pJG4-5	Sammlung
pWS1466	AD-DMA1	pJG4-5	Sammlung
pWS1462	AD-DMA2	pJG4-5	Sammlung
pWS1512	BD-GCD11	pEG202	Sammlung
pWS1663	pGALL-GCD11-LEU2	p415-GALL	diese Arbeit
pJG4-5	2μ, TRP1 pGAL1-NLS-Transkriptionsaktivierungsdomäne-HA-tADH		Sammlung
pEG202	2μ, HIS3 pADH-lexA-tADH		Sammlung

## 6.10 Hefestämme

**Tabelle 6.3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme**

(SH: Stammhintergrund, Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	S288C	[Brachmann <i>et al.</i> 1998]
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>	S288C	[Brachmann <i>et al.</i> 1998]
BY4743	<i>MATa /α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 MET/met15Δ0 LYS2/lys2Δ0</i>	S288C	[Brachmann <i>et al.</i> 1998]
K699	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K700	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K800	<i>MATa /α ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100 his3-11/his3-11 leu2-3,-112/leu2-3,-112 trp1-1/trp1-1 ura3-2/ura3-2 ssd1/ssd1</i>	W303	Sammlung
W1813	<i>MATa trp1 his3 6lexAop-LEU2 ura3::8lexAop-lacZ-URA3</i>	EGY48	Sammlung
W2347	<i>MATa dma1Δ::His3MX6 dma2Δ::TRP1</i>	W303	Sammlung
W2841	<i>MATα CDC123-HA3-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit
W3129	<i>MATα cdc123Δ327-HA3-natMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	Sammlung
W3228	<i>MATα cdc123::cdc123-4-HA3-URA3</i>	W303	Sammlung
W3439	<i>MATα cdc123::cdc123-1-HA3-URA3 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	Sammlung
W3440	<i>MATα cdc123::cdc123-2-HA3-URA3 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	Sammlung
W3679	<i>MATα cdc123::CDC123-HA3-URA3</i>	S288C	Sammlung
W3702	<i>MATa cdc123Δ327-HA3-natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W3787	<i>MATα cdc123::cdc123-1-HA3-URA3 pre9Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W3922	<i>MATα cdc123::cdc123-1-HA3-URA3</i>	S288C	diese Arbeit
W3963	<i>MATα cdc123::cdc123-1-HA3-URA3 dep1Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W4172.1	<i>MAT<math>\alpha</math> SIC1-MYC13-HIS3MX6</i>	S288C	Sammlung
W4177	<i>MATa GCD11-MYC13-kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4266	<i>MATa cdc123::CDC123-HA3-URA3</i>	S288C	diese Arbeit
W4271	<i>MAT<math>\alpha</math> cdc123::cdc123-1-HA3-URA3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4296	<i>MATa /<math>\alpha</math> GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4444	<i>MAT<math>\alpha</math> cdc123<math>\Delta</math>::kanMX4 ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W4467	<i>MATa /<math>\alpha</math> GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4469	<i>MATa /<math>\alpha</math> GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/cdc123<math>\Delta</math>327-HA3-natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4470	<i>MATa /<math>\alpha</math> GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/ cdc123::cdc123-1-HA3-URA3</i>	S288C	diese Arbeit
W4471	<i>MATa ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W4675	<i>MATa ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123<math>\Delta</math>::kanMX4 pre9<math>\Delta</math>::natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W4745	<i>MATa /<math>\alpha</math> CDC123/cdc123<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W4828	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123<math>\Delta</math>::kanMX4 dma1<math>\Delta</math>::HIS3MX6 dma2<math>\Delta</math>::TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W4883	<i>MATa GCD11-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4885	<i>MATa GCD1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4889	<i>MATa GCN3-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4893	<i>MATa /<math>\alpha</math> GCN3/gcn3<math>\Delta</math>::kanMX4 CDC123/cdc123<math>\Delta</math>327-HA3-natMX4 p180</i>	S288C	diese Arbeit
W4895	<i>MATa/<math>\alpha</math> CDC123/cdc123<math>\Delta</math>::kanMX4 leu2/leu2::pGALL-cdc123-1-HA3-LEU2 p180</i>	W303	diese Arbeit
W4896	<i>MATa /<math>\alpha</math> CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4897	<i>MATa /<math>\alpha</math> CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4898	<i>MATa /<math>\alpha</math> CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit



Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W4899	<i>MATa /α CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4901	<i>MATa /α GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4902	<i>MATa /α GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4903	<i>MATa /α GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4904	<i>MATa /α GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4905	<i>MATa /α GCD1/GCD1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4906	<i>MATa /α GCN3/GCN3-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4907	<i>MATa /α RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4908	<i>MATa /α GCD1/GCD1-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4909	<i>MATa /α GCN3/GCN3-MYC13-kanMX6 RPS2/RPS2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4921	<i>MATα ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 DMA1-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W4922	<i>MATα ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 DMA2-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W4964	<i>MATa ura3::pGALL-CDC123-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W4992	<i>MATa /α GCD11/gcd11Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W5077	<i>MATa CDC123-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5102	<i>MATa /α CDC123-MYC13-HIS3MX6/CDC123- HA3-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit
W5116	<i>MATa /α CDC123/CDC123-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5153	<i>MATa /α NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5154	<i>MATa /α CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5155	<i>MATa /α GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 NIP1/NIP1-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5290	<i>MATα SUI2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5292	<i>MATa /α CDC123/CDC123-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W5293	<i>MATa /α SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5295	<i>MATa /α CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6 SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5298	<i>MATa /α GCD11/GCD11-MYC13-kanMX6 CDC123/CDC123-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5369	<i>MATa /α SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6 CDC123/CDC123-MYC13-kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5370	<i>MATa /α SUI2/SUI2-HA3-HIS3MX6 GCD11/GCD11-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5387	<i>MATa ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5388	<i>MATa ura3::pGALL-cdc123-1-HA3-URA3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-LEU2 dma1Δ::His3MX6 dma2Δ::TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W5454	<i>MATa /α cdc123Δ::kanMX4/cdc123Δ::kanMX4 pGAL1-GFP-CDC123 (pWS1259)</i>	S288C	diese Arbeit
W5455	<i>MATa /α cdc123Δ::kanMX4/cdc123Δ::kanMX4 pGAL1-GFP-hD123 (pWS1260)</i>	S288C	diese Arbeit
W5473	<i>MATa /α CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5474	<i>MATa cdc123Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2 (pWS1663)</i>	S288C	diese Arbeit
W5475	<i>MATα cdc123Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2 (pWS1663)</i>	S288C	diese Arbeit
W5476	<i>MATa gcd11Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2 (pWS1663)</i>	S288C	diese Arbeit
W5477	<i>MATα gcd11Δ::kanMX4 pGALL-GCD11-LEU2 (pWS1663)</i>	S288C	diese Arbeit
W5495	<i>MATa cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5496	<i>MATa cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5497	<i>MATa CDC123 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5498	<i>MATα CDC123 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W5514	<i>MATa pre9Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W5515	<i>MATa dep1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W5539	<i>MATa cdc123Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W5540	<i>MATα cdc123Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5541	<i>MATα trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5542	<i>MATa ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W5544	<i>MATa cdc123Δ::kanMX4</i> <i>trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5546	<i>MATa trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W5548	<i>MATα ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5591	<i>MATa ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5592	<i>MATα cdc123Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pTEF2-SUI2-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-SUI3-tCYC1-TRP1</i> <i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
YTH3	<i>CDC33(-182,1)::kanMX4-tTA-tetO<sub>7</sub></i>	[von der Haar <i>et al.</i> 2002]	

## 7 METHODEN

### 7.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Amplifikation von *E. coli*- bzw. Hefeshuttlevektoren wurde *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  verwendet (Genotyp: *supE44*  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*).

#### 7.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) bzw. Kanamycin (30 $\mu$ g/ml) bei 37 °C.

#### 7.1.2 Herstellung elektrokompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 750 ml TB-Medium mit 40 OD<sub>600</sub> DH5 $\alpha$ -Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft und ca. 20 h bei Raumtemperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in einem 2-Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, dann bei 4 °C und 3000 Upm für 15 min abzentrifugiert und anschließend in 300 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurden die Zellen pelletiert und in 20 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 Upm, 10 min) wurde das Pellet in 1 ml kaltem 10 % Glycerin gelöst, jeweils Aliquots zu 50  $\mu$ l auf Trockeneis eingefroren und bei -70 °C gelagert.

#### 7.1.3 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 50  $\mu$ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-2  $\mu$ l DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Plattenabstand) überführt. Der Strompuls wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Feldstärke 12,5 kV/cm

Widerstand 200  $\Omega$

Kapazität 25  $\mu$ F

Kondensatorspannung 2,5 kV

Nach dem Strompuls wurden die Zellen sofort in 1 ml dYT-Medium überführt und für die phänotypische Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde auf LB-Ampicillin-Platten auf resistente Klone selektiert.

## **7.2 Arbeiten mit Hefe**

### **7.2.1 Kultivierung von Hefe**

Zur Kultivierung von Hefe wurde XY-Vollmedium verwendet, das Glucose (D), Galaktose (G) oder Raffinose (R) als Kohlenstoffquelle enthielt. Vorkulturen wurden in Röhrchen auf einem Roller angezogen. Größere Zellmengen, die zur experimentellen Auswertung bestimmt waren, wurden in Glaskolben im Schüttelwasserbad unter definierten Bedingungen kultiviert.

### **7.2.2 Konservierung von Hefestämmen**

Um Hefezellen dauerhaft zu konservieren, wurden über Nacht auf XYD-Platten (andere Medien wenn notwendig) gewachsene Zellen mit einem sterilen Zahnstocher in 15 % Glycerin suspendiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **7.2.3 Kreuzung haploider Hefestämme**

Um haploide Hefestämme entgegengesetzten Paarungstyps zu kreuzen, wurden diese über Nacht auf geeigneten Platten kultiviert. Anschließend wurden kleine Mengen der Stämme auf Vollmediumsplatten miteinander vermengt und abhängig von den Ausgangsstämmen entweder bei  $25^{\circ}\text{C}$  oder  $30^{\circ}\text{C}$  mindestens 5 h oder über Nacht inkubiert. Um auf diploide Nachkommen zu selektieren, wurde das Zellmaterial auf einem geeigneten Selektivmedium auf Einzelkolonien ausgestrichen.

Gab es keine Möglichkeit der Selektion wurden nach der Kreuzung mit Hilfe des Mikromanipulators Zygoten auf einer Vollmediumsplatte ausgelegt. Um anschließend sicher zu gehen, dass es sich um diploide Zellen handelt, wurde der Paarungstyp mit Hilfe von PCR (7.4.8) überprüft bzw. die Fähigkeit zur Sporulation (7.2.4) überprüft.

### **7.2.4 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse**

Unter Kohlenstoff- und Stickstoffmangelbedingungen durchlaufen diploide Hefezellen einen meiotischen Zellteilungszyklus und bilden vier von einem Ascus umschlossene haploide Sporen aus (Tetrade). Um unter Laborbedingungen diesen, als Sporulation bezeichneten Vorgang möglichst rasch zu induzieren, wurden diploide Zellen in 2 ml nährstoffreichem Prä-

Sporulationsmedium angeimpft und bei Raumtemperatur auf einem Roller kultiviert. Nach Mindestens 5 h wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 Upm, 2 min) und in 2 ml Sporulationsmedium gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen und bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Die Sporulation dauerte je nach Stammhintergrund etwa 3 (W303) oder 6 (S288C) Tage. Danach wurden 50 µl der Sporen-Suspension mit 50 µl Novozym-Lösung gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vereinzlung und Positionierung der Sporen erfolgte auf einer Vollmediumsplatte mit Hilfe eines Mikromanipulators. Nach 2 bis 4 Tagen waren die einzelnen Sporen zu Kolonien herangewachsen und wurden auf ihren Phänotyp hin untersucht.

### 7.2.5 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

[Gietz *et al.* 2002] Es wurden etwa  $1,6 \times 10^7$  ( $1,6 \text{ OD}_{600}$ ) Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert und 2 mal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand quantitativ abgenommen. Anschließend wurden die Komponenten des Transformationsmix einzeln zugegeben und durch vortexen ( $2 \times 15 \text{ s}$ ) gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde 20 min bei Raumtemperatur und anschließend weitere 15 min bei  $42^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert ( $13000 \text{ Upm}$ ,  $12 \text{ s}$ ), das Pellet in  $400 \mu\text{l}$  sterilem Wasser aufgenommen und auf geeigneten Selektionsplatten verteilt. Im Falle der Selektionsmarker *nat* und *kan* wurden die Zellen vor der Selektion mindestens 3 h in Vollmedium ohne Antibiotikum kultiviert, um den Transformanten genügend Zeit zur Ausprägung der Resistenz zu geben.

Transformationsmix:	
PEG 3500 50% w/v	240 µl
LiAc 1.0 M	36 µl
Heringssperma DNA	50 µl
DNA + Wasser	34 µl
gesamt	360 µl

### 7.2.6 Synchronisation von Hefekulturen durch zentrifugale Elutriation

Bei der zentrifugalen Elutriation werden die Zellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe und Morphologie mechanisch getrennt. Der Elutriator ist eine Durchflusszentrifuge, bei der sich die konzentrierte Zellsuspension in einer Kammer befindet und sich im Schwerkraftfeld

entlang eines Gradienten auftrennt. Die Ausbildung dieses Gradienten wird durch Regulation der Durchflussgeschwindigkeit des Mediums durch die Kammer im Gegenstrom zur Zentrifugalkraft erreicht. Auf diese Weise lassen sich am Ausgang der Kammer kleine Zellen ohne Knospe (G1 - Zellen) ernten, die nicht wie bei anderen Methoden der Synchronisation chemisch oder physikalisch in ihrem Wachstum beeinflusst wurden.

Für die Elutriation wurden ca. 5000 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet (GS3, 4000 Upm, 15 min, 4°C), in 50 ml kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und durch Ultraschall (5 Pulse zu 1 s) getrennt. Die Zellsuspension wurde in die Elutriationskammer (3600 Upm, 4°C) gepumpt und das Fließgleichgewicht über die Pumpgeschwindigkeit so eingestellt, dass die Zellen noch nicht die Kammer verließen. Anschließend wurde die Pumpgeschwindigkeit langsam erhöht, bis kleine G1-Zellen mit dem Flüssigkeitsstrom aus der Kammer gespült wurden. Diese stark verdünnte Zellsuspension wurde in Fraktionen gesammelt und abzentrifugiert (GSA, 4000 Upm, 10 min, 4°C). Die Fraktionen wurden in kaltem XY-Medium ohne Kohlenstoffquelle aufgenommen und vereinigt. Zum starten des Versuchs mit den synchronen Kulturen wurde der gewünschte Zucker zum Medium gegeben (2 % Endkonzentration) und die Kulturen bei der entsprechenden Temperatur geschüttelt.

## **7.3 Färbung und Mikroskopie von Hefezellen**

### **7.3.1 Ethanolfixierung von Hefezellen**

Hefezellen können mit 70 % Ethanol fixiert werden. Hierzu wurden 0,5 OD<sub>600</sub> Zellen abzentrifugiert, in 150 µl Wasser resuspendiert und dann mit 350 µl Ethanol (100 %) gemischt. In diesem Zustand können Zellen 1-2 Jahre aufbewahrt werden. Da die Zellen beim Fixieren agglomerieren, wurden sie vor deren Untersuchung zur Vereinzelung in Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und mit Ultraschall behandelt.

### **7.3.2 Formaldehydfixierung von Hefezellen**

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert. Dazu wurden 5 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von etwa 1 OD<sub>600</sub>/ml mit 605 µl Formaldehyd (37 %) gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert, einmal in 1ml Puffer B gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer B aufgenommen. In diesem Zustand sind die Proben gekühlt nicht länger als 1 Woche haltbar und verlieren schnell an Qualität; sie wurden deshalb spätestens am nächsten Tag weiterverarbeitet.

### 7.3.3 DNA-Färbung mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Ethanolfixierte Zellen wurden zur Vereinzelnung mit Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und Ultraschall-behandelt. Anschließend wurden 3 µl Zellen auf einem Objektträger mit etwa 2 µl Mounting-Medium gemischt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 7.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Lokalisation von Proteinen in formaldehydfixierten Zellen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt [Pringle *et al.* 1991]. Dabei werden Proteine von einem spezifischen primären Antikörper erkannt und durch einen IgG-spezifischen sekundären Antikörper, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

#### 7.3.4.1 Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin

Auf die verwendeten Multiwell Objektträger wurde pro Vertiefung 20 µl Polylysine (MW > 300000 1mg/ml) gegeben und für ca. 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Wells vier mal mit 50 µl Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. In diesem Zustand können die Objektträger staubfrei gelagert werden.

#### 7.3.4.2 Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz

Formaldehydfixierte Zellen (Fixierzeit 1 h) wurden in einem Volumen von 1 ml mit Puffer B auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt. Durch Zugabe von 25 mM DTT und 0,1 mg/ml Zymolyase wurde die Zellwand für ca. 10-30 min bei 37 °C verdaut. Danach wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert und vorsichtig in 500 µl Puffer B resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 40 µl auf einen zuvor mit Polylysin beschichteten Multiwell-Objektträger aufgebracht. Nach etwa 5 min wurde das Volumen wieder abgenommen und die Zellen für 1 h mit jeweils 45 µl PBS/BSA (1 mg/ml) pro Well in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde das PBS/BSA wieder abgenommen und die Objektträger über Nacht mit dem in PBS/BSA verdünnten primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erst fünf Mal fünf Minuten mit jeweils 45 µl PBS/BSA gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper in PBS/BSA zugesetzt wurde. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Proben erneut 5 Mal 5min mit PBS/BSA gewaschen und dann mit etwa 2 µl Mounting-Medium überschichtet. Der Objektträger wurde mit einem Deckglas abgedeckt und mit Lack versiegelt.



