

Das Kinetochorprotein Slk19: Funktion und
Interaktion mit der proteasomalen
Untereinheit Pre4

vorgelegt von

Joachim Schmidt

geboren in Ellwangen

von der Fakultät Chemie
der Universität Stuttgart
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Hauptberichter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt

Mitberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 06. 2005

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

der Universität Stuttgart

2005

meinen Eltern gewidmet

VORWORT

Herrn Prof. Dr. D.H. Wolf gilt mein Dank für die Möglichkeit und Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation an seinem Institut. Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt danke ich für die Betreuung, ideenreiche Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Ausführung der Arbeit sowie für die fachliche und kritische Unterstützung beim Lesen des Manuskripts.

Bei den Mitgliedern meines Labors Harish Karnam, Rui Estiveira, Kumar Iyappan Saravana, Julia Ilyina und den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie bedanke ich mich für angeregte Diskussionen, stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Außerdem möchte ich mich besonders bei Dragica Kapucija für ihre stete aufmunternde Unterstützung in allen Belangen bedanken.

Klaus Schmid, Michael Hoffmann, Rolf Kugler gilt an dieser Stelle ebenfalls ein besonderes Dankeschön für ihre ständige Unterstützung und Motivation während meiner Zeit an der Universität Stuttgart.

Mein größter Dank gilt aber vor allem meinen Eltern, die mich durch ihren uneingeschränkten Rückhalt immer motiviert und während dem Studium und der Promotion immer tatkräftig in allen Belangen unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2000 bis April 2005
am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart (Prof. Dr. Dieter H. Wolf) unter der
Leitung im von Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt angefertigt.

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Quellen und
Hilfsmittel als die angegebenen benutzt zu haben.

Stuttgart, den 29.04.2005

Joachim Schmidt

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	12
1 EINLEITUNG	19
1.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ein Beispielorganismus für Eukaryontenzellen	19
1.2 Proteolyse	20
1.2.1 Proteasomen	21
Das 20S-Proteasom	22
Das 26S-Proteasom	24
1.2.2 Das Ubiquitin-System.....	25
1.2.3 Proteolyse-Signale	27
1.2.4 Funktionen der Proteasomen	28
1.3 Der Zellzyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.3.1 Zellzykluskontrolle	30
1.3.2 Das MEN-Netzwerk	32
1.3.3 Das FEAR Netzwerk	33
1.3.4 Meiose	34
1.3.5 Slk19 (Yor195w).....	36
Funktion von Slk19 in der Meiose.....	37
Funktion von Slk19 in Mitose.....	38
Slk19 zeigt Abhängigkeit von <i>pre4</i> Mutationen.....	39
1.4 Suche nach direkten Interaktionen zwischen Proteinen	39
1.4.1 Synthetische Letalität.....	39
1.4.2 Co-Immunopräzipitation	40
1.4.3 „Two-Hybrid“-Experimente.....	40
1.5 Zielsetzung der Arbeit	41
2 MATERIAL UND METHODEN	43
2.1 Geräte und Chemikalien	43
2.1.1 Geräte	43
2.1.2 Chemikalien	43
2.2 Medien	44
2.2.1 Hefemedien	44
Vollmedium (YPD).....	44
Synthetisches Vollmedium (CM).....	44
Minimalmedium (MV)	45
5-FOA Medium.....	45
2.2.2 Medien für <i>E.coli</i> Kulturen.....	45
Vollmedium (LB).....	45