### 7.3.5 Actinfärbung

Actin kann durch Färbung mit Farbstoff gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht werden [Adams *et al.* 1991]. Hierzu wurden formaldehydfixierte Zellen 2 mal mit 1 ml PBS gewaschen, um sie danach in 1 ml PBS aufzunehmen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 10 µl Phalloidin gekoppelt mit Alexa488 (6,6 µM in MeOH) 1 h im Dunkeln auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Mal mit 1 ml PBS gewaschen bevor sie an dem Mikroskop dokumentiert wurden.

### 7.3.6 Mikroskopie

Zur Beobachtung und Dokumentation von Hefezellen wurde ein Axioplan2 Imaging Mikroskop mit einer AxioCam MRm der Firma Zeiss verwendet. Die Steuerung des Mikroskops und der Kamera, sowie die Auswertung und Vermessung der Bilder erfolgte mit Hilfe der AxioVision 4.3 Software von Zeiss.

### 7.3.7 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt ethanolfixierter Zellen festgestellt [Haase *et al.* 1997]. Dabei wurde die DNA mit dem Fluorochrom Sytox Green angefärbt. Ethanolfixierte Zellen wurden in 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen, anschließend in 500 µl Natriumcitrat-Puffer aufgenommen und mit Ultraschall behandelt. Danach wurden 0,2 OD<sub>600</sub> Zellen in einem Volumen von 300 µl Natriumcitrat-Puffer mit 15 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 50 °C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Zellen erneut 1 h bei 50 °C geschüttelt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl Natriumcitrat (50 mM, pH 7,0) mit 1 µM Sytox Green resuspendiert und mindestens 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei etwa 8°C im Dunkeln gefärbt. Zur Messung im Durchflusszytometer (Partec CA-III) wurden 10-20 µl der Probe in 1 ml Tris/HCl (0,5 M, pH 7,5) verdünnt. Die Daten wurden mit der Software WinMDI ausgewertet.

## 7.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

### 7.4.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

#### 7.4.1.1 Plasmidschnellisolierung [Berghammer *et al.* 1993]

Mit dieser Methode können Plasmide mit hoher Kopienzahl aus *Escherichia coli* präpariert werden. Die erhaltene DNA ist noch mit Proteinen verunreinigt, kann aber für Restriktionsanalysen verwendet werden. 2 ml einer Übernachtskultur wurden bei 14000 Upm in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 2 min abzentrifugiert und das Pellet in 40 µl EasyPrep-Puffer resuspendiert. Nach etwa 5 min wurde die Probe für 1 min zu 100°C gestellt und dann auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 15 min) befindet sich die Plasmid-DNA im Überstand, während Zelldebris und genomische DNA ein kompaktes Pellet bilden. Für einen Restriktionsverdau wurden 2 µl des Überstandes verwendet.

#### 7.4.1.2 Säulenreinigung von Plasmid-DNA

Für die Säulenreinigung von Plasmid-DNA wurde der Minipräparationskit der Firma Qiagen verwendet. Für eine größere DNA-Ausbeute erfolgte die Plasmidpräparation mit Hilfe des JETSPIN-Kits von Genomed. Die Durchführung entsprach jeweils den Angaben des Herstellers.

### 7.4.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von  $E_{260} = 1,0$  entspricht hierbei einer DNA Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA oder 20 ng/µl einzelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung diente der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm.

### 7.4.3 Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen

Die Isolierung genomischer DNA beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand, anschließender Zellyse durch Detergenzbehandlung und alkoholischer Fällung der DNA [Cryer *et al.* 1975; Fujimura *et al.* 1993]. Die isolierte DNA kann für PCR-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente oder die Rettung eines integrierten Plasmides verwendet werden. 5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, in 1 ml Wasser gewaschen und in 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurden ca. 0,3 g Glasperlen zugegeben und der Ansatz 5 min im Kühlraum in

einer Retschmühle geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl Tris/SDS/EDTA wurde die Lösung 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben, die Probe auf Eis 10 min inkubiert und dann nach 5 min Zentrifugation bei 14000 Upm der Überstand abgenommen. Die DNA wurde mit 1 ml 100 % Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde kurz abzentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet 15 min getrocknet. Anschließend wurde es in 300 µl 1xTE und 50 µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen und bei 65°C 30 min inkubiert. Die DNA wurde mit 500 µl 100 % Isopropanol erneut gefällt. Vor dem Trocknen wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und die DNA danach in 50 µl 1xTE gelöst.

#### **7.4.4 Gelelektrophorese von DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der man DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen kann. Sie dient der Reinheitsprüfung, Identifizierung, Trennung und Längenbestimmung von DNA, sowie zur Reinigung von Restriktions- bzw. PCR-Fragmenten.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 0,8 % - 1 % Agarose ultra pure in TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Gießvorrichtung (Hofer) gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer (Hofer HE33) überführt und die zu trennende DNA mit 10fach Auftragspuffer gemischt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromspannung von 80 V. Als Referenz diente der 1kb DNA Längenstandard von Gibco.

#### **7.4.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde der Gel-Extraktionskit der Firma Qiagen eingesetzt. Dieses System wurde auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten direkt nach der DNA-Amplifikation verwendet. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

#### 7.4.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde folgender Ansatz verwendet:

##### Standardansatz (20 µl)

DNA	0,5-1 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	2-10 U
H <sub>2</sub> O	Restvolumen

Die Wahl des Puffers und der Temperatur sowie die Art der Enzymaktivierung wurden an das verwendete Restriktionsenzym angepasst. Die Dauer des Restriktionsverdaus betrug 1-2 h.

#### 7.4.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde folgender Ansatz verwendet:

##### Standardansatz (10µl)

Vektor-DNA	ca. 15-20 ng
Insert-DNA	vier- bis sechsfacher Überschuss
T4-DNA-Ligase	1 U
10x Ligase-Puffer	1 µl
H <sub>2</sub> O	Restvolumen

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur mindestens 3h, meist über Nacht.

#### 7.4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) können spezifisch DNA-Fragmente amplifiziert werden [Mullis *et al.* 1986]. Der zu amplifizierende Bereich wird durch Verwendung von Oligonukleotidprimern definiert, die zu Bereichen des Zielfragments homolog sind. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase kann das Fragment in mehreren Zyklen im Idealfall exponentiell vermehrt werden. Das Produkt kann kloniert, im Agarosegel analysiert oder zur Genommanipulation direkt in Hefe transformiert werden.

Im analytischen Maßstab wurde auf diese Weise die Integration von Plasmiden ins Hefegenom oder auch die Genommanipulation durch transformierte PCR-Produkte

(Epitopmarkierung, Deletion) sowie der Paarungstyp überprüft. Dabei diente entweder isolierte genomische DNA (7.4.3) oder auch direkt Hefekolonien (7.4.8.2) als Template. Im präparativen Maßstab wurde die PCR- Methode angewendet, um Hefegene aus genomischer DNA zu vervielfältigen und sie anschließend zu klonieren.

Die PCR-Reaktionen wurden typischerweise in einem Ansatz von 50 µl durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte:

Standard PCR-Ansatz (50 µl)

<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	3 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Template DNA	x µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Temperaturprofil**

Denaturierung	94°C	4 min
10 - 30 Zyklen	Deneaturierung	94°C      45 s
	Annealing	56°C      45 s
	Amplifikation	72°C      2 min 20s
Restamplifikation	72°C	5 min

Zeiten und Temperaturen wurden den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Für eine präparative PCR wurde an Stelle der *Taq*-DNA-Polymerase eine DNA-Polymerase mit Korrekturaktivität eingesetzt (*Pfu*-Polymerase).

#### 7.4.8.1 PCR zur Genommanipulation [Longtine *et al.* 1998]

Um Proteine mit einem HA3- oder MYC13-Epitop zu markieren oder auch um ein Gen gezielt zu deletieren, wurde das pFA6a-System von Longtine *et al.* verwendet. Hierbei werden die Primer so konstruiert, dass sie jeweils 45-50 bp homolog zu der Sequenz der geplanten homologen Rekombination im Hefegenom und 20 bp homolog zu der zu amplifizierenden Sequenz des pFA6a-Plasmids sind. Von dem erhaltenen PCR-Produkt wurden 10 - 15 µl direkt in Hefe transformiert. Eine erfolgreiche Manipulation wurde ebenfalls mittels PCR verifiziert. Die PCR zur Amplifikation der Konstrukte sah folgendermaßen aus:

##### Reaktionsansatz (50 µl)

<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	3 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Plasmid- DNA (pFA6a) ca. 50 ng	1 µl
H <sub>2</sub> O	29,5 µl

##### **Temperaturprofil**

Denaturierung	94°C	4 min
25 Zyklen	Denaturierung	94°C 45 s
	Annealing	56°C 45 s
	Amplifikation	72°C 2 min 20s
Restamplifikation	72°C	5 min

### 7.4.8.2 Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR

Für die Paarungstyp-Bestimmung per PCR [Huxley *et al.* 1990] wurde eine DNA-Extraktion mit SDS vorgenommen [Akada *et al.* 2000]. Dazu wurde mit einer sterilen Plastik-Pipettenspitze Zellmaterial aufgenommen und in 20 µl einer 0,25 % SDS-Lösung resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, 14000 Upm) wurde der Überstand als Matrize für die PCR eingesetzt:

#### Reaktionsansatz MAT-PCR (25 µl)

Überstand aus der DNA-Extraktion	0,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer (10x)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl
Primer MIX 10 pmol/µl (WS826, WS827 und WS828)	3 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
H <sub>2</sub> O	14,85 µl

#### Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	4 min
35 Zyklen	Deneaturierung	94°C    1 min
	Annealing	55°C    1 min
	Amplifikation	72°C    40 s
Restamplifikation	72°C	3 min

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Amplifikat in einem Agarosegel analysiert. Im Fall von *MATa*-Zellen ergibt sich ein DNA-Produkt von 544 b und im Fall von *MATα*-Zellen ein Produkt von 404 b. Ist die Zelle diploid werden beide Fragmente amplifiziert.

## 7.5 Proteinanalytische Methoden

### 7.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen

Die Proteinextrakte wurden durch mechanischen Aufschluss von Hefezellen mittels Glasperlen hergestellt. Es wurden mindestens  $5 \times 10^7$  Hefezellen aus der exponentiellen Wachstumsphase in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (Megafuge, 2000 Upm, 2 min) und das Pellet in 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 150  $\mu$ l Puffer3 resuspendiert, in ein Schraubdeckelgefäß mit 0,3 g Glasperlen (0,45 – 0,5 mm) überführt und auf Trockeneis schockgefroren. Für den Zellaufschluss wurde die Probe auf Eis aufgetaut und im Kühllabor in der Retschmühle 5 min bei maximaler Frequenz geschüttelt. Anschließend wurden die Zellfragmente 2 min bei 13000 Upm in der Kühlzentrifuge pelletiert. 40  $\mu$ l des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Für die Proteinbestimmung wurde ein Aliquot des Überstandes 1:1000 verdünnt und 1:2 mit Bradfordreagenz gemischt. Die Probe wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die OD bei 595 nm bestimmt. Auf eine Erstellung einer Kalibriergeraden für das Bradfordreagenz wurde verzichtet, da nur die relativen Proteinkonzentrationen für eine gleichmäßige Ladung des Gels wichtig sind.

### 7.5.2 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurden spezifische Proteine aus einem Proteinlysat gereinigt bzw. stark angereichert [Harlow *et al.* 1998]. Dazu wurden 150 ml Kultur mit einer Zelldichte von etwa 0,8 OD<sub>600</sub> in vier Portionen in der Retschmühle aufgeschlossen (vgl. 7.5.1) und die Proben 2 min bei 13000 Upm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und nochmals für 9 min zentrifugiert. 30  $\mu$ l des Überstandes wurden mit Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und für 5 min gekocht. Diese Probe entspricht dem Kontrolllysate. Ein weiteres Aliquot des Überstandes diente zur relativen Bradford-Proteinbestimmung. Der Rest des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Ansätze, die später vergleichbar sein sollten, im Gesamtvolumen von 1 ml die gleiche Proteinmenge enthalten. Etwaige Verdünnungen wurden mit Puffer 3 durchgeführt. Daraufhin wurden die 1 ml-Ansätze mit dem jeweiligen Antikörper gemischt und für 2 h auf Eis inkubiert. Dann wurden 50  $\mu$ l Protein A-Agarose (zuvor 3 Mal mit je 1 ml Puffer 3 gewaschen) zugegeben und für weitere 2 h auf einem Rad im Kühllabor inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Agarose kurz abzentrifugiert und



insgesamt dreimal mit 1 ml kaltem Puffer 3 gewaschen. Zum Schluss wurde der Puffer mit einer Hamilton-Spritze quantitativ abgenommen und die Agarose mit 30  $\mu$ l 1 x Lämmli-Puffer (2 x LSB 1:2 mit Puffer 3 verdünnt) vermischt und dann für 5 min zu 100°C gestellt. Für die Analyse im Western-Blot wurden 3  $\mu$ l des Präzipitats analysiert und 9  $\mu$ l auf das Gel für den Nachweis co-präzipitierter Proteine aufgetragen.

### **7.5.3 Erzeugung postribosomaler Überstände**

Diese Methode dient dazu einen Überstand eines Zelllysates herzustellen, der frei von Ribosomen ist. Dazu wurden 150 ml Kultur mit einer Zelldichte von etwa 0,8 OD<sub>600</sub> in vier Portionen in der Retschmühle aufgeschlossen (vgl. 7.5.1) und die Proben 1 min bei 13000 Upm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und nochmals für 5 min zentrifugiert. 30  $\mu$ l des Überstandes wurden mit Lämmli-Auftragspuffer (2 x) gemischt und für 5 min gekocht (Lysatprobe). Nach einer Bradford-Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Proteinmengen in 1 ml Volumen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Notwendige Verdünnungen wurden mit Puffer 3 durchgeführt. Nach der Zentrifugation (53000 Upm, 4°C, 2 h, Ultrazentrifuge Optima™ TL, Rotor: TLA 100.3) bei 150 000 g wurden 800  $\mu$ l des Überstandes für eine Immunpräzipitation entnommen. Weitere 30  $\mu$ l wurden mit Lämmli-Auftragspuffer (2 x) gemischt und für 5 min gekocht (Überstand-Probe). Der Rest des Überstandes wurde vollständig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde wieder in 1 ml Puffer 3 aufgenommen und so weit wie möglich resuspendiert. Ungelöste Bestandteile wurden kurz abzentrifugiert. 800  $\mu$ l wurden für die Immunpräzipitation entnommen und wieder 30  $\mu$ l mit Lämmli-Auftragspuffer (2 x) gemischt und für 5 min gekocht (Pellet-Probe).

### **7.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine können in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Dies geschieht unter denaturierenden Bedingungen. Durch SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol wird die Sekundärstruktur der Proteine zerstört, so dass sich die Faltung der Proteine nicht mehr auf das Laufverhalten auswirkt. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden einander anhand der gemessenen OD<sub>595</sub> angepasst. Die Gelelektrophorese wurde mit 30 mA pro Gel durchgeführt. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für die Western-Blot-Analyse verwendet.

### **7.5.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen**

Bei der Western-Blot-Analyse wurden die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit spezifischen primären und HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern nachgewiesen. Zum Transfer wurde auf eine Graphitelektrode ein mit Transferpuffer getränktes Whatman GB004, darauf eine in Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran, das Gel und abschließend wieder ein mit Transferpuffer getränktes Whatman GB004 luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Die zweite Elektrode deckte diesen Aufbau ab. Der Transfer erfolgte 70 min bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S gefärbt, um eine gleichmäßige Beladung und den gleichmäßigen Transfer überprüfen zu können. Zur Dokumentation wurde überschüssiger Farbstoff mit Wasser abgewaschen und die Membran eingescannt. Danach wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in TBS-T-Milch (5 % Magermilchpulver in TBS-T gelöst) geblockt. Die Inkubation mit dem in 5 ml TBS-T-Milch verdünnten primären Antikörper erfolgte bei etwa 8°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal 5 min mit je 10 ml TBS-T gewaschen und dann in 5 ml TBS-T-Milch mit dem sekundären Antikörper versetzt. Nach 1-3-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut 3 mal 5 min mit je 10 ml TBS-T-Milch gewaschen und in TBS-T aufgenommen. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mit dem Chemiluminescence Blotting Substrat (Roche, 10 µl Reagenz A mit 990 µl Reagenz B gemischt) und durch Auflegen eines Röntgenfilms, der an Stellen der Antikörperbindung geschwärzt wird.

## **7.6 Polysomen-Analyse**

Bei der Polysomenanalyse wird ein Zellysate durch Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten aufgetrennt. Durch die Vermessung des Gradienten bei 254 nm kann die Position der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit (40S und 60S) sowie der Monosomen (80S) und Polysomen bestimmt werden. Das Verhältnis von Polysomen zu Monosomen lässt einen Schluss auf die Effizienz der Translationsinitiation zu.

### **7.6.1 Herstellung von Saccharosegradienten**

Für die Herstellung von 10 % – 50 % Saccharosegradienten wurden Stammlösungen von 10 %, 20 %, 30 %, 40 % und 50 % Saccharose in Lyse-Puffer hergestellt und sterilfiltriert. Zu Beginn wurden 2,18 ml der 50 % Saccharose-Lösung in ein 12 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (PK 50, Sorvall) gegeben und bei -70°C eingefroren. Nachdem diese Schicht durchgefroren war, wurde jeweils mit der nächst niederprozentigen Lösungen

überschichten und erneut eingefroren. Am Abend vor der Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen zu 4°C gestellt, so dass sich der Gradient bis zum nächsten Morgen einstellen konnte.

Die Herstellung von Saccharosegradienten mit 7,5 % – 30 % erfolgte nach dem gleichen Prinzip, jedoch mit Stammlösungen zu 7,5 %, 13,13 %, 18,75 %, 24,38 % und 30 %.

### **7.6.2 Auftrennung der Polysomen in Saccharosegradienten**

Pro Gradient wurden 100 ml Kultur bei einer  $OD_{600} = 0,4 - 0,8$  geerntet (3000 Upm, 3 min) in 4 ml kaltem Lyse-Puffer mit 100 µg/ml Cycloheximid (Chx) gewaschen und anschließend in 900 µl Lysepuffer mit Chx aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in vier Schraubdeckelgefäßen mit ca. 0,3 g Glasperlen 5 min in der Retschmühle im Kühllabor. Zelltrümmer wurden zuerst 5 min bei 4500 Upm abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und erneut 5 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Es wurde die Absorption der Überstände bei 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt und ein Volumen entsprechend  $14 A_{260}$  auf einen Gradienten überschichtet.

Die Auftrennung der Polysomen in 10 % – 50 % Gradienten erfolgte 170 min bei 34000 Upm in einem TH-641 Rotor (Sorvall) mit einer Ultrazentrifuge (Optima™ LE-80K, Beckman Coulter). Dies entspricht durchschnittlich ca. 145000 g. Die Auftrennung der Polysomen in 7,5 % – 30 % Gradienten erfolgte 5 h bei 35000 Upm. Dies entspricht durchschnittlich ca. 154000 g. Anschließend wurde ein dünner Schlauch vorsichtig bis auf den Boden des Zentrifugenröhrchens abgesenkt, der Gradient mit 0,8 ml/min leergepumpt und bei der Wellenlänge 254 nm vermessen.

Für eine Fraktionierung wurden jeweils zwei Gradienten beladen und zentrifugiert. Ein Zentrifugenröhrchen wurde unten mit einer Kanüle angestochen und langsam in Fraktionen zu ca. 600 µl leergetropft. Enthaltene Proteine wurden durch 5 % Trichloracetat (TCA) gefällt, mit Aceton gewaschen, getrocknet und anschließend in 40 µl 1 x LSB aufgenommen. Aus diesen wurden 8 µl auf ein SDS-Gel geladen. Der zweite Gradient wurde bei der Wellenlänge 254 nm vermessen.

## 7.7 SGA – Analyse

Bei dieser Analyse können in großer Menge durch Kreuzung, Sporulation und Selektion auf haploide Nachkommen genetische Marker miteinander kombiniert werden, um synthetische genetische Wechselwirkungen zu identifizieren. Durchgeführt in Anlehnung an [Tong *et al.* 2001].

- a) Im ersten Schritt wurde der Stamm mit einer Deletion oder Mutation in dem Gen der Wahl (*YFG*) (*MAT $\alpha$  yfg $\Delta$ ::natMX4 his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 can1 $\Delta$ ::MFA1pr-HIS3-MFA $\alpha$ 1pr-LEU2*) mit dem gesamten Set an haploiden Einzeldelentionsmutanten der EUROSCARF-Kollektion gekreuzt. Der Stammhintergrund aller Deletionsmutanten ist BY4741 (*MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*), in dem die verschiedenen Deletionen mit dem Marker kanMX4 gekoppelt sind. Die Deletionsmutanten wurden mit Hilfe eines Übertragungstempels („Frogger“) auf XYD-Platten transferiert und anschließend mit der Mutante der Wahl überstempelt. Die Platten wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert.
- b) Für die Selektion auf Diploidie wurden die gepaarten Stämme auf XYD-Platten mit G418 (200  $\mu$ g/ml) und clonNAT (100 $\mu$ g/ml) übertragen und einen Tag bei 25 °C inkubiert.
- c) Die Sporulation der diploiden Stämme fand auf Sporulationsplatten mit Kaliumacetat für 11 Tage bei 25°C statt.
- d) Danach wurden die Sporen auf SD-His-Arg+Can-Platten übertragen und für zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Dabei wurde die Deletion von *CAN1* als rezessiver Marker genutzt, um auf haploide Nachkommen zu selektieren, die Canavanin-resistent sind. Durch die Selektion auf Histidin-prototrophe Stämme wurde das Wachstum von *MAT $\alpha$* -Nachkommen inhibiert und damit die Anzahl wachstumsfähiger Zellen reduziert. Diese Maßnahme verbessert die Effizienz des nachfolgenden Selektionsschrittes.
- e) Für die Endselektion wurden die Zellen parallel auf SD-His-Arg+Can+G418 (Einfachselektion) und auf SD-His-Arg+Can+G418+clonNAT (Doppelselektion) transferiert und bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach zwei und drei Tagen.

Anstelle des natMX4-Markers wurde dieser bei Bedarf durch den URA3-Marker ersetzt. Hierbei wurde lediglich bei den Selektionsschritten in den Medien clonNAT durch die Selektion auf *URA*-Prototrophie ersetzt.

## 7.8 Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien

Das Zwei-Hybrid-System ist eine Hefe-basierte genetische Technik, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen [Fields *et al.* 1994]. Dabei dient die Expression eines Reportergens als Maß für die Fähigkeit zweier Fusionsproteine durch Interaktion einen aktiven Transkriptionsfaktor aus DNA-Bindedomäne und Transkriptionsaktivierungsdomäne *in vivo* zu rekonstituieren. In dieser Arbeit wurde das bakterielle *lacZ*-Gen, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, als Reporter gen für einen Plattenfarbassay verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet die chromogene Substanz (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal), wodurch das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo entsteht. Das *lacZ*-Gen ist in dem Stamm W1813 (*MATa trp1 his3 6lexAop-LEU2 ura3::8lexAop-lacZ-URA*) an einem Markerloкус integriert und wird unter Kontrolle von *lexA*-Operatorsequenzen expremiert. Für die Herstellung von Proteinfusionen mit einer N-terminalen *lexA*-DNA-Bindedomäne wurde das Plasmid pEG202 (2 $\mu$ , *HIS3 pADH-lexA-tADH*) verwendet. Analog wurde das Plasmid pJG4-5 (2 $\mu$ , *TRP1 pGALI-NLS-Transkriptionsaktivierungsdomäne-HA-tADH*) für die Herstellung von Proteinfusionen mit einer N-terminalen Transkriptionsaktivierungsdomäne eingesetzt. Die Klonierung der DNA-Sequenzen, welche für die zu testenden Proteine oder Proteinfragmente kodieren, erfolgte jeweils über die Schnittstellen EcoRI und XhoI in den Vektoren pEG202 und pJG4-5. Die verschiedenen pEG202- und pJG4-5-Derivate wurden in den Reporterstamm W1813 cotransformiert und Zellen von jeweils vier Transformanten auf Histidin- und Tryptophan-freies Selektivmedium mit 2 % Galaktose und 2 % Raffinose getropft. Nach dreitägiger Inkubation bei 25 °C wurden die Zellen mit 10 ml eines flüssigen Agar-Gemisches (siehe unten), welches das Substrat X-Gal enthielt, überschichtet. Die qualitative Auswertung der Blaufärbung erfolgte fotografisch nach etwa 16 h Inkubation bei 37 °C.

### Überschichtungsagar (Mengenangaben für eine Platte):

1,4 % Agarose	5 ml
1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0	5 ml
DMFA	600 $\mu$ l
10 % SDS	100 $\mu$ l
X-Gal (20 mg/ml in DMFA)	75 $\mu$ l

## 7.9 $\beta$ -Galaktosidase-ONPG-Flüssigassay/GCN4 Expression

[Reynolds *et al.* 1989] Durch die Verwendung der  $\beta$ -Galaktosidase als Reporter und der Bestimmung ihrer Aktivität kann eine quantitative Aussage über die Enzymmenge und somit über die Stärke ihrer Expression gemacht werden. In den durchgeführten Experimenten wurde das Reporterplasmid p180 [Hinnebusch 1985] verwendet. Dieses enthält eine *GCN4-LacZ*-Fusion unter der translationalen Kontrolle der 5'-UTR von *GCN4* mit ihren 4 uORFs. Die  $\beta$ -Galaktoseaktivität stellt durch einen reziproken Zusammenhang ein Maß für die Effizienz der Translationsinitiation dar (siehe 3.4.2). Durch Spaltung von ONPG durch die  $\beta$ -Galaktosidase entstehen Galaktose und gelbes *o*-Nitrophenol, dessen Absorption bei 420 nm gemessen werden kann. Da das Substrat im Überschuss zugegeben wird, ist das produzierte *o*-Nitrophenol proportional zu der Enzymmenge.

Die Zellen wurden in Selektionsmedium bis zu einer  $OD_{600}$  zwischen 0,5 und 1 kultiviert. Anschließend wurde 1 ml Kultur abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 1,1 ml Z-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Es wurden 100  $\mu$ l entnommen und die  $OD_{600}$  bestimmt. Der verbleibende Milliliter Zellsuspension wurde mit 10  $\mu$ l SDS (0,25 % in  $H_2O$ ) und 50  $\mu$ l Chloroform versetzt, gemischt und bei 37°C unter Schütteln 15 min inkubiert. Danach wurden 200  $\mu$ l ONPG (4mg/ml ONPG in 0,1M  $KPO_4$ -Puffer pH 7.0) zugegeben, gut gemischt und weiter bei 37°C inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung sichtbar wurde. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 500 $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  abgestoppt. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 Upm wurde die  $OD_{420}$  bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Gleichung lässt sich die Enzymaktivität (U) ermitteln:

$$U = \frac{1000 \times OD_{420}}{t \times v \times OD_{600}} \quad \begin{array}{l} t = \text{Reaktionszeit [min]} \\ v = \text{eingesetztes Volumen [ml]} \end{array}$$

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abastado, J. P., P. F. Miller, et al. (1991). "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control." Mol Cell Biol **11**(1): 486-96.
- Adams, A. E. and J. R. Pringle (1991). "Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin." Methods Enzymol **194**: 729-31.
- Akada, R., T. Murakane, et al. (2000). "DNA extraction method for screening yeast clones by PCR." Biotechniques **28**(4): 668-70, 672, 674.
- Asano, K., J. Clayton, et al. (2000). "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo." Genes Dev **14**(19): 2534-46.
- Asano, K., T. Krishnamoorthy, et al. (1999). "Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2." Embo J **18**(6): 1673-88.
- Astrom, S. U., U. von Pawel-Rammingen, et al. (1993). "The yeast initiator tRNA<sup>Met</sup> can act as an elongator tRNA(Met) in vivo." J Mol Biol **233**(1): 43-58.
- Barbet, N. C., U. Schneider, et al. (1996). "TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast." Mol Biol Cell **7**(1): 25-42.
- Basu, U., K. Si, et al. (2001). "The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis." Mol Cell Biol **21**(5): 1453-62.
- Berghammer, H. and B. Auer (1993). "'Easypreps': fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*." Biotechniques **14**(4): 524, 528.
- Berset, C., H. Trachsel, et al. (1998). "The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4264-9.
- Bieganowski, P., K. Shilinski, et al. (2004). "Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance." J Biol Chem.
- Blum, S., S. R. Schmid, et al. (1992). "ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7664-8.
- Brachmann, C. B., A. Davies, et al. (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." Yeast **14**(2): 115-32.
- Brenner, C., N. Nakayama, et al. (1988). "CDC33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **8**(8): 3556-9.
- Bushman, J. L., A. I. Asuru, et al. (1993). "Evidence that GCD6 and GCD7, translational regulators of GCN4, are subunits of the guanine nucleotide exchange factor for eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **13**(3): 1920-32.
- Camonis, J. H., M. Kalekine, et al. (1986). "Characterization, cloning and sequence analysis of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **5**(2): 375-80.
- Campbell, S. G., N. P. Hoyle, et al. (2005). "Dynamic cycling of eIF2 through a large eIF2B-containing cytoplasmic body: implications for translation control." J Cell Biol **170**(6): 925-34.
- Chen, R. A., T. Michaeli, et al. (2000). "A role for the noncatalytic N terminus in the function of Cdc25, a *Saccharomyces cerevisiae* Ras-guanine nucleotide exchange factor." Genetics **154**(4): 1473-84.
- Cigan, A. M., E. K. Pabich, et al. (1989). "Yeast translation initiation suppressor *sui2* encodes the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human alpha subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2784-8.
- Cliften, P., P. Sudarsanam, et al. (2003). "Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting." Science **301**(5629): 71-6.
- Costanzo, M., J. L. Nishikawa, et al. (2004). "CDK Activity Antagonizes Whi5, an Inhibitor of G1/S Transcription in Yeast." Cell **117**(7): 899-913.
- Craddock, B. L. and C. G. Proud (1996). "The alpha-subunit of the mammalian guanine nucleotide-exchange factor eIF-2B is essential for catalytic activity in vitro." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 843-7.
- Crespo, J. L. and M. N. Hall (2002). "Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **66**(4): 579-91, table of contents.
- Cross, F. R. (1990). "Cell cycle arrest caused by CLN gene deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* resembles START-I arrest and is independent of the mating-pheromone signalling pathway." Mol Cell Biol **10**(12): 6482-90.

- Cross, F. R. and C. M. Blake (1993). "The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28." *Mol Cell Biol* **13**(6): 3266-71.
- Cryer, D. R., R. Eccleshall, et al. (1975). "Isolation of yeast DNA." *Methods Cell Biol* **12**: 39-44.
- Das, S., R. Ghosh, et al. (2001). "Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein." *J Biol Chem* **276**(9): 6720-6.
- De Benedetti, A. and C. Baglioni (1983). "Phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha, binding of mRNA to 48 S complexes, and its reutilization in initiation of protein synthesis." *J Biol Chem* **258**(23): 14556-62.
- de Bruin, R. A., W. H. McDonald, et al. (2004). "Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5." *Cell* **117**(7): 887-98.
- de la Cruz, J., I. Iost, et al. (1997). "The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5201-6.
- Deloche, O., J. De La Cruz, et al. (2004). "A Membrane Transport Defect Leads to a Rapid Attenuation of Translation Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell* **13**(3): 357-66.
- Dever, T. E., W. Yang, et al. (1995). "Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes." *Mol Cell Biol* **15**(11): 6351-63.
- Dominguez, D., M. Altmann, et al. (1999). "Interaction of translation initiation factor eIF4G with eIF4A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **274**(38): 26720-6.
- Donahue, T. F., A. M. Cigan, et al. (1988). "Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 beta gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process." *Cell* **54**(5): 621-32.
- Doudna, J. A. and V. L. Rath (2002). "Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier." *Cell* **109**(2): 153-6.
- Erickson, F. L. and E. M. Hannig (1996). "Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: role of the gamma-subunit." *Embo J* **15**(22): 6311-20.
- Erickson, F. L., J. Nika, et al. (2001). "Minimum requirements for the function of eukaryotic translation initiation factor 2." *Genetics* **158**(1): 123-32.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, et al. (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol Cell Biol* **5**(12): 3610-6.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell* **33**(2): 389-96.
- Fekete, C. A., D. J. Applefield, et al. (2005). "The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo." *Embo J*.
- Field, J., J. Nikawa, et al. (1988). "Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method." *Mol Cell Biol* **8**(5): 2159-65.
- Fields, S. and R. Sternglanz (1994). "The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions." *Trends Genet* **10**(8): 286-92.
- Flowers, K. M., S. R. Kimball, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the alpha subunit of the rat protein synthesis initiation factor eIF-2B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4274-8.
- Fraschini, R., D. Bilotta, et al. (2004). "Functional characterization of Dma1 and Dma2, the budding yeast homologues of *Schizosaccharomyces pombe* Dma1 and human Chfr." *Mol Biol Cell* **15**(8): 3796-810.
- Fujimura, H. and Y. Sakuma (1993). "Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts." *Biotechniques* **14**(4): 538-40.
- Gallego, C., E. Gari, et al. (1997). "The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast." *Embo J* **16**(23): 7196-206.
- Gan, W. and R. E. Rhoads (1996). "Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation." *J Biol Chem* **271**(2): 623-6.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, et al. (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." *Nature* **425**(6959): 737-41.
- Giaever, G., A. M. Chu, et al. (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Nature* **418**(6896): 387-91.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Gomez, E., S. S. Mohammad, et al. (2002). "Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation." *Embo J* **21**(19): 5292-301.
- Goss, D. J., D. Rounds, et al. (1988). "Effects of eucaryotic initiation factor 3 on eucaryotic ribosomal subunit equilibrium and kinetics." *Biochemistry* **27**(5): 1489-94.
- Goumans, H., A. Thomas, et al. (1980). "The role of eIF-4C in protein synthesis initiation complex formation." *Biochim Biophys Acta* **608**(1): 39-46.