SOC-Medium.....	45
Sporulationsmedium.....	46
2.3 Wachstumsbedingungen	46
2.3.1 Hefen	46
Dauerkulturen.....	46
2.3.2 E. coli.....	46
Dauerkulturen	46
2.3.3 Zellwachstumsbestimmung.....	46
2.4 Stämme und Plasmide.....	47
2.4.1 Verwendete Hefestämme	47
2.4.2 E. coli Stämme	51
2.5 Verwendete Plasmide	51
2.5.1 <i>p15 E4 pRS 315 Δ Ecl136II HindII::PRE4 5'→3'</i>	51
2.5.2 <i>p15UBE4 pRS 315 Δ SphI BamHI::UBI::PRE4 5'→3'</i>	51
2.5.3 <i>pUG6 loxP KAN^R loxP ampR</i>	52
2.5.4 <i>pL079 loxP K. l-URA3 loxP ampR</i>	52
2.5.5 <i>pMA 1428 KAR3 HIS3 CEN4</i>	52
2.5.7 <i>CB362 Amp^R TRP1</i>	52
2.5.8 <i>pACT2 Amp^R LEU2</i>	52
2.5.9 <i>pAS1 Amp^R TRP1</i>	52
2.5.10 <i>pAS2 Amp^R CYH2 TRP1</i>	53
2.5.11 <i>pJZ1 CB362 Δ EcoRI BamHI::PRE4 4-801 5'→3'</i>	53
2.5.12 <i>pJZ3 pAS2 Δ NcoI BamHI::PRE4 91-801 5'→3'</i>	53
2.5.13 <i>pJZ6 CB362 Δ SalI PstI::PRS2 158-756 5'→3'</i>	53
2.5.14 <i>pJZ46 pACT2 Δ BamHI XhoI::slk19Δ 1- 963 5'→3'</i>	54
2.5.15 <i>pJZ47 pACT2 Δ BamHI XhoI:: slk19Δ 1- 3 5'→3'</i>	54
2.5.16 <i>CB440 Amp^R TRP1 LAMIN C</i>	54
2.6 Konstruierte Plasmide.....	54
2.6.1 <i>pJJ14-1 pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-72 5'→3'</i>	54
2.6.2 <i>pJJ14-1x pJJ 14-1 Δ Ecl 136II XbaI::pre4-72 Δ 672-801 5'→3'</i>	55
2.6.3 <i>p15 E4x p15 E4 Δ Ecl 136II XbaI::PRE4 Δ 672-801 5'→3'</i>	55
2.6.4 <i>pJJ15 pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-142 5'→3'</i>	55
2.6.5 <i>pJJ16 pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-60 5'→3'</i>	55
2.6.6 <i>pJJ17 pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-52 5'→3'</i>	55
2.6.7 <i>CB362 pre4-72 CB362 Δ EcoRI BamHI::pre4-72 4-801 5'→3'</i>	56
2.6.8 <i>pAS1 pre4-72 pAS1 Δ EcoRI BamHI::pre4-72 4-801 5'→3'</i>	56
2.6.9 <i>pAS2 pre4-72 pAS2 Δ NcoI BamHI::pre4-72 91-801 5'→3'</i>	56
2.7 Molekularbiologische und biochemische Methoden	56
2.7.1 Häufig verwendete Puffer	57
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli („boiling mini prep“)	57
2.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe („plasmid rescue“).....	57
2.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe	57
2.7.5 Restriktionen und Ligationen	58
Probeverdau	58
Präparativer Verdau von DNA.....	58

Ligationen von DNA-Fragmenten.....	59
2.7.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	59
2.7.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	59
2.7.8 PCR.....	59
PCR am Pharmacia (ein Heizblock).....	59
PCR am Stratagene PCR-Gerät RoboCycler 40 (vier Heizblöcke).....	60
2.7.9 Reinigung von DNA Fragmenten.....	60
2.7.10 DNA Sequenzierung.....	61
2.7.11 Verwendete Oligonukleotide.....	61
2.7.12 Transformation von E.coli durch Elektroporation.....	62
Herstellung kompetenter Zellen.....	62
Elektroporation von E.coli Zellen.....	62
2.7.13 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode.....	63
2.8 Proteinbiochemische Methoden.....	63
2.8.1 Denaturierende alkalische Lyse.....	63
2.8.2 Nativer Zellaufschluß.....	64
2.8.3 Herstellung der Antikörper-Matrix.....	64
2.8.4 Immunopräzipitation unter nativen Bedingungen.....	65
2.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
2.8.6 Western-Blot.....	66
2.8.7 In <i>situ</i> Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität.....	66
2.8.8 In situ Nachweis der Peptidyl-glutamyl-peptid spaltenden Aktivität (PGPH) des Proteasoms (Overlay-Test).....	67
2.8.9 In situ Nachweis der chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms (Overlay-Test) ..	68
2.9 Physiologische Methoden.....	68
2.9.1 Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen.....	68
2.9.2 Kreuzung von Hefestämmen.....	69
2.9.4 Sporulation und Tetradendissektion.....	69
3 ERGEBNISSE.....	70
3.1 Synthetische Wechselwirkungen von <i>pre4</i> Mutanten.....	70
3.1.1 Suche nach mutierten <i>pre4</i> Allelen mit synthetischer Letalität in <i>kar3</i> Nullmutanten ..	70
Screeningmethode.....	71
3.1.2 Erzeugung der <i>pre4-72</i> Mutanten.....	73
Kontrolle des Ausgangsstamms YHi39/1/2 α	73
Modifizierung des Markergens im Ausgangsstamm YHi39/1/2 α	73
Deletion von <i>KAR3</i> in YRL3 durch <i>KAN^R</i>	74
Erzeugung und genomische Integration mutagener <i>PRE4</i> Sequenzen.....	75
Kontrolle der mutagenen <i>PRE4</i> Sequenzen.....	76
3.1.3 Reproduktion der auf <i>pre4-72</i> basierenden synthetischen Letalität.....	77
Methodik.....	77
Isolierung des <i>pre4-72</i> Plasmids.....	78
Retransformation der <i>pre4-72</i> Plasmide bestätigt synthetische Letalität mit <i>kar3</i> Δ	79
3.1.4 Lokalisierung der <i>pre4-72</i> Mutationen.....	81
Aufklärung der <i>pre4-72</i> Sequenz.....	81
Lokalisierung im Protein und im Proteasomenkomplex.....	84
3.1.5 Synthetische Effekte von <i>pre4-72</i> Einzelmutationen.....	86