- Greenberg, J. R., L. Phan, et al. (1998). "Nip1p Associates with 40 S Ribosomes and the Prt1p Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 3 and Is Required for Efficient Translation Initiation." J. Biol. Chem. **273**(36): 23485-23494.
- Gross, M., R. Redman, et al. (1985). "Evidence that the primary effect of phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2(alpha) in rabbit reticulocyte lysate is inhibition of the release of eukaryotic initiation factor-2.GDP from 60 S ribosomal subunits." J Biol Chem **260**(16): 9491-500.
- Gross, M., M. Wing, et al. (1987). "Evidence that phosphorylation of eIF-2(alpha) prevents the eIF-2B-mediated dissociation of eIF-2 X GDP from the 60 S subunit of complete initiation complexes." J Biol Chem **262**(14): 6899-907.
- Guarente, L. (1993). "Strategies for the identification of interacting proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1639-41.
- Haase, S. B. and D. J. Lew (1997). "Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast." Methods Enzymol **283**: 322-32.
- Hanic-Joyce, P. J., R. A. Singer, et al. (1987). "Molecular characterization of the yeast PRT1 gene in which mutations affect translation initiation and regulation of cell proliferation." J Biol Chem **262**(6): 2845-51.
- Hannig, E. M., A. M. Cigan, et al. (1993). "GCD11, a negative regulator of GCN4 expression, encodes the gamma subunit of eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **13**(1): 506-20.
- Hannig, E. M. and A. G. Hinnebusch (1988). "Molecular analysis of GCN3, a translational activator of GCN4: evidence for posttranslational control of GCN3 regulatory function." Mol Cell Biol **8**(11): 4808-20.
- Harashima, S., E. M. Hannig, et al. (1987). "Interactions between positive and negative regulators of GCN4 controlling gene expression and entry into the yeast cell cycle." Genetics **117**(3): 409-19.
- Harding, H. P., I. Novoa, et al. (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-108.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-33.
- Harlow, E. and D. Lane (1998). Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartman, J. L. t., B. Garvik, et al. (2001). "Principles for the buffering of genetic variation." Science **291**(5506): 1001-4.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1970). "Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(2): 352-9.
- Hartwell, L. H. and C. S. McLaughlin (1969). "A mutant of yeast apparently defective in the initiation of protein synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **62**(2): 468-74.
- Hashimoto, N. N., L. S. Carnevalli, et al. (2002). "Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits." Biochem J **367**(Pt 2): 359-68.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-45.
- He, H., T. von der Haar, et al. (2003). "The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection." Mol Cell Biol **23**(15): 5431-45.
- Hellen, C. U. and P. Sarnow (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." Genes Dev **15**(13): 1593-612.
- Hentze, M. W. (1997). "eIF4G: a multipurpose ribosome adapter?" Science **275**(5299): 500-1.
- Hershey, J. W. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. Translational Control of Gene Expression. N. Sonenberg, J. W. Hershey and M. B. Mathews, Cold Spring Harbour Laboratory Press: 33-88.
- Hershko, A. (1997). "Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control." Curr Opin Cell Biol **9**(6): 788-99.
- Hinnebusch, A. G. (1985). "A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **5**(9): 2349-60.
- Hinnebusch, A. G. (1997). "Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome." J Biol Chem **272**(35): 21661-4.
- Hinnebusch, A. G. (2000). Mechanism and regulation of methionyl-tRNA binding to ribosomes. Translational Control of Gene Expression. N. Sonenberg, J. W. Hershey and M. B. Mathews, Cold Spring Harbour Laboratory Press: 185-243.
- Ho, Y., A. Gruhler, et al. (2002). "Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry." Nature **415**(6868): 180-3.
- Hochstrasser, M. (1995). "Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation." Curr Opin Cell Biol **7**(2): 215-23.
- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." Annu Rev Genet **30**: 405-39.
- Hoja, M. R., C. Wahlestedt, et al. (2000). "A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins." Exp Cell Res **259**(1): 239-46.
- Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 318-27.

- Hoyt, M. A. (1997). "Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle." *Cell* **91**(2): 149-51.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, et al. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-91.
- Huxley, C., E. D. Green, et al. (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." *Trends Genet* **6**(8): 236.
- Ito, T., T. Chiba, et al. (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4569-74.
- Jacquet, M. and J. Camonis (1985). "[Control of the cell division cycle and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* by the cyclic AMP system]." *Biochimie* **67**(1): 35-43.
- Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman (2000). "RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity." *Cell* **102**(5): 549-52.
- Johannes, G., M. S. Carter, et al. (1999). "Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13118-23.
- Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, et al. (2005). "Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms." *Genes Dev* **19**(1): 104-13.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2." *J Mol Biol* **335**(4): 923-36.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." *Annu Rev Biochem* **73**: 657-704.
- King, R. W., R. J. Deshaies, et al. (1996). "How Proteolysis Drives the Cell Cycle." *Science* **274**(5293): 1652-1659.
- Kispal, G., K. Sipos, et al. (2005). "Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria." *Embo J* **24**(3): 589-98.
- Kleijn, M., G. C. Scheper, et al. (1998). "Regulation of translation initiation factors by signal transduction." *Eur J Biochem* **253**(3): 531-44.
- Kolupaeva, V. G., A. Unbehaun, et al. (2005). "Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association." *Rna* **11**(4): 470-86.
- Korneeva, N. L., E. A. First, et al. (2005). "Interaction between the NH2-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity." *J Biol Chem* **280**(3): 1872-81.
- Kozak, M. (1978). "How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?" *Cell* **15**(4): 1109-23.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." *J Cell Biol* **108**(2): 229-41.
- Kozak, M. (1991). "Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." *J Biol Chem* **266**(30): 19867-70.
- Kozak, M. (2002). "Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation." *Gene* **299**(1-2): 1-34.
- Krishnamoorthy, T., G. D. Pavitt, et al. (2001). "Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation." *Mol Cell Biol* **21**(15): 5018-30.
- Kubota, H., T. Obata, et al. (2003). "Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 alpha kinase GCN2." *J Biol Chem* **278**(23): 20457-60.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, et al. (1995). "Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation." *J Biol Chem* **270**(37): 21975-83.
- Lamping, E., J. Luckl, et al. (1994). "Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with pleiotropic deficiencies in transcriptional activation and repression." *Genetics* **137**(1): 55-65.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Laurino, J. P., G. M. Thompson, et al. (1999). "The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif." *Mol Cell Biol* **19**(1): 173-81.
- Lee, J. H., T. V. Pestova, et al. (2002). "Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16689-94.
- Lew, D. J., T. Weinert, et al. (1997). "Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cold Spring Harbor Laboratory Press Yeast III*: 607-695.
- Loewith, R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." *Mol Cell* **10**(3): 457-68.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, et al. (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**(10): 953-61.

- Maag, D., C. A. Fekete, et al. (2005). "A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon." *Mol Cell* **17**(2): 265-75.
- Maag, D. and J. R. Lorsch (2003). "Communication between eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A on the yeast small ribosomal subunit." *J Mol Biol* **330**(5): 917-24.
- Maniatis, T., J. Sambrook, et al. (1989). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marcus, A., D. P. Weeks, et al. (1970). "Protein chain initiation by methionyl-tRNA in wheat embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**(4): 1681-7.
- Mauro, V. P., G. M. Edelman, et al. (2004). "Reevaluation of the conclusion that IRES-activity reported within the 5' leader of the TIF4631 gene is due to promoter activity." *Rna* **10**(6): 895-7; discussion 898.
- Meijer, H. A. and A. A. Thomas (2002). "Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA." *Biochem J* **367**(Pt 1): 1-11.
- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge (1998). "Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1191-243.
- Merrick, W. C. (1992). "Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis." *Microbiol Rev* **56**(2): 291-315.
- Milkereit, P., D. Strauss, et al. (2003). "A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits." *J Biol Chem* **278**(6): 4072-81.
- Morris, D. R. and A. P. Geballe (2000). "Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8635-42.
- Mueller, P. P., P. Grueter, et al. (1998). "A ribosomal protein is required for translational regulation of GCN4 mRNA. Evidence for involvement of the ribosome in eIF2 recycling." *J Biol Chem* **273**(49): 32870-7.
- Mueller, P. P., B. M. Jackson, et al. (1988). "The first and fourth upstream open reading frames in GCN4 mRNA have similar initiation efficiencies but respond differently in translational control to change in length and sequence." *Mol Cell Biol* **8**(12): 5439-47.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1994). "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression." *Nucleic Acids Res* **22**(25): 5767-8.
- Nachtsheim, C. (2002). Characterization of Cdc123 and its interaction with Rbx8 and Rbx9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Institut für industrielle Genetik*, Universität Stuttgart.
- Nanbru, C., I. Lafon, et al. (1997). "Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site." *J Biol Chem* **272**(51): 32061-6.
- Naranda, T., I. Sirangelo, et al. (1995). "Mutations in the NKXD consensus element indicate that GTP binds to the gamma-subunit of translation initiation factor eIF2." *FEBS Lett* **372**(2-3): 249-52.
- Narasimhan, J., K. A. Staschke, et al. (2004). "Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions." *J Biol Chem* **279**(22): 22820-32.
- Nika, J., S. Rippel, et al. (2001). "Biochemical analysis of the eIF2beta gamma complex reveals a structural function for eIF2alpha in catalyzed nucleotide exchange." *J Biol Chem* **276**(2): 1051-6.
- Nika, J., W. Yang, et al. (2000). "Purification and kinetic analysis of eIF2B from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **275**(34): 26011-7.
- Ohno, K. and G. Kimura (1984). "Genetic analysis of control of proliferation in fibroblastic cells in culture. II. Alteration in proliferative and survival phenotypes in a set of temperature-sensitive mutants of rat 3Y1 cells after infection or transformation with simian virus 40." *Somat Cell Mol Genet* **10**(1): 29-36.
- Ohno, K., A. Okuda, et al. (1984). "Genetic analysis of control of proliferation in fibroblastic cells in culture. I. Isolation and characterization of mutants temperature-sensitive for proliferation or survival of untransformed diploid rat cell line 3Y1." *Somat Cell Mol Genet* **10**(1): 17-28.
- Okuda, A. and G. Kimura (1996). "An amino acid change in novel protein D123 is responsible for temperature-sensitive G1-phase arrest in a mutant of rat fibroblast line 3Y1." *Exp Cell Res* **223**(2): 242-9.
- Okuda, A., M. Ohtsu, et al. (1999). "Extensive degradation of mutant-type D123 protein is responsible for temperature-sensitive proliferation inhibition in 3Y1tsD123 cells." *Cell Struct Funct* **24**(6): 443-9.
- Okuda, A., M. Ohtsu, et al. (2001). "Reversion of temperature-sensitive mutation by inhibition of proteasome-mediated degradation of mutated D123 protein." *Cell Struct Funct* **26**(4): 205-14.
- Oldfield, S. and C. G. Proud (1992). "Purification, phosphorylation and control of the guanine-nucleotide-exchange factor from rabbit reticulocyte lysates." *Eur J Biochem* **208**(1): 73-81.
- Onisto, M., P. Zeilante, et al. (1998). "Expression study on D123 gene product: evidence for high positivity in testis." *Exp Cell Res* **242**(2): 451-9.
- Pain, V. M. (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." *Eur J Biochem* **236**(3): 747-71.
- Paulin, F. E., L. E. Campbell, et al. (2001). "Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein." *Curr Biol* **11**(1): 55-9.

- Pause, A., N. Methot, et al. (1994). "Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation." Embo J **13**(5): 1205-15.
- Pavitt, G. D., K. V. Ramaiah, et al. (1998). "eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange." Genes Dev **12**(4): 514-26.
- Pavitt, G. D., W. Yang, et al. (1997). "Homologous segments in three subunits of the guanine nucleotide exchange factor eIF2B mediate translational regulation by phosphorylation of eIF2." Mol Cell Biol **17**(3): 1298-313.
- Paz, I., L. Abramovitz, et al. (1999). "Starved *Saccharomyces cerevisiae* cells have the capacity to support internal initiation of translation." J Biol Chem **274**(31): 21741-5.
- Pestova, T. V. and V. G. Kolupaeva (2002). "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection." Genes Dev **16**(22): 2906-22.
- Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, et al. (2001). "Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7029-36.
- Phan, L., L. W. Schoenfeld, et al. (2001). "A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met." Embo J **20**(11): 2954-65.
- Polymenis, M. and E. V. Schmidt (1997). "Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast." Genes Dev **11**(19): 2522-31.
- Preiss, T. and M. W. Hentze (1998). "Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast." Nature **392**(6675): 516-20.
- Preiss, T. and M. W. Hentze (2003). "Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation." Bioessays **25**(12): 1201-11.
- Price, N. and C. Proud (1994). "The guanine nucleotide-exchange factor, eIF-2B." Biochimie **76**(8): 748-60.
- Price, N. T., H. Mellor, et al. (1996). "eIF2B, the guanine nucleotide-exchange factor for eukaryotic initiation factor 2. Sequence conservation between the alpha, beta and delta subunits of eIF2B from mammals and yeast." Biochem J **318** ( Pt 2): 637-43.
- Pringle, J. R., A. E. Adams, et al. (1991). "Immunofluorescence methods for yeast." Methods Enzymol **194**: 565-602.
- Proud, C. G. (2005). "eIF2 and the control of cell physiology." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 3-12.
- Pruyne, D. and A. Bretscher (2000). "Polarization of cell growth in yeast. II. The role of the cortical actin cytoskeleton." J Cell Sci **113** ( Pt 4): 571-85.
- Ramaiah, K. V., R. S. Dhindsa, et al. (1992). "Recycling and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 on 60S subunits of 80S initiation complexes and polysomes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12063-7.
- Ramakrishnan, V. (2002). "Ribosome structure and the mechanism of translation." Cell **108**(4): 557-72.
- Raught, B., A. C. Gingras, et al. (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7037-44.
- Raychaudhuri, P., E. A. Stringer, et al. (1984). "Ribosomal subunit antiassociation activity in rabbit reticulocyte lysates. Evidence for a low molecular weight ribosomal subunit antiassociation protein factor (Mr = 25,000)." J Biol Chem **259**(19): 11930-5.
- Reed, S. I. (1980). "The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division." Genetics **95**(3): 561-77.
- Reid, B. J. and L. H. Hartwell (1977). "Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 355-65.
- Reynolds, A. and V. Lundblad (1989). Assay for beta-Galactosidase in liquid cultures. Current protocols in molecular biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. **2**.
- Richter-Cook, N. J., T. E. Dever, et al. (1998). "Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H." J Biol Chem **273**(13): 7579-87.
- Rogers, G. W., Jr., N. J. Richter, et al. (2001). "Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F." J Biol Chem **276**(33): 30914-22.
- Rowlands, A. G., R. Panniers, et al. (1988). "The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2." J Biol Chem **263**(12): 5526-33.
- Rudra, D. and J. R. Warner (2004). "What better measure than ribosome synthesis?" Genes Dev **18**(20): 2431-6.
- Russell, D. W. and L. L. Spremulli (1979). "Purification and characterization of a ribosome dissociation factor (eukaryotic initiation factor 6) from wheat germ." J Biol Chem **254**(18): 8796-800.
- Safer, B., W. Kemper, et al. (1978). "Identification of a 48 S preinitiation complex in reticulocyte lysate." J Biol Chem **253**(10): 3384-6.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-62.
- Schmitt, E., S. Blanquet, et al. (2002). "The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors." Embo J **21**(7): 1821-32.
- Schneider, R., V. I. Agol, et al. (2001). "New ways of initiating translation in eukaryotes." Mol Cell Biol **21**(23): 8238-46.