Isolierungsstrategie der <i>pre4-72</i> Mutationen.....	86
Kontrolle der klonierten verkürzten Vektoren <i>p15 E4x</i> und <i>pJJ14/1x</i>	87
Klonierung von <i>pJJ15</i> und <i>pJJ16</i>	88
Klonierung von <i>pJJ17</i> (10)	89
Sequenzanalyse der Plasmide <i>pJJ15</i> , <i>pJJ16</i> und <i>pJJ17</i>	89
Einzelmutationen von <i>pre4-72</i> zeigen keine synthetische Letalität mit <i>kar3Δ</i>	90
3.1.6 Einfluss von <i>pre4-72</i> in Mitose und Meiose.....	92
Chromosomale Integration von <i>pre4-72</i> am <i>PRE4</i> -Lokus eines mit <i>K1-URA3</i> deletierten Hefestamms	92
Chromosomale Integration von <i>pre4-72</i> am <i>PRE4</i> -Lokus in YMB180	95
Erzeugung <i>pre4-72</i> abhängiger, homozygot diploider Stämme.....	99
Während der Sporulation von <i>pre4-72</i> abhängigen Diploiden mit <i>KAN^R</i> -Deletion von <i>PRE4</i> tritt keine signifikante Dyadenbildung ein	102
Stabilität künstlicher Chromosomen in <i>pre4-72</i> Mutanten während der mitotischen Teilung	103
3.1.7 Proteasomale Aktivitäten in Abhängigkeit vom <i>pre4-72</i> Allel	105
Die chymotrypsinähnlichen Aktivitäten in <i>pre4-72</i> Mutanten zeigen Wildtypcharakter .	106
Die PGPH Aktivitäten in <i>pre4-72</i> Mutanten zeigen Wildtypcharakter	107
3.2 „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19.....	108
3.2.1 Konstruktion von Vektoren mit Fusionen von <i>pre4-72</i> und DNA-Bindedomänen	110
3.2.2 Klonierung des <i>pre4-72</i> Allels an die Sequenzen der DNA-Bindedomänen in den Vektoren <i>CB362</i> , <i>pAS1</i> und <i>pAS2</i>	110
Erzeugung vom <i>EcoRI/BamHI-pre4-72</i> Fragment	110
Erzeugung vom <i>NcoI/BamHI-pre4-72</i> Fragment	111
Klonierung vom Vektor <i>CB362 pre4-72</i>	111
Klonierung von <i>pAS1 pre4-72</i>	112
Klonierung von <i>pAS2 pre4-72</i>	113
Kontrolle der „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4-72 Proteinen im Testerstamm CY630.....	114
Kontrolle der „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Pre4-72 Proteinen und Slk19 im Testerstamm Y190	117
3.3 Immunopräzipitationsexperimente.....	119
3.3.1 Co-Immunopräzipitationen von Slk19(HA) ₃ zeigen keine Interaktion zwischen Slk19 und den proteasomalen Untereinheiten Cim5, Pre6 und dem C-Terminus des Proteasoms .	119
3.3.2 Co-Immunopräzipitationen mit synchronisierten Zellen	120
Erzeugung von <i>SLK19::HA₃ cdc5-1</i> -Dopplemutanten.....	120
Erzeugung von <i>SLK19::HA₃ cdc15-2</i> -Dopplemutanten.....	121
Erzeugung von <i>PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1</i> -Mutanten.....	122
Erzeugung von <i>PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-2</i> -Mutanten.....	123
Co-Immunopräzipitationen mit Slk19(HA) ₃ von synchronisierten Zellen können Interaktion zwischen Slk19 und dem Proteasom nicht bestätigen	125
Co-Immunopräzipitationen mit Pre6-ProtA von synchronisierten Zellen zeigen Interaktion zwischen dem Proteasom und Slk19	128
4 DISKUSSION	134
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	141

Abstract

Regulation of key processes of the cell cycle like DNA replication or correct separation and transport of chromosomes play a very important role for the genetic stability of cells and the development of eukariotic organisms. Thus defects of proteins responsible for cell cycle regulation cause severe failures in important steps of the cell cycle. It was shown that knockout of the *SLK19* gene coding for a kinetochore protein causes strong defects in meiosis and in mitosis as for instance failures in chromosome segregation or reduced viability in these cells.

A key player for cell cycle regulation is the proteasome, which is a multi-catalytic protease responsible for degradation of cell cycle regulators and proteins that build structural elements of the cell cycle machinery. Therefore mutations in proteasomal subunits and proteins, which directly interact with proteasome induce crucial defects in cell cycle regulation.

A previous two hybrid screen, established to identify proteins that interact with the proteasomal subunit Pre4, uncovered Slk19. Affinity chromatography experiments using Slk19-GST fusions confirmed the interaction between Pre4 and Slk19 *in vitro* (Zimmermann 1998).

Slk19 is a 95 kDa protein, which belongs to the group of “coiled-coil” proteins. Immunoblot analyses of epitop-tagged fully functional Slk19(HA)₃ detected four modified forms of Slk19 protein, one at 98 kDa and three between 120-150 kDa. These high molecular weight versions of Slk19 were in agreement with the results of Sullivan and Pfiz, who had shown that the appearance of posttranslational modifications of Slk19 on one hand is due to phosphorylation and on the other hand is due to processing of Slk19 by the separase Esp1 (Sullivan et al. 2001, Pfiz 1999).

Additional work had shown that Slk19 localizes at the kinetochores (spindle pole bodies) and the mitotic spindles and that the deletion of *SLK19* induces synthetic lethality in nullmutants of *KAR3*, which codes for a kinesin motor protein (Zeng et al. 1999).

The aim of this work was to confirm the interaction between Slk19 and Pre4 by genetic as well as biochemical means and to analyse the function of Pre4-Slk19 interaction in more detail.

A genetic approach was used to isolate mutant *pre4* alleles that cause neutralization of the Slk19-Pre4 interaction. For this purpose the known synthetic lethal effect induced by deletion of *SLK19* in *kar3* null mutants was used. If Slk19-Pre4 interaction was crucial for the

essential function of Slk19 in cells lacking Kar3, it should be possible to isolate mutated *pre4* alleles that like *slk19Δ* cause synthetic lethality in *kar3Δ* background.

Using this strategy in fact a mutated *pre4* allele (*pre4-72*) was identified, that showed synthetic lethality specifically in combination with the deletion of *KAR3*. This finding provided an additional, important proof for the Pre4-Slk19 interaction. Analysis of the *pre4-72* sequence uncovered three point mutations in the ORF of *PRE4*. One mutation N20K located in the N-terminal region of Pre4, which is removed during assembly of the proteasome by processing. The other two mutations M52L and M142K remain in the mature form of Pre4.

By using x-ray structure data of the 20S proteasom complex both point mutations M52L and M142K were located in furrows/pockets at the proteasomal surface. These findings demonstrate the accessibility of this positions in domains of Pre4, which potentially allow interaction with Slk19.

In contrast to *pre4-1* mutants, which show a strong defect in proteasomal PGPH activity, *pre4-72* mutants exhibited normal PGPH activity. This result indicated, that the synthetic effects induced by combination of *pre4-72* and *kar3Δ* was based on the interruption of Pre4-Slk19 interaction but not due to a defect of the proteolytic activity of the proteasome.