- Schwelberger, H. G., H. A. Kang, et al. (1993). "Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions." J Biol Chem **268**(19): 14018-25.
- Schwob, E., T. Bohm, et al. (1994). "The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*." Cell **79**(2): 233-44.
- Seino, A., Y. Yanagida, et al. (2005). "Translational control by internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1681**(2-3): 166-74.
- Shin, B. S., D. Maag, et al. (2002). "Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity." Cell **111**(7): 1015-25.
- Si, K. and U. Maitra (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor." Mol Cell Biol **19**(2): 1416-26.
- Sickmann, A., J. Reinders, et al. (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13207-12.
- Smith, E., T. E. Meyerrose, et al. (2005). "Leaky ribosomal scanning in mammalian genomes: significance of histone H4 alternative translation in vivo." Nucleic Acids Res **33**(4): 1298-308.
- Sonenberg, N., J. W. Hershey, et al. (2000). Origins and Principles of Translational Control. Translational Control of Gene Expression. N. Sonenberg, J. W. Hershey and M. B. Mathews, Cold Spring Harbour Laboratory Press: 1-32.
- Srivastava, S., A. Verschoor, et al. (1992). "Eukaryotic initiation factor 3 does not prevent association through physical blockage of the ribosomal subunit-subunit interface." J Mol Biol **226**(2): 301-4.
- Tarun, S. Z., Jr., S. E. Wells, et al. (1997). "Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9046-51.
- Thomas, N. S., R. L. Matts, et al. (1985). "The 60 S ribosomal subunit as a carrier of eukaryotic initiation factor 2 and the site of reversing factor activity during protein synthesis." J Biol Chem **260**(17): 9860-6.
- Tong, A. H., M. Evangelista, et al. (2001). "Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants." Science **294**(5550): 2364-8.
- Tong, A. H., G. Lesage, et al. (2004). "Global mapping of the yeast genetic interaction network." Science **303**(5659): 808-13.
- Trachsel, H. and T. Staehelin (1979). "Initiation of mammalian protein synthesis. The multiple functions of the initiation factor eIF-3." Biochim Biophys Acta **565**(2): 305-14.
- Tyers, M., G. Tokiwa, et al. (1992). "The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation." Embo J **11**(5): 1773-84.
- Uetz, P., L. Giot, et al. (2000). "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **403**(6770): 623-7.
- Unbehauen, A., S. I. Borukhov, et al. (2004). "Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP." Genes Dev **18**(24): 3078-93.
- Valasek, L., A. A. Mathew, et al. (2003). "The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo." Genes Dev **17**(6): 786-99.
- Valasek, L., K. H. Nielsen, et al. (2004). "Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection." Mol Cell Biol **24**(21): 9437-55.
- Valasek, L., L. Phan, et al. (2001). "Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding." Embo J **20**(4): 891-904.
- Valenzuela, D. M., A. Chaudhuri, et al. (1982). "Eukaryotic ribosomal subunit anti-association activity of calf liver is contained in a single polypeptide chain protein of Mr = 25,500 (eukaryotic initiation factor 6)." J Biol Chem **257**(13): 7712-9.
- Vazquez de Aldana, C. R. and A. G. Hinnebusch (1994). "Mutations in the GCD7 subunit of yeast guanine nucleotide exchange factor eIF-2B overcome the inhibitory effects of phosphorylated eIF-2 on translation initiation." Mol Cell Biol **14**(5): 3208-22.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Verge, V., M. Vonlanthen, et al. (2004). "Localization of a promoter in the putative internal ribosome entry site of the *Saccharomyces cerevisiae* TIF4631 gene." Rna **10**(2): 277-86.
- Verma, R., H. McDonald, et al. (2001). "Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk." Mol Cell **8**(2): 439-48.
- von der Haar, T. and J. E. McCarthy (2002). "Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function." Mol Microbiol **46**(2): 531-44.
- von Pawel-Rammingen, U., S. Astrom, et al. (1992). "Mutational analysis of conserved positions potentially important for initiator tRNA function in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **12**(4): 1432-42.
- Wang, X. Q. and J. A. Rothnagel (2004). "5'-untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation." Nucleic Acids Res **32**(4): 1382-91.
- Warner, J. R. (1999). "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." Trends Biochem Sci **24**(11): 437-40.

- Williams, D. D., N. T. Price, et al. (2001). "Characterization of the mammalian initiation factor eIF2B complex as a GDP dissociation stimulator protein." J Biol Chem **276**(27): 24697-703.
- Williams, N. P., A. G. Hinnebusch, et al. (1989). "Mutations in the structural genes for eukaryotic initiation factors 2 alpha and 2 beta of *Saccharomyces cerevisiae* disrupt translational control of GCN4 mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7515-9.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, et al. (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." Science **285**(5429): 901-6.
- Wolin, S. L. and P. Walter (1988). "Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA." Embo J **7**(11): 3559-69.
- Yueh, A. and R. J. Schneider (1996). "Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells." Genes Dev **10**(12): 1557-67.
- Zaitso, H. and G. Kimura (1984). "Arrest states in a set of mutants of rat 3Y1 cells temperature-sensitive for entering S phase." J Cell Physiol **119**(1): 82-8.
- Zaitso, H. and G. Kimura (1985). "Serum-independent regulation of initiation of DNA synthesis relating to temperature-sensitive defect in rat 3Y1tsD123 fibroblasts and its compensation by simian virus 40." J Cell Physiol **123**(3): 305-9.
- Zhao, Y., J. H. Sohn, et al. (2003). "Autoregulation in the biosynthesis of ribosomes." Mol Cell Biol **23**(2): 699-707.
- Zhou, W., G. M. Edelman, et al. (2001). "Transcript leader regions of two *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs contain internal ribosome entry sites that function in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1531-6.
- Zurita-Martinez, S. A. and M. E. Cardenas (2005). "Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth." Eukaryot Cell **4**(1): 63-71.

## 9 ANHANG

### 9.1 Sammlung aller per Tetradenanalyse verifizierten genetischen Interaktionen mit *cdc123*-Mutanten.

Die Stämme W3129 (*cdc123 $\Delta$ C-HA3*) bzw. W3439 (*cdc123-1-HA3*) wurden mit den jeweiligen Deletionsmutanten aus der EUROSCARF-Kollektion (S288C, *MATa*) gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht. Die Tetraden wuchsen zwei Tage auf XYD Medium bei 30°C (W3129) bzw. vier Tage auf XYD Medium bei 25°C (W3439). Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt: WT (Wildtyp), C (*cdc123 $\Delta$ 327-HA3*), C-1 (*cdc123-1-HA3*),  $\Delta$  (Deletionsmutante der EUROSCARF-Kollektion), D (Doppelmutane C bzw. C-1 und  $\Delta$ ). Die genetischen Verteilungsmuster sind wie folgt bezeichnet: T Tetratyp, PD parentaler Dityp, NPD nicht-parentaler Dityp.

#### W3129 x *bni $\Delta$ ::kanMX4*

T T T PD

	$\Delta$	$\Delta$	WT	C
	WT	WT	C	C
	C	C	$\Delta$	$\Delta$
	D	D	D	$\Delta$

#### W3439 x *bni $\Delta$ ::kanMX4*

T T T PD

	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	C-1
	WT	WT	C-1	$\Delta$
	D	D	D	C-1
	C-1	C-1	WT	$\Delta$

#### W3129 x *bud2 $\Delta$ ::kanMX4*

T PD NPD NPD

	$\Delta$	C	D	D
	C	$\Delta$	WT	WT
	WT	$\Delta$	WT	WT
	D	C	D	D

#### W3439 x *bud2 $\Delta$ ::kanMX4*

NPD PD T T

	WT	C-1	$\Delta$	$\Delta$
	D	$\Delta$	D	D
	D	$\Delta$	WT	C-1
	WT	C-1	C-1	WT

#### W3129 x *csg2 $\Delta$ ::kanMX4*

PD PD T T

	C	C	C	WT
	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	C
	$\Delta$	C	D	D
	C	$\Delta$	WT	$\Delta$

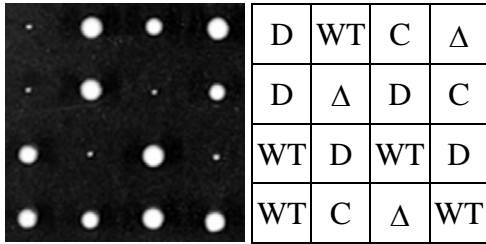
#### W3439 x *csg2 $\Delta$ ::kanMX4*

T T PD T

	C-1	$\Delta$	C-1	C-1
	$\Delta$	C-1	C-1	$\Delta$
	D	D	$\Delta$	D
	WT	WT	$\Delta$	WT