The point mutations present in *pre4-72* were separated and individually checked for their ability to cause synthetic effects with *kar3Δ*. In any case no synthetic defects were measured indicating that the combination of both point mutations M52L and M142K is required to induce synthetic lethality in cells lacking Kar3. However, analysis of the separated point mutations uncovered, that the general growth defect of *pre4-72* mutants is mainly based on the point mutation M142K.

To confirm the loss of Pre4-Slk19 interaction in *pre4-72* mutants a two hybrid test was performed using Slk19 and Pre4-72. This test clearly proved that Slk19-Pre4 interaction is abolished for mutant Pre4-72 protein.

Cells containing *pre4-72* alleles were also investigated for potential defects in meiosis or mitosis cell cycle phenotypes. In contrast to null mutants of *SLK19* *pre4-72* cells did not show enhanced formation of dyades instead of tetrades during meiosis.

Unlike *slk19* null mutants monitoring the stability of artificial chromosomes (YACS) in *pre4-72* mutants displayed only slightly increased loss of artificial chromosomes in progression of mitotic division cycle. But at least the *pre4-72* allele bears a negative influence on the growth of yeast cells.

Attempts of chromosomal integration of *pre4-72* at the *PRE4*-locus resulted in recovery of the *PRE4* wildtype sequence. This finding suggests, that as compared with wildtype alleles chromosomally encoded *pre4-72* mutants are dramatically disadvantaged.

Former immunoprecipitation experiments, could not clarify the question whether Slk19 interacts only with Pre4 or with the whole 20S proteasome complex. Therefore co-immunoprecipitation experiments with HA-epitope tagged Slk19 now using protein-A-tagged Pre6 were carried out. Immunoprecipitations of 20S proteasomes from native extracts of synchronised cells, using Pre6-ProtA as the anti-genetic determinant resulted in the detection of Slk19(HA)₃ signals indicating the interaction between Slk19 and the proteasome complex. Comparison of the Slk19(HA)₃ signals detected with the modified versions of Slk19(HA)₃, found in different phases of the cell cycle lead to the suggestion, that interaction between Slk19 and the proteasome is regulated in a cell cycle dependent manner.

The summarised results of this work confirm the model, that Slk19 interacts with the proteasomal complex. The findings in addition point out that the function of Slk19-Pre4 interaction is required for crucial cell cycle events.

Zusammenfassung

Der koordinierte und regulierte Ablauf von Prozessen zur korrekten Vervielfältigung, Trennung und dem zielgerichteten Transport der Chromosomen, spielt im Verlauf des Zellzyklus eine sehr wichtige Rolle für die genetische Stabilität der Zellen und die Entwicklung eines Organismus. Veränderungen in den verantwortlichen Proteinen können drastische Auswirkungen auf diese Abläufe haben. So zeigen Nullmutanten des Kinetochorproteins Slk19 der Hefe *S. cerevisiae* in unterschiedlichen Stämmen starke Effekte in Meiose sowie Mitose. Dazu gehören Chromosomenmisskonfigurationen und reduzierte Lebensfähigkeit.

Da der korrekte Ablauf des Zellzyklus durch den selektiven Abbau von zellzyklusspezifischen Proteinen über das Proteasom entscheidend beeinflusst wird, führen sowohl Veränderungen im Proteasekomplex Proteasom als auch in Proteinen, die mit dem Proteasom interagieren zu entscheidenden Fehlern.

Auf der Suche nach Proteinen, die mit der Proteasomenuntereinheit Pre4 interagieren, wurde mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems das Kinetochorprotein Slk19 gefunden (Zimmermann 1998). Durch Affinitätschromatographieexperimente mit GST-Fusionsproteinen von Slk19 konnte die Wechselwirkung zwischen der proteasomalen Untereinheit Pre4 und Slk19 *in vitro* weiter nachgewiesen werden (Zimmermann 1998).

Slk19 ist in die Gruppe der „coiled-coil“-Proteine einzuordnen (Lupas et al. 1991) und besitzt eine theoretische molekulare Masse von 95 kDa. Das in dieser Arbeit exprimierte, epitopmarkierte Slk19(HA)₃ weist nach Immunoblotanalysen drei Modifikationen mit Molekulargewichten zwischen 120 und 150 kDa, sowie ein Signal beim erwarteten Molekulargewicht von 98 kDa auf. Dies bestätigte die sowohl von Sullivan als auch Pfiz gezeigten Daten, dass Slk19 in posttranslational modifizierten Variationen auftritt, die einerseits durch Phosphorylierung und andererseits durch Prozessierung während dem Zellzyklus entstehen (Pfiz 1999, Sullivan et al. 2001).

In anderen Arbeiten konnte außerdem die Lokalisierung von Slk19 an den Spindelpolkkörpern und den Spindelfasern nachgewiesen werden. Weiterhin ist bekannt, dass die Deletion von *SLK19* synthetische Letalität in Nullmutanten des Kinesin-Motorproteins Kar3 erzeugt (Zeng et al. 1999).

Basierend auf der Kenntnis der Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 aus dem „Two-Hybrid“-Screen und den Affinitätschromatographieexperimenten von Zimmermann (Zimmermann

1998) wurde in dieser Arbeit versucht, die Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 durch biochemische und genetische Experimente zu untermauern und die Bedeutung dieser Wechselwirkung näher zu untersuchen.

In einem genetischen Ansatz wurde versucht, mutierte *pre4* Allele zu isolieren, bei denen die mögliche Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 blockiert ist. Dafür wurde der Effekt der synthetischen Letalität, der bei der Kombination von *SLK19* Deletion mit der *KAR3* Deletion auftritt, ausgenutzt. Wenn nämlich die Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 wichtig für die essentielle Funktion von Slk19 bei Abwesenheit von Kar3 war, sollte es möglich sein, *pre4* Allele zu erzeugen, die wie die *SLK19* Deletion einen synthetischen Effekt in *kar3* Nullmutanten hervorrufen.

Tatsächlich konnte in einem Klon durch ein *pre4* Mutantenallel (*pre4-72*), das durch mutagene PCR erzeugt worden war, Letalität hervorgerufen werden, die nur in Kombination mit der Deletion von *KAR3* auftrat. Dieses Verhalten konnte durch Plasmidaustausch (Umschalten von *PRE4* Wildtyp nach *pre4-72*) in *KAR3* Wildtyp Zellen und *kar3* Nullmutanten verifiziert werden. Dass sich *pre4-72* Mutanten bezüglich der genetischen Interaktion mit Kar3 ähnlich verhalten wie *slk19Δ* Mutanten ist ein zusätzliches, wichtiges Indiz für die Pre4-Slk19 Interaktion.

Die Analyse der *pre4-72* Sequenz ergab drei Punktmutationen im *PRE4* ORF. Davon liegt eine N20K (Position 20 der Pro-Sequenz von Pre4) in dem durch Prozessierung entfernten N-terminalen Bereich; zwei Mutationen M52L und M142K verbleiben in der prozessierten Form von Pre4.

Untersuchungen zur Lokalisierung der Punktmutationen von prozessiertem Pre4 im Proteasomenkomplex unter Verwendung von Röntgenstrukturdaten des 20S Proteasoms zeigten, dass sich die beiden Mutationen M52L und M142K in Furchen bzw. Taschen des Proteasomenkomplexes befinden und somit in Strukturen, die potentiell der Interaktion mit Slk19 zugänglich sind.

Messungen der proteolytischen Aktivität des Proteasoms in *pre4-72* Mutanten zeigten gegenüber *pre4-1* Mutanten keinen Defekt in der PGPH Aktivität. Einerseits zeigt dieses Ergebnis, dass *pre4-72* im Gegensatz zu *pre4-1* die PGPH Aktivität des Proteasoms nicht beeinflusst. Andererseits wird bestätigt, dass die Effekte bei Kombination von *pre4-72* und *kar3Δ* auf der Störung der Interaktion mit Slk19 beruhen und nicht in einer Inaktivierung des Proteasoms (durch Störung der aktiven Zentren) begründet sind.

Aus Experimenten in denen die einzelnen Punktmutationen von *pre4-72* getrennt kontrolliert wurden, ging hervor, dass der synthetisch letale Effekt erst durch Kombination beider

Punktmutationen M52L bzw. M142K hervorgerufen wurde; bei der Kombination der Einzelmutationen mit *kar3Δ* und als Kontrolle mit *KAR3* Wildtypzellen traten lediglich von Kar3 unabhängige Wachstumsdefekte auf.

Die Untersuchung der Einzelmutanten zeigte außerdem, dass das generelle Kar3 unabhängig auftretende Wachstumsdefizit von *pre4-72* Mutanten durch die Punktmutation M142K ausgelöst wird.