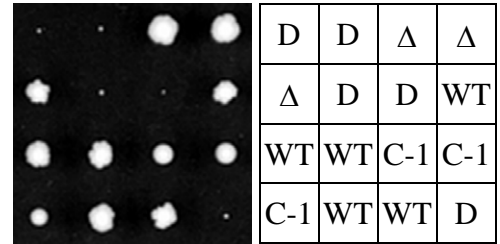
W3129 x *dld2Δ::kanMX4*

NPD T T T



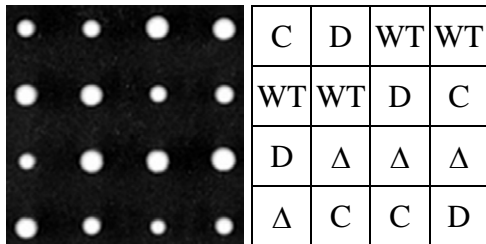
W3439 x *dld2Δ::kanMX4*

T NPD T T



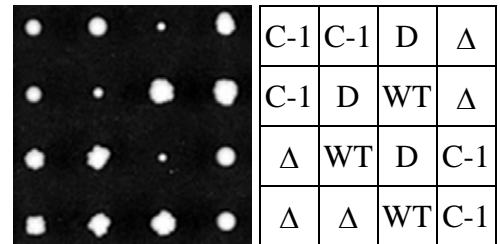
W3129 x *emp24Δ::kanMX4*

T T T T



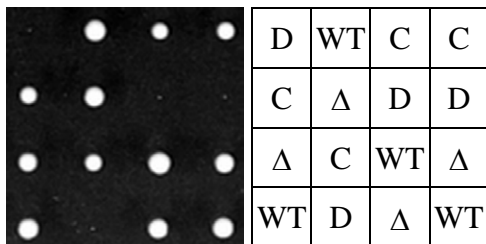
W3439 x *emp24Δ::kanMX4*

PD T NPD PD



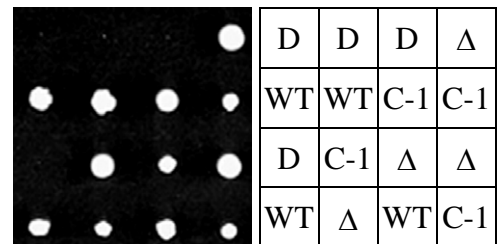
W3129 x *fmp36Δ::kanMX4*

T T T T



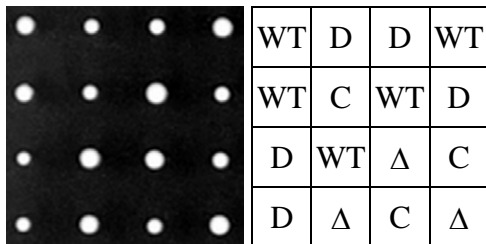
W3439 x *fmp36Δ::kanMX4*

NPD T T PD



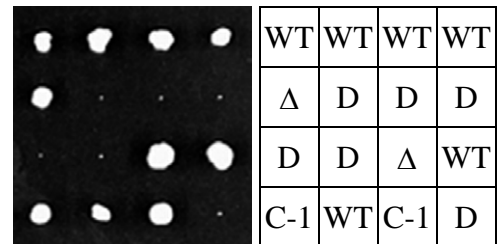
W3129 x *gal10Δ::kanMX4*

NPD T T T



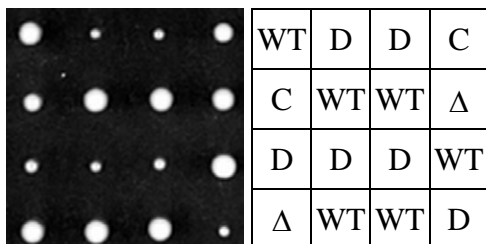
W3439 x *gal10Δ::kanMX4*

T NPD T NPD



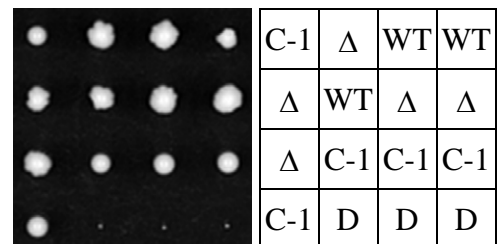
W3129 x *gcn3Δ::kanMX4*

T NPD NPD T



W3439 x *gcn3Δ::kanMX4*

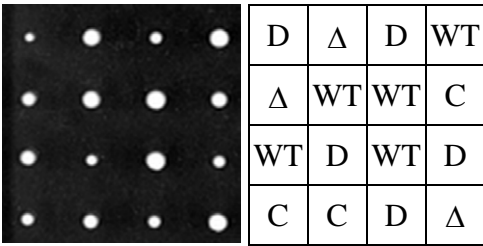
PD T T T





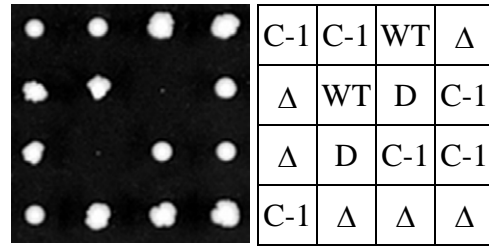
W3129 x *gga1Δ::kanMX4*

T T NPD T



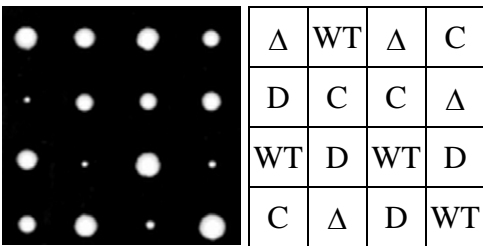
W3439 x *gga1Δ::kanMX4*

PD T T PD



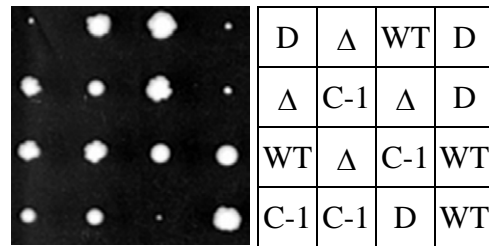
W3129 x *grx3Δ::kanMX4*

T T T T



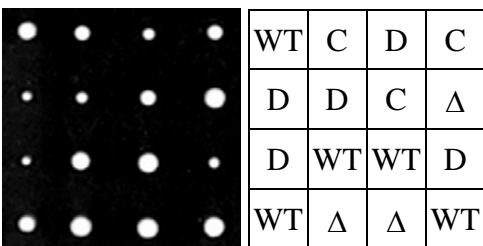
W3439 x *grx3Δ::kanMX4*

T PD T NPD



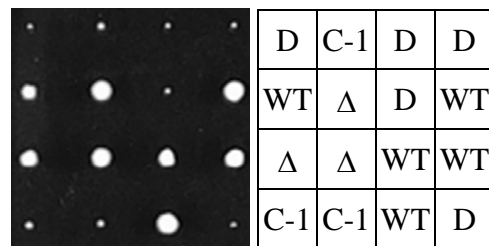
W3129 x *hsl1Δ::kanMX4*

NPD T T T



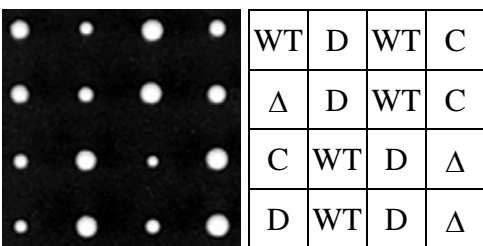
W3439 x *hsl1Δ::kanMX4*

T PD NPD NPD



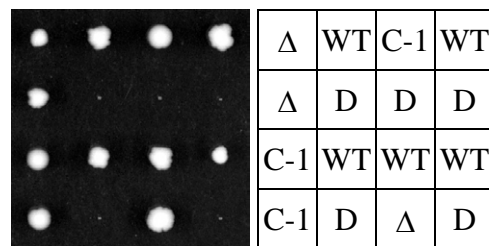
W3129 x *hut1Δ::kanMX4*

T NPD NPD PD



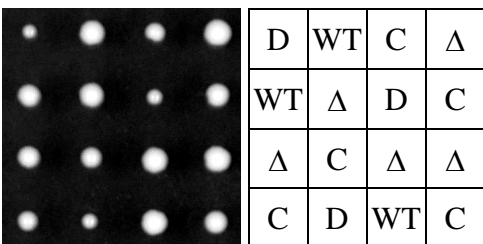
W3439 x *hut1Δ::kanMX4*

PD NPD T NPD



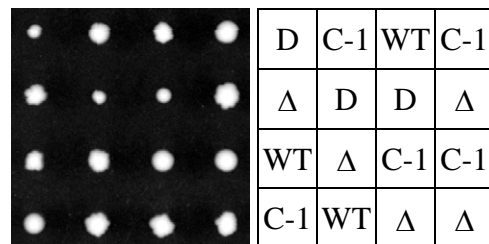
W3129 x *kcc4Δ::kanMX4*

T T T PD

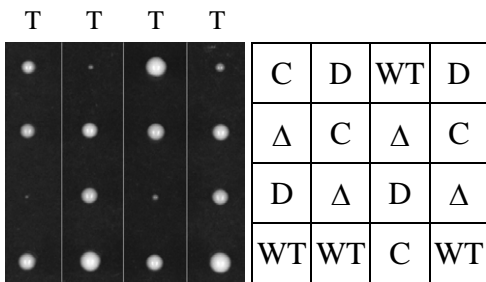


W3439 x *kcc4Δ::kanMX4*

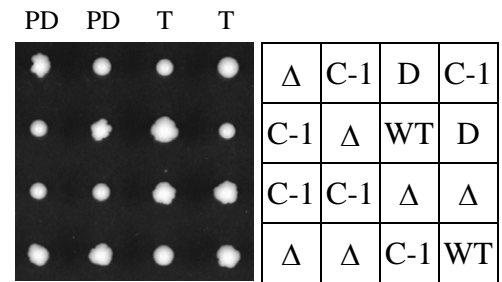
T T T PD



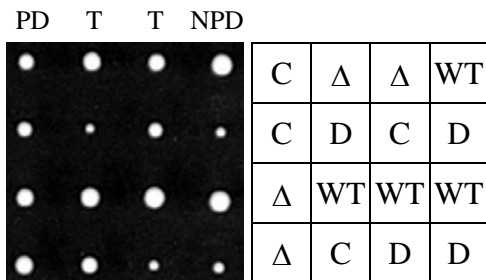
W3129 x *mnn11Δ::kanMX4*



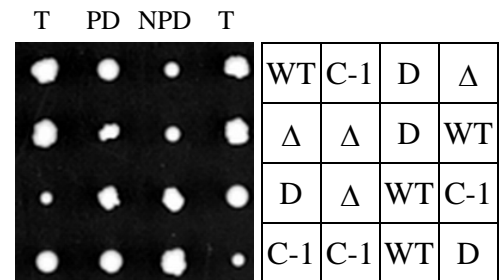
W3439 x *mnn11Δ::kanMX4*



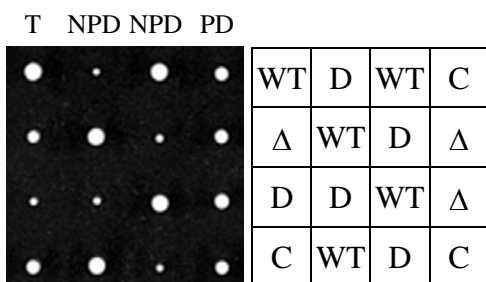
W3129 x *npr2Δ::kanMX4*



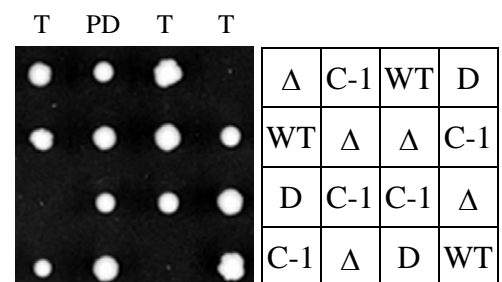
W3439 x *npr2Δ::kanMX4*



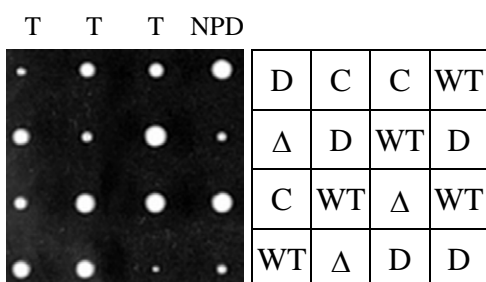
W3129 x *rtn1Δ::kanMX4*



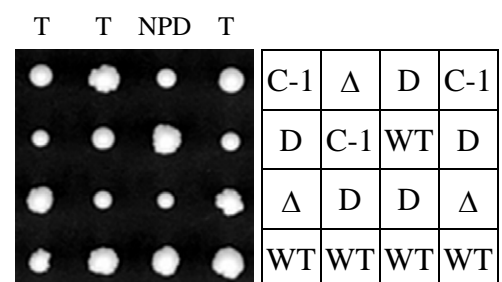
W3439 x *rtn1Δ::kanMX4*



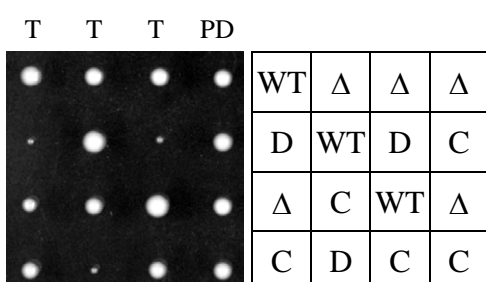
W3129 x *rub1Δ::kanMX4*



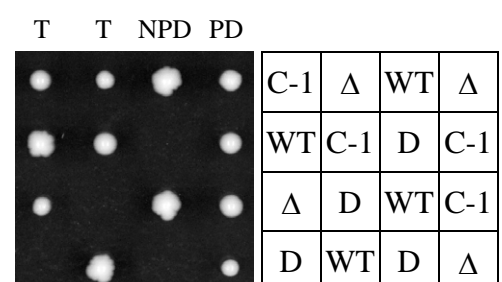
W3439 x *rub1Δ::kanMX4*



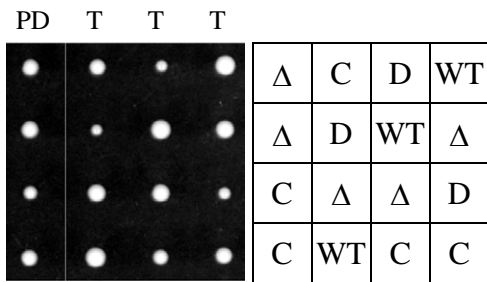
W3129 x *sac1Δ::kanMX4*



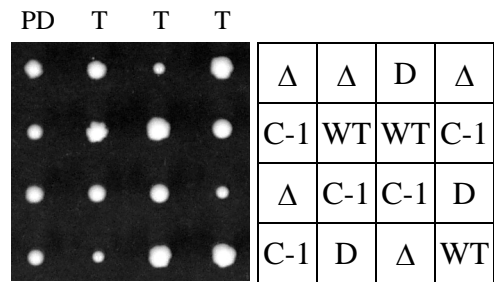
W3439 x *sac1Δ::kanMX4*



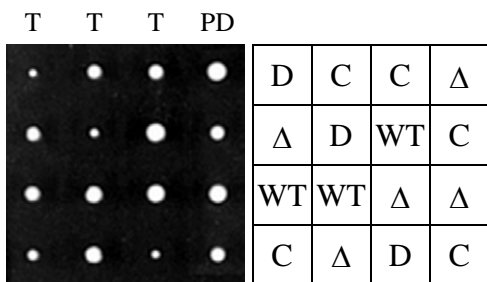
W3129 x *saml*Δ::*kanMX4*



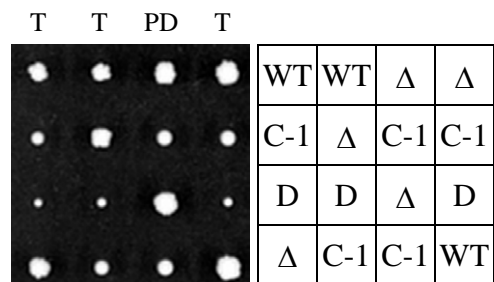
W3439 x *saml*Δ::*kanMX4*



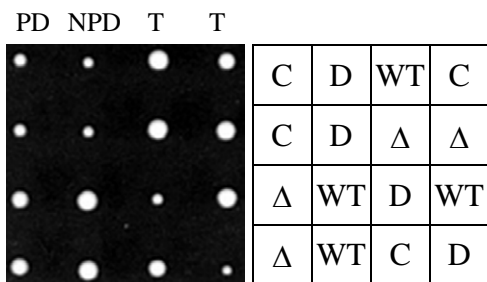
W3129 x *sec22*Δ::*kanMX4*



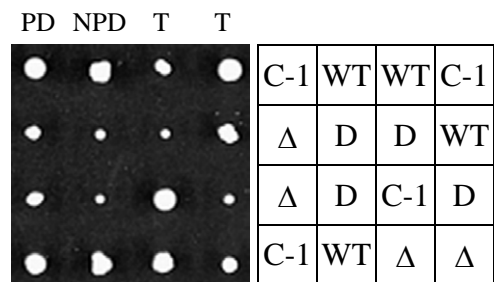
W3439 x *sec22*Δ::*kanMX4*



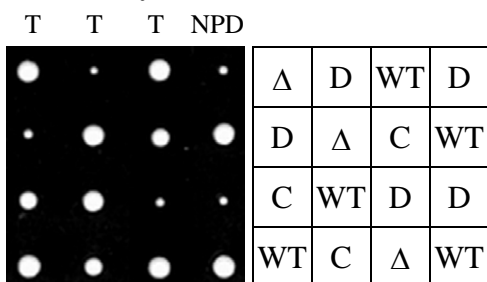
W3129 x *sfh1*Δ::*kanMX4*



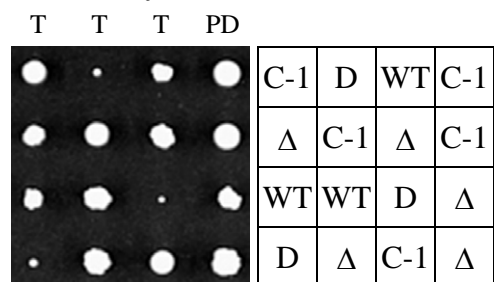
W3439 x *sfh1*Δ::*kanMX4*



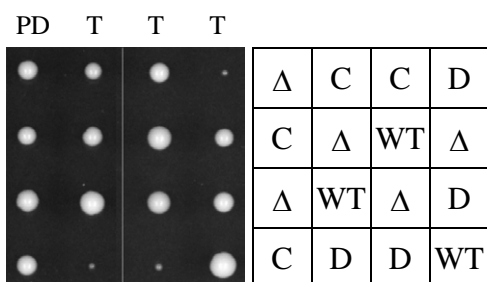
W3129 x *sft2*Δ::*kanMX4*



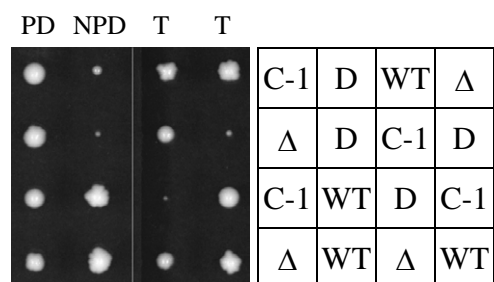
W3439 x *sft2*Δ::*kanMX4*



W3129 x *sic1*Δ::*kanMX4*

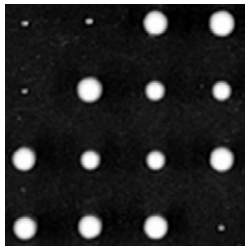
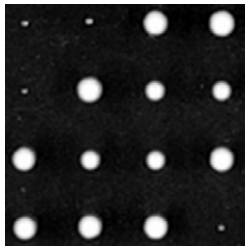
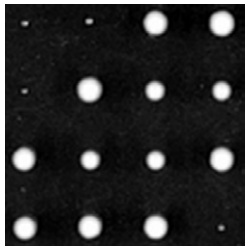
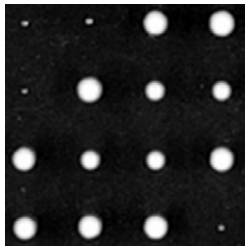


W3439 x *sic1*Δ::*kanMX4*



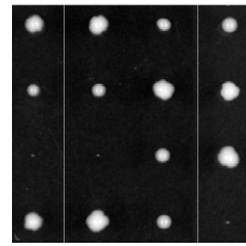
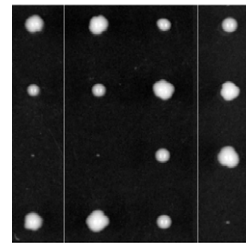
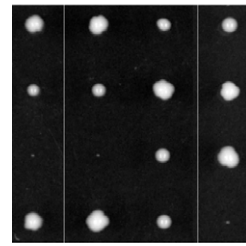
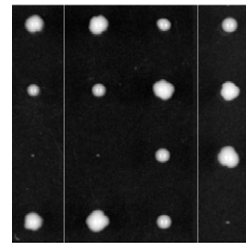
W3129 x *ssf2Δ::kanMX4*

NPD T PD T

	D	D	Δ	WT
	D	Δ	C	C
	WT	C	C	Δ
	WT	WT	Δ	D

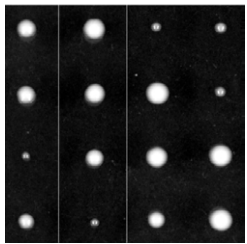
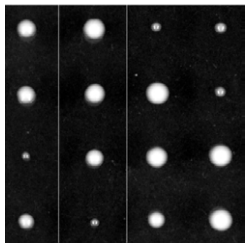
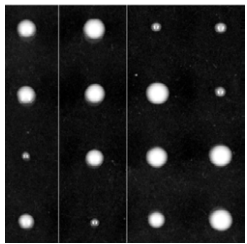
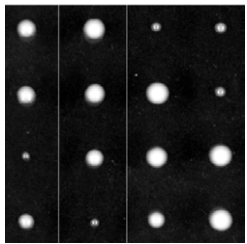
W3439 x *ssf2Δ::kanMX4*

T T PD T

	WT	WT	Δ	C-1
	C-1	C-1	Δ	WT
	D	D	C-1	Δ
	Δ	Δ	C-1	D

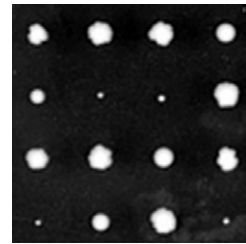
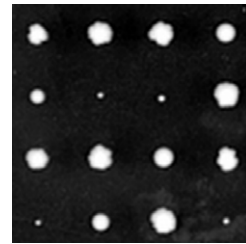
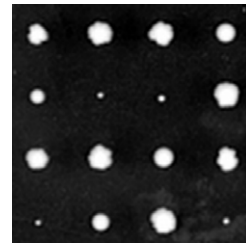
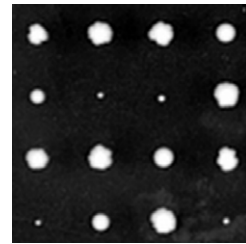
W3129 x *sso1Δ::kanMX4*

T T T NPD

	WT	WT	D	D
	Δ	Δ	Δ	D
	D	C	WT	WT
	C	D	C	WT

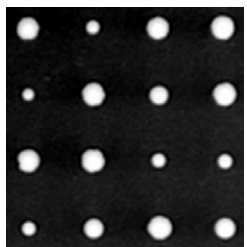
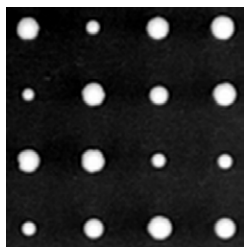
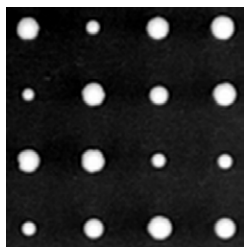
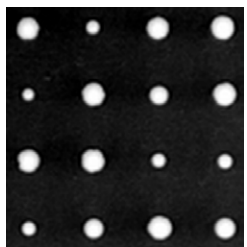
W3439 x *sso1Δ::kanMX4*

T T T T

	WT	WT	Δ	C-1
	C-1	D	D	WT
	Δ	Δ	C-1	Δ
	D	C-1	WT	D

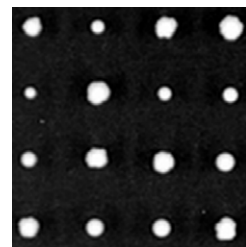
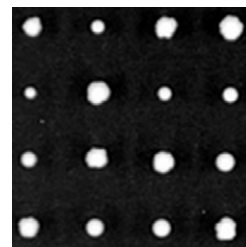
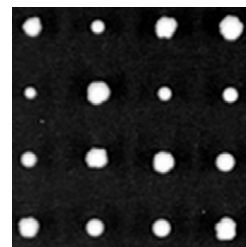
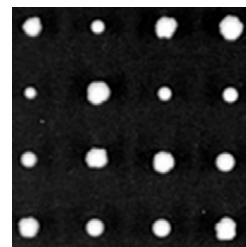
W3129 x *sso2Δ::kanMX4*

NPD T T T

	WT	D	WT	WT
	D	Δ	C	Δ
	WT	WT	D	D
	D	C	Δ	C

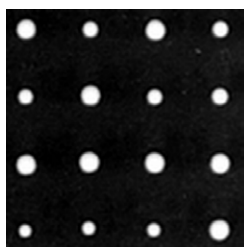
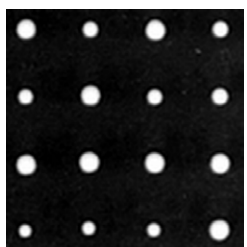
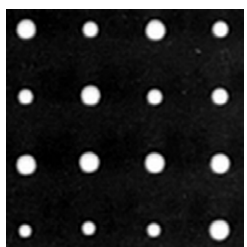
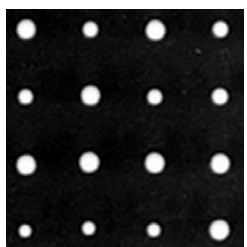
W3439 x *sso2Δ::kanMX4*

T T T T

	WT	D	Δ	WT
	D	Δ	D	D
	C-1	WT	WT	C-1
	Δ	C-1	C-1	Δ

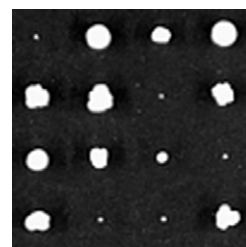
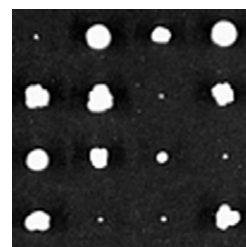
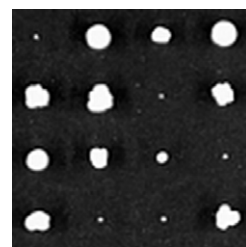
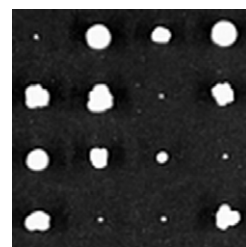
W3129 x *ssp1Δ::kanMX4*

T T T PD

	Δ	C	Δ	C
	C	Δ	C	C
	WT	WT	WT	Δ
	D	D	D	Δ

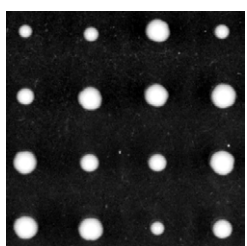
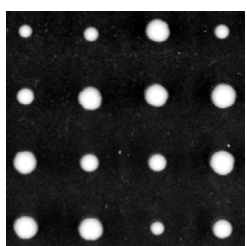
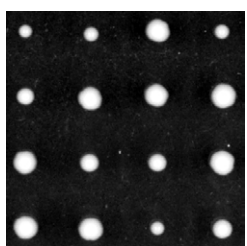
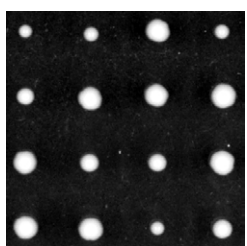
W3439 x *ssp1Δ::kanMX4*