Bei „Two-Hybrid“-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass bei mutiertem *Pre4-72* Protein tatsächlich die Wechselwirkung zu Slk19 stark beeinträchtigt oder blockiert ist. Damit konnte ein weiterer Beweis für die direkte Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 erbracht werden.

In Zellen mit *pre4-72* Hintergrund wurden außerdem phänotypische Untersuchungen zu möglichen Störungen der Mitose und Meiose durchgeführt. Im Gegensatz zu *slk19* Nullmutanten konnte für *pre4-72* Zellen keine oder wenn überhaupt nur eine nicht signifikant erhöhte Rate der Bildung von Dyaden anstatt Tetraden in der Meiose nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen zur Stabilität von artifiziellen Chromosomen war im Gegensatz zu *slk19* Nullmutanten in *pre4-72* Mutanten nur ein schwach erhöhter aber dennoch signifikanter Verlust an artifiziellen Chromosomen im Verlauf der mitotischen Teilung festzustellen. Aber zumindest übt *pre4-72* einen negativen Einfluss auf das Wachstum von Hefezellen aus. Plasmidabhängige *pre4-72* Zellen wachsen deutlich langsamer als Wildtypzellen.

Beim Versuch der Integration des *pre4-72* Allels an den chromosomalen *PRE4*-Lokus konnten mit verschiedenen Strategien nur Zellen erhalten werden, bei denen die *PRE4* Wildtyp Sequenz wiederhergestellt war. Dieses Phänomen ist ein starkes Indiz dafür, dass chromosomal integriertes *pre4-72* offensichtlich drastische Nachteile für die Zelle hervorruft.

Immunopräzipitationsexperimente zur Klärung der Frage, ob Slk19 nur mit Pre4 oder dem gesamten Proteasomenkomplex interagiert, hatten in vorangegangenen Arbeiten keine eindeutigen Ergebnisse erbracht.

Zur Klärung dieses Problems sollten deshalb Co-Immunopräzipitationsversuche mit HA-markiertem Slk19 nun unter Verwendung von Protein-A-markiertem Pre6 durchgeführt werden, um einen biochemischen Nachweis für die direkte Wechselwirkung von Slk19 mit dem Proteasom zu erhalten. Im Immunopräzipitat von 20S Proteasomen aus nativen Extrakten synchronisierter Zellen unter Verwendung von Pre6-ProtA als antigene Determinante war es möglich, Slk19(HA)₃ Signale nachzuweisen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Slk19 mit dem Proteasom interagiert. Eine erste Analyse der gefundenen Slk19(HA)₃ Signale mit den im

Verlauf des Zellzyklus wechselnden Modifikationen von Slk19(HA)₃ in durch alkalische Lyse erhaltenen Extrakten lassen zumindest annehmen, dass die Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom zellzyklus-abhängig reguliert ist.

Diese Arbeit konnte einerseits das Modell, dass Slk19 mit dem Proteasomenkomplex interagiert bestätigen. Andererseits weisen die Ergebnisse auf eine Funktion der Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 hin, die unabhängig von bekannten Funktionen von Slk19 ist, aber trotzdem während der Mitose und Meiose eine Rolle spielt.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung

(m)A	(milli)Ampere
A ₆₀₀ -Einheit	Zellmenge, die in einer Schichtdicke von 1 cm, gemessen in einem Standardphotometer bei 600 nm die angegebene optische Dichte ergeben würde
ade / ADE	Adenin
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CM	Synthetisches Vollmedium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
(μ)F	(mikro-) Farad
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
5-FOA	5-Fluoroorotat
(m, μ , p)g	(milli, mikro, pico) Gramm
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
his / HIS	Histidin

KAN	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
(m)l	(milli) Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
leu / LEU	Leucin
lys / LYS	Lysin
(m)M	(milli) molar
min	Minuten
mind	mindestens
MG	Molekulargewicht
MV	Mineralmedium
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PEG	Polyethylenglykol
pers	persönlich
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (25°C)
s	Sekunden
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
trp /TRP	Tryptophan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureate
u.a.	unter anderem
ura / URA	Uracil
V	Volt
v/v, w/v	Volumen pro Volumen, Gewicht pro Volumen
verd.	Verdünnt
W	Watt
WT	Wildtyp

x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- -D-galaktopyranosid
YPD	Glucose-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ein Beispielorganismus für Eukaryontenzellen

Eine über siebentausend jährige Tradition verbindet uns mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch die Verwendung der sogenannten Bier- oder Bäckerhefe bei der Erzeugung von Nahrungs- und Genussmitteln (Michel et al. 1992). Als einfacher und leicht handhabbarer Vertreter einer Eukaryontenzelle fand sie in den letzten Jahren ideale Verwendung bei der Grundlagenforschung biologischer Mechanismen (Struhl 1983) und zählt zu den am besten untersuchten biologischen Systemen.