T T NPD T

	D	C-1	WT	C-1
	Δ	WT	D	WT
	C-1	Δ	WT	D
	WT	D	D	Δ

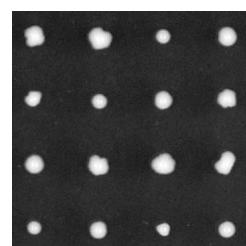
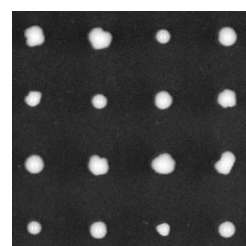
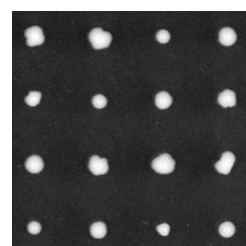
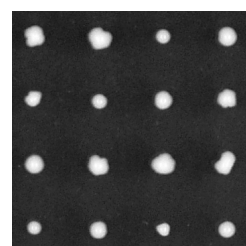
W3129 x *tcb1Δ::kanMX4*

T T T T

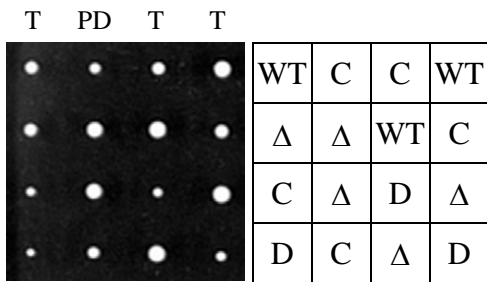
	D	D	WT	D
	C	WT	Δ	WT
	WT	C	C	Δ
	Δ	Δ	D	C

W3439 x *tcb1Δ::kanMX4*

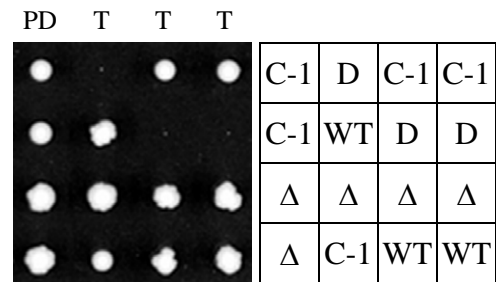
T T T T

	WT	WT	D	C-1
	Δ	D	C-1	WT
	C-1	Δ	WT	Δ
	D	C-1	Δ	D

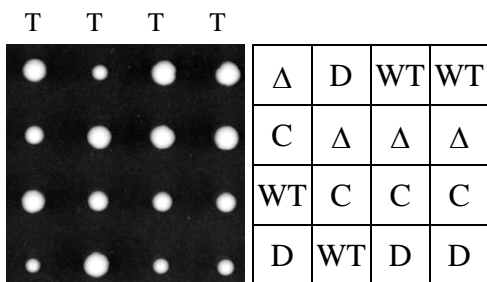
W3129 x *tcb2Δ::kanMX4*



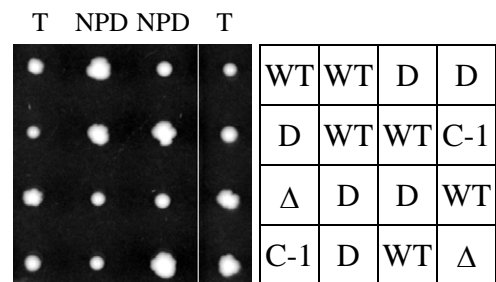
W3439 x *tcb2Δ::kanMX4*



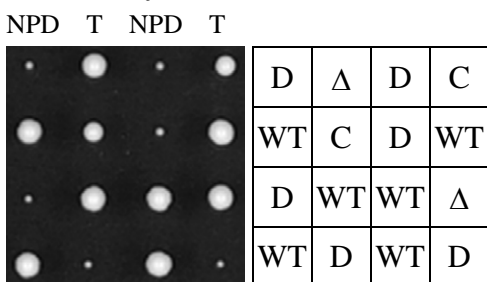
W3129 x *tcb3Δ::kanMX4*



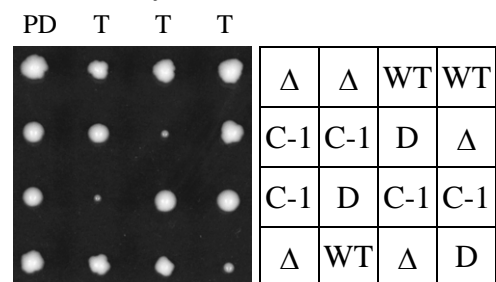
W3439 x *tcb3Δ::kanMX4*



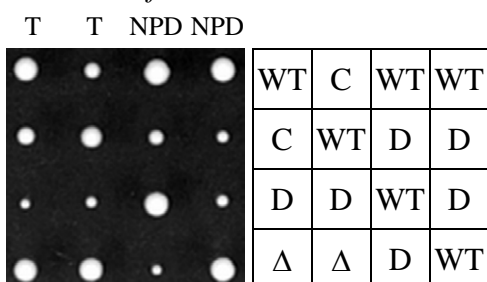
W3129 x *tif1Δ::kanMX4*



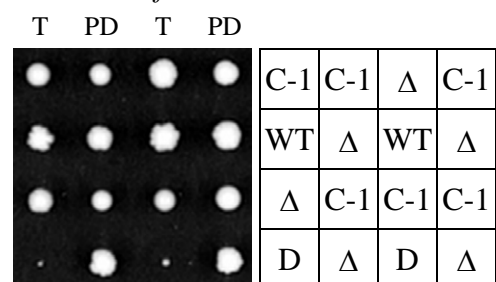
W3439 x *tif1Δ::kanMX4*



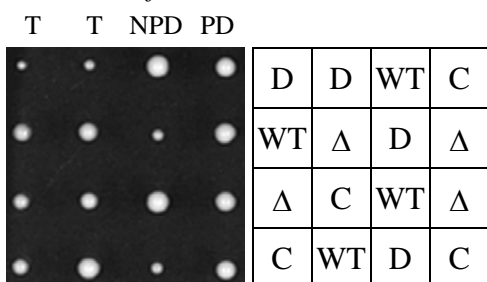
W3129 x *tif2Δ::kanMX4*



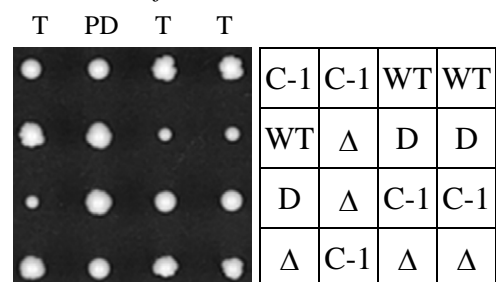
W3439 x *tif2Δ::kanMX4*



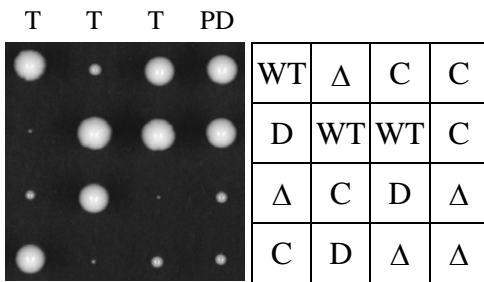
W3129 x *tif3Δ::kanMX4*



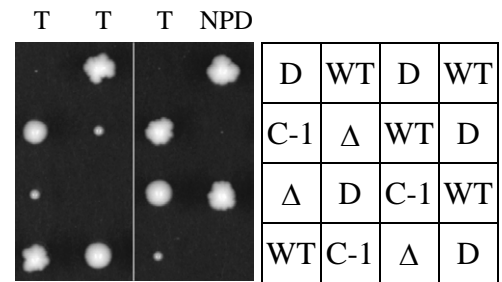
W3439 x *tif3Δ::kanMX4*



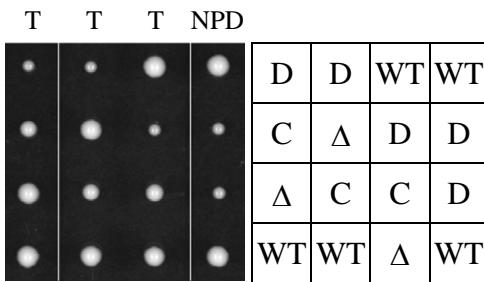
W3129 x *tif4631Δ::kanMX4*



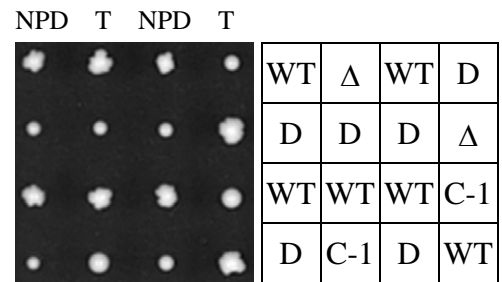
W3439 x *tif4631Δ::kanMX4*



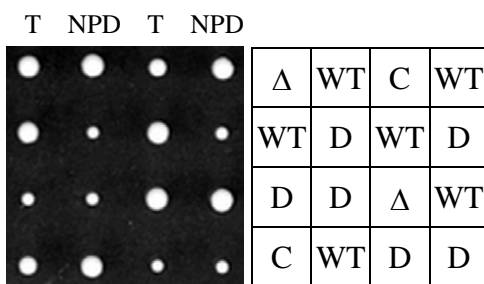
W3129 x *tif4632Δ::kanMX4*



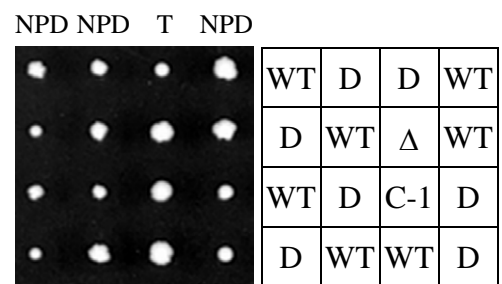
W3439 x *tif4632Δ::kanMX4*



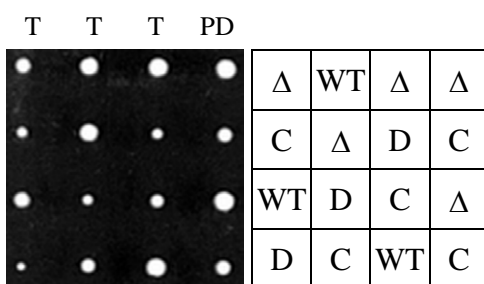
W3129 x *tor1Δ::kanMX4*



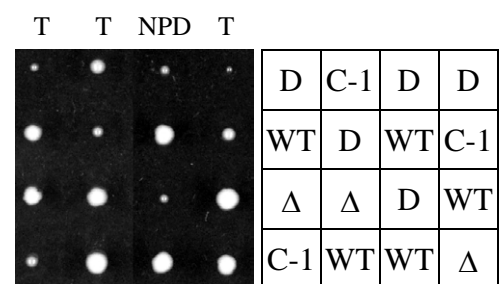
W3439 x *tor1Δ::kanMX4*



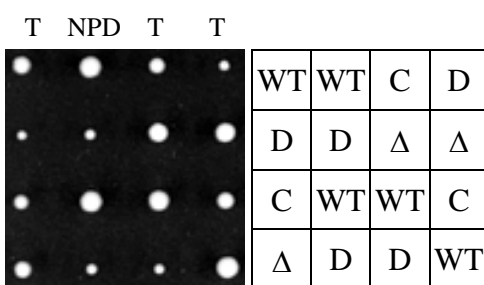
W3129 x *utr2Δ::kanMX4*



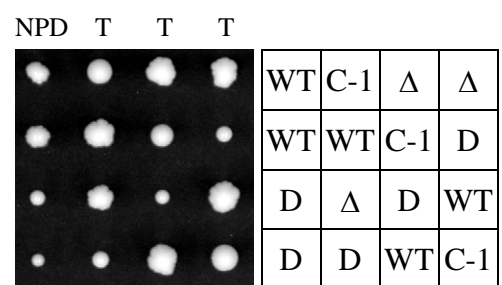
W3439 x *utr2Δ::kanMX4*



W3129 x *whi5Δ::kanMX4*

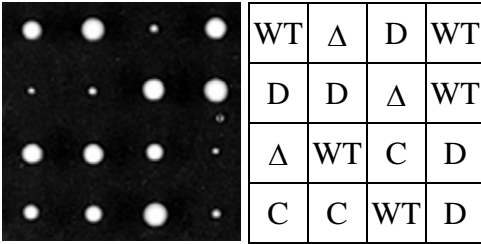


W3439 x *whi5Δ::kanMX4*



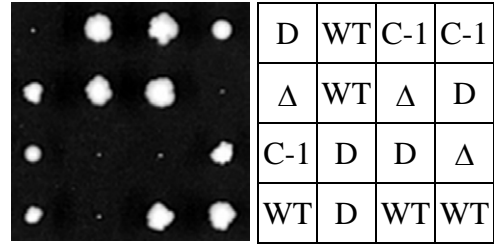
W3129 x *yar029wΔ::kanMX4*

T T T NPD



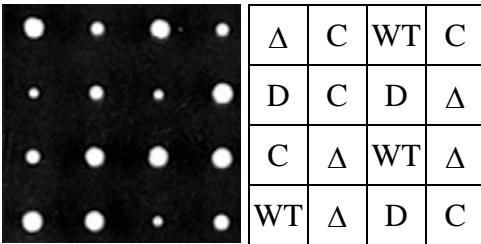
W3439 x *yar029wΔ::kanMX4*

T NPD T T



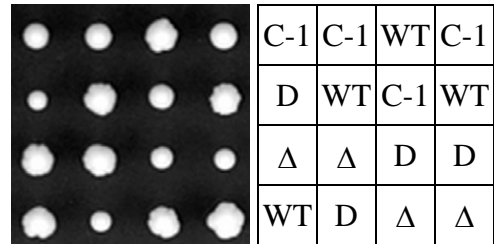
W3129 x *ybl095wΔ::kanMX4*

T PD NPD PD



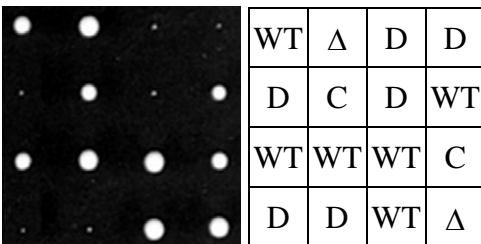
W3439 x *ybl095wΔ::kanMX4*

T T T T



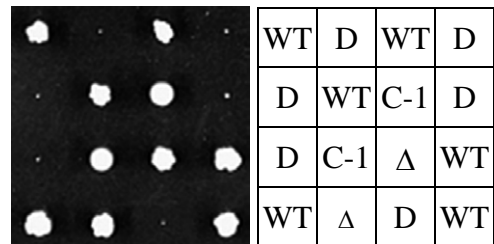
W3129 x *ybr030wΔ::kanMX4*

NPD T NPD T



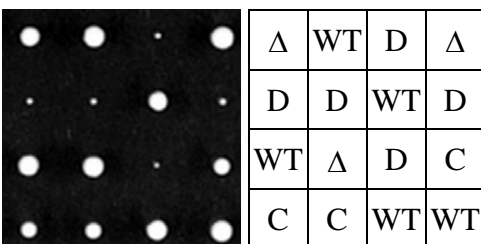
W3439 x *ybr030wΔ::kanMX4*

NPD T T NPD



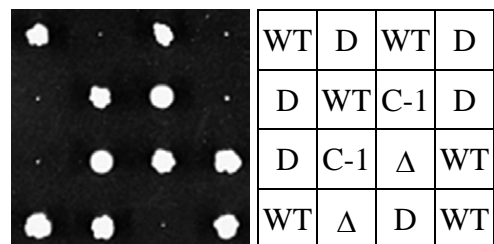
W3129 x *ycl022cΔ::kanMX4*

T T NPD T



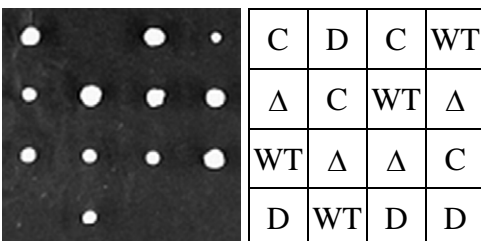
W3439 x *ycl022cΔ::kanMX4*

NPD T T NPD



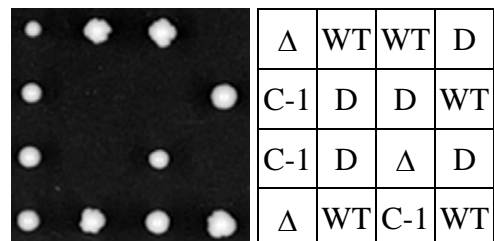
W3129 x *ydj1Δ::kanMX4*

T T T T

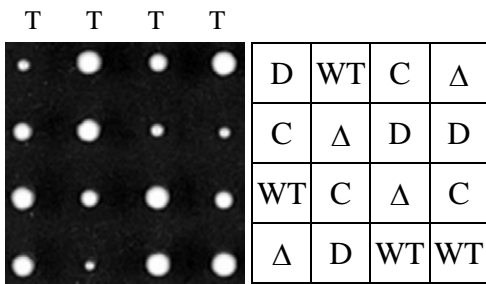


W3439 x *ydj1Δ::kanMX4*

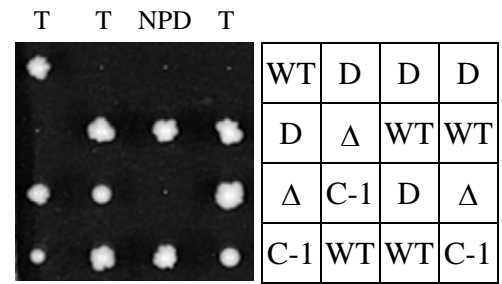
PD NPD T NPD



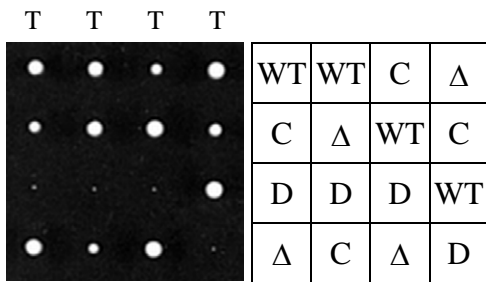
W3129 x *yir003wΔ::kanMX4*



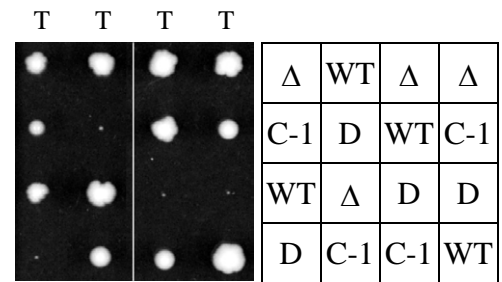
W3439 x *yir003wΔ::kanMX4*



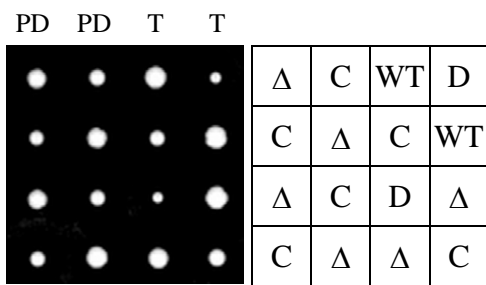
W3129 x *yjl131cΔ::kanMX4*



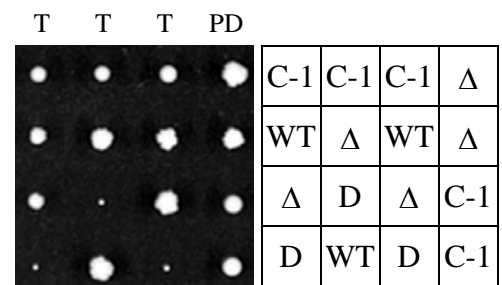
W3439 x *yjl131cΔ::kanMX4*



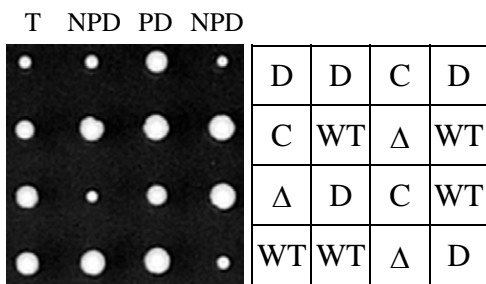
W3129 x *ylr241wΔ::kanMX4*



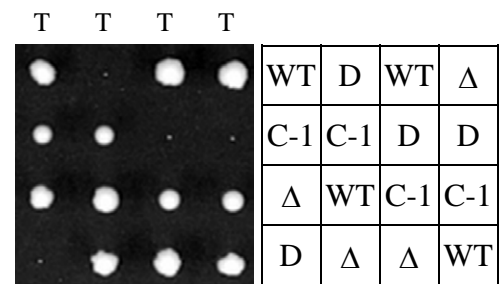
W3439 x *ylr241wΔ::kanMX4*



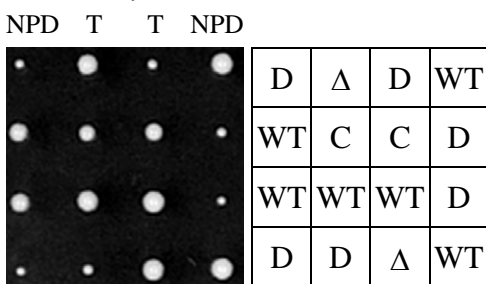
W3129 x *ynl122cΔ::kanMX4*



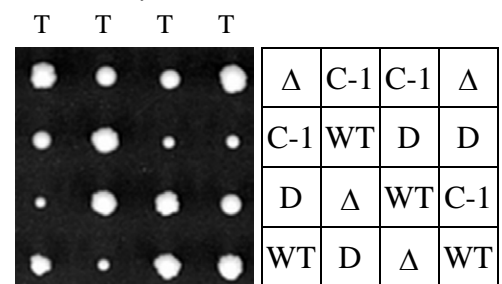
W3439 x *ynl122cΔ::kanMX4*



W3129 x *ynl155wΔ::kanMX4*



W3439 x *ynl155wΔ::kanMX4*





W3129 x *yor331cΔ::kanMX4*

T T NPD NPD

	C	WT	WT	D
	Δ	D	D	WT
	D	C	WT	WT
	WT	Δ	D	D

W3439 x *yor331cΔ::kanMX4*

T T PD T

	Δ	C-1	C-1	D
	C-1	Δ	Δ	Δ
	WT	D	C-1	C-1
	D	WT	Δ	WT

W3129 x *ypl261cΔ::kanMX4*

PD T T PD

	Δ	Δ	Δ	C
	C	WT	WT	C
	C	D	D	Δ
	Δ	C	C	Δ

W3439 x *ypl261cΔ::kanMX4*

T T T T

	WT	WT	Δ	C-1
	Δ	D	D	WT
	C-1	C-1	C-1	D
	D	Δ	WT	Δ

W3129 x *ypr125wΔ::kanMX4*

T T T T

	WT	D	Δ	Δ
	C	C	D	C
	D	WT	C	D
	Δ	Δ	WT	WT

W3439 x *ypr125wΔ::kanMX4*

NPD T T PD

	WT	Δ	WT	Δ
	D	D	Δ	C-1
	D	WT	D	C-1
	WT	C-1	C-1	Δ

## 9.2 Liste einiger, an der Translationsinitiation beteiligten Faktoren

Initiationsfaktor	Gen-Name	Funktion	essentiell
eIF-4G	<i>TIF4631</i>	bindet an eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP•RNA	nein
	<i>TIF4632</i>		nein
eIF-4E	<i>CDC33</i>	bindet an m <sup>7</sup> G-cap der mRNA	ja
eIF-4A	<i>TIF1</i>	ATPase, RNA Helicase	nein
	<i>TIF2</i>		nein
eIF-4B	<i>TIF3</i>	bindet RNA, stimuliert Helicase	nein
eIF-2	<i>SUI2</i>	bindet eIF2B, reguliert die Bindung durch Phosphorylierung	ja
	<i>SUI3</i>	bindet an eIF2B und eIF5	ja
	<i>GCD11</i>	bindet GTP und tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> ,	ja
eIF-2B	<i>GCD1</i>	Nukleotidaustauschfaktor für eIF2, wird durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ reguliert	ja
	<i>GCD6</i>		ja
	<i>GCD2</i>		ja
	<i>GCD7</i>		ja
	<i>GCN3</i>		nein
eIF-3	<i>NIP1</i>	Adapterprotein, bindet an RNA, eIF5, eIF1 und 40S ribosomale Untereinheit	ja
	<i>PRT1 / CDC63</i>		ja
	<i>RPG1 / TIF32</i>		ja
	<i>TIF34</i>		ja
	<i>TIF35</i>		ja
	<i>GCD10</i>		ja
	<i>HCR1</i>		nein
eIF-5	<i>TIF5</i>	stimuliert eIF2 - GTPase	ja
eIF-5A	<i>HYP2 / TIF51A</i>	fördert die erste Peptidbindung	ja
	<i>ANB1 / TIF51B</i>		nein
eIF-1	<i>SUI1</i>	AUG Erkennung	ja
eIF-1A	<i>TIF11</i>	bindet 40S, stimuliert 43S Bildung, <i>Scanning</i>	ja
eIF-5B	<i>FUN12</i>	GTPase, stimuliert Verbindung von 40S und 60S	nein

(siehe auch Hershey 2000)

## 9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Schema des Zellzyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Abb. 3.2	Das Actincytoskelett im Verlauf des Zellzyklus	22
Abb. 3.3	Schematische Darstellung der Translationsinitiation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Abb. 3.4	Schema des Mechanismus der Regulation der <i>GCN4</i> -mRNA-Translation	36
Abb. 4.1	Multipler Sequenzvergleich von Cdc123 mit orthologen Proteinen aus ausgewählten Organismen	41
Abb. 4.2	Humane cDNA von <i>D123</i> ist in der Lage die Deletion von <i>CDC123</i> zu komplementieren	43
Abb. 4.3	Cdc123 und hD123 lokalisieren im Cytoplasma	45
Abb. 4.4	Temperatursensitive Mutanten von Cdc123 akkumulieren bei restriktiver Temperatur Zellen in der G1-Phase mit hohen Mengen an Sic1	47
Abb. 4.5	Cdc123 ist essentiell für das Verlassen der G1-Phase	49
Abb. 4.6	Genetische Interaktionen von <i>cdc123<math>\Delta</math>327-HA3</i> mit nicht essentiellen Translationsinitiationsfaktoren	54
Abb. 4.7	<i>pre9<math>\Delta</math></i> und <i>dep1<math>\Delta</math></i> supprimieren den Wachstumsdefekt von <i>cdc123-1</i>	55
Abb. 4.8	Cdc123 interagiert mit Komponenten von eIF2 (Gcd11, Sui2) nicht aber mit eIF2B (Gcd1, Gcn3) oder eIF3 (Nip1)	57

Abb. 4.9	Gleichzeitige Coimmunpräzipitation von Gcd11-HA3 und Sui2-HA3 mit Cdc123-Myc13	58
Abb. 4.10	Mengenvergleich von Cdc123, Gcd11, Gcd1 und Gcn3	59
Abb. 4.11	<i>cdc123</i> -Mutanten zeigen eine Derepression der <i>GCN4</i> -Translation	62
Abb. 4.12	<i>cdc123</i> -Mutanten zeigen einen Verlust an Polysomen	63
Abb. 4.13	Cdc123 interagiert nicht mit der kleinen ribosomalen Untereinheit	65
Abb. 4.14	Cdc123 interagiert mit Gcd11 in einem von Ribosomen geklärten Überstand	66
Abb. 4.15	Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in Saccharosegradienten	68
Abb. 4.16	Lokalisation von Cdc123 und Gcd11 in Saccharosegradienten mit und ohne RNase-Behandlung	70
Abb. 4.17	Gcd11 interagiert gleichermaßen mit verschiedenen Cdc123-Mutanten	71
Abb. 4.18	Cdc123 tritt als Monomer auf	72
Abb. 4.19	Proteinmengen von Gcd11 und Cdc123-Myc13 nach Behandlung mit Rapamycin	73
Abb. 4.20	Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von eIF2 $\alpha$ .	74
Abb. 4.21	Genetische Interaktion von <i>CDC123</i> mit <i>SUI2</i> und <i>GCD11</i>	75
Abb. 4.22	eIF2 $\alpha$ und eIF2 $\gamma$ Mengen nach dem Abbau von Cdc123-1	77
Abb. 4.23	Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ an Serin 51 ist in Stämmen mit <i>cdc123<math>\Delta</math>C</i> verringert	78
Abb. 4.24	Die Deletionen <i>dma1<math>\Delta</math></i> und <i>dma2<math>\Delta</math></i> können <i>cdc123-4</i> nicht supprimieren	80
Abb. 4.25	Zellen ohne Cdc123-Aktivität mit den Deletionen <i>dma1<math>\Delta</math></i> <i>dma2<math>\Delta</math></i> ist es nicht möglich, die G1-Phase zu verlassen	80
Abb. 4.26	Wachstum auf XYGal bzw. XYD Medium bei unterschiedlichen Temperaturen	81
Abb. 4.27	Der Verlust von Cdc123-Aktivität hat eine Abnahme der Mengen von Dma1 und Dma2 zur Folge	82
Abb. 4.28	Die Halbierung der Gcd11-Menge hat nur minimale Auswirkungen	83
Abb. 4.29	Komplementation von <i>cdc123<math>\Delta</math></i> durch die Überexpression von <i>GCD11</i>	85
Abb. 4.30	Zellen ohne eIF2 $\gamma$ arretieren in der G1-Phase	87
Abb. 4.31	Komplementation von <i>cdc123<math>\Delta</math></i> durch die Überexpression von eIF2-Untereinheiten	89
Abb. 4.32	In <i>cdc123</i> -Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 1	92
Abb. 4.33	In <i>cdc123</i> -Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 2	93
Abb. 4.34	In <i>cdc123</i> -Mutanten ist die Interaktion der eIF2-Untereinheiten verringert - 3	94
Abb. 5.1	Synthetisch genetische Interaktionen von Komponenten der Translationsinitiation	97
Abb. 5.2	Ein mögliches Modell der Wirkungsweise von Cdc123	104

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	Liste der per Tetradenanalyse bestätigten genetischen Interaktionen mit <i>cdc123</i> -Mutanten	52
Tabelle 4.2	Cdc123 interagiert mit Gcd11 aber nicht mit Sui2 oder Sui3 in Zwei-Hybrid Interaktionsstudien	56
Tabelle 6.1	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	114
Tabelle 6.2	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	117
Tabelle 6.3	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme	118

## 10 LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben:

Name: Frank Richter  
 Adresse: Rohrer Straße 117  
 70771 Leinfelden-Echterdingen  
 geboren: 09.02.1976 in Esslingen am Neckar  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1982-1986 Ludwig-Uhland-Grundschule, Leinfelden  
 1986-1995 Immanuel-Kant-Gymnasium, Leinfelden, Abitur

### Zivildienst

09/1995 – 09/1996 Aktion Multiple Sklerose Erkrankter (AMSEL)  
 Kontaktgruppe Stuttgart-Degerloch und Westfilder

### Studium

10/1996 – 02/2002 Technische Biologie, Universität Stuttgart, Diplom

### Diplomarbeit

02/2001 – 02/2002 Australian National University  
 John Curtin School of Medical Research,  
 Division of Molecular Medicine, Dr. R. T. Baker  
 in Zusammenarbeit mit  
 Universität Stuttgart  
 Institut für Biochemie, Prof. Dr. D. H. Wolf  
 Titel: *Ubp3 and Ubp15 – search for interacting proteins*

### Promotion

05/2002 – 02/2006 Universität Stuttgart  
 Institut für Industrielle Genetik, Prof. Dr. W. Seufert  
 Titel: *Das konservierte Zellproliferationsgen CDC123 kodiert für einen Initiationsfaktor der Translation: 2 $\gamma$ -AP*

Leinfelden, 08.03.2006

Während dieser Arbeit wurde ich durch viele Menschen unterstützt. Diesen gilt nun mein Dank.

Besonderes bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Betreuung meiner Arbeit, für Freiräume, Diskussionen und wertvolle Anregungen. Bei Prof. Dr. Dieter H. Wolf bedanke ich mich ebenfalls für seine Unterstützung, nicht nur während meiner Promotion. Dr. Michael Schwab war mir eine große Hilfe mit der Durchführung der SGA-Screens in Toronto. Für die Durchführung diverser Klonierungen und der Zwei-Hybridstudien bedanke ich mich bei Sylvia Willi. Die Aufnahmen der HeLa-Zellen wären mir ohne Marcus Branschädel nicht möglich gewesen. Folgenden Menschen gilt mein Dank für die Bereitstellung von Antisera oder Plasmiden, die in dieser Arbeit verwendet wurden: Ernest M. Hannig, Thomas F. Donahue, Beatriz A. Castilho, Herbert Tschochner, Alan G. Hinnebusch, Christer Höög und Tobias von der Haar. Ebenfalls danke ich denjenigen, deren bereitwillige Gaben nicht in dieser Arbeit niedergeschrieben wurden: Maurizio Onisto, Kai Simons, Benjamin Glick, Michael N. Hall. Falls nicht jeder namentlich erwähnt wurde liegt dies an der großen Zahl bereitwillig helfender und freigiebiger Menschen, die mich unterstützt haben und denen ich meinen Dank schulde. Mit Sicherheit sind dies auch alle Kollegen und Kolleginnen am IIG, insbesondere die Bewohner des S3-Labors (Dr. Angelika Wegerer, Dr. Doreen Möcker, Jörg Reißing, zeitweise auch Christa Bücken und besonders Thomas Dünnebier) und des roten Labors (Esther Owsianowski, Nic Diergardt, Christine Geil) nicht zuletzt wegen der guten Laboratmosphäre.

Meinem Bruder Stephan danke ich für aufmunternde Worte von Zeit zu Zeit am Telefon.

Ohne die stetige Unterstützung von Heidi, ihrem Verständnis, ihrer ständige Bereitschaft, mir zuzuhören, die Entbehrungen und Korrekturen während des Schreibens wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Meinen Eltern danke ich zuletzt, aber nicht am wenigsten, dass sie es mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen.