Mit einer Verdopplungsrate von weniger als 2 Stunden bietet die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exzellente Voraussetzungen zum Kultivieren auf Petrischalen.

Die zur Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) zählende, einzellige Sprosshefe, die einen rundlichen Ascus besitzt, der die meiotisch gebildeten Sporen umschließt (Rose and Harrison 1991), ist sowohl in ihrer diploiden als auch in ihrer haploiden Form in der Lage sich mitotisch zu teilen. Das ermöglicht heterothallischen Stämmen sich sowohl als diploide wie auch als haploide Zellen vegetativ zu vermehren. Diploide Zellen lassen sich unter bestimmten Bedingungen zur Sporulation anregen. Dabei entstehen durch meiotische Teilung vier haploide Sporen (Herskowitz 1988).

Die willkommene Eigenart von *Saccharomyces cerevisiae*, leicht in einen Zustand der Aufnehmbarkeit von DNA überführt zu werden und diese durch homologe Rekombination ins Genom zu integrieren, legte den Grundstein zur Entwicklung effektiver Techniken der Transformation und Genmanipulation, die bei keinem anderen Eukaryonten gleichermaßen anwendbar sind (Hinnen et al. 1978). Für genetische Manipulationen des inzwischen vollständig sequenzierten, relativ kleinen Genoms (ca. 6000 Gene auf 16 Chromosomen) mit 12068 kb (*E.coli* ca. 4000 kb, Mensch ca. $3 \cdot 10^6$ kb) (Goffeau et al. 1996) ; (Hieter et al. 1996) stehen somit zahlreiche Methoden sowie genetische Marker und stabile Plasmide zur Verfügung (Ausubel et al. 1989-1997); (Guthrie and Fink 1991); (Sambrook et al. 1989).

Trotz des relativ einfachen Aufbaus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lassen sich die intrazellulären Prozesse mit denen höherer, komplizierter Säugerzellen vergleichen. Denn wie die höheren Eukaryontenzellen besitzt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* alle wichtigen Organellen. Zusätzlich übernehmen Proteine mit ähnlicher Sequenz in Hefe- und höheren Eukaryontenzellen in vielen Fällen homologe Funktionen. Deshalb bietet sich die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* optimal als Modellorganismus (Guthrie and Fink 1991) an.

Funktionelle und strukturelle Erkenntnisse über Hefeproteine lassen sich oft direkt auf die entsprechenden Proteine höherer Eukaryontenzellen übertragen.

1.2 Proteolyse

Zur Ausführung lebenswichtiger, essentieller zellulärer Prozesse besitzt die Zelle hochkomplexe, hochregulierte Systeme. Dazu zählen in erster Linie die Aktivitätskontrolle und die Regulation funktioneller Proteine. Die Zelle verwendet dazu verschiedene Mechanismen: Schnelle, reversible Regulation von Enzymaktivitäten wird durch allosterische Wechselwirkungen sowie kovalente Modifikationen, meist Phosphorylierungen oder Acetylierungen von Proteinen erreicht. Ein anderer Weg zur Kontrolle von Proteinfunktionen läuft über die Steuerung der Enzym- bzw. Proteinkonzentration durch regulierte Proteinbiosynthese sowie gezielte Proteolyse.

Die prinzipiellen Mechanismen der Kontrolle der Biosynthese von Proteinen, die auf der Ebene der Transkription und der Translation reguliert werden kann, sind schon seit Mitte der sechziger Jahre bekannt (Brenner et al. 1961, Hoagland 1958, Nirenberg and Leder 1964).

Der Biosynthese gegenläufige Prozess, der regulativen Proteolyse, besitzt eine vergleichbare Bedeutung. Die Proteindegradation ermöglicht einerseits Rückgewinnung und Bereitstellung von Aminosäurebausteinen für die Neusynthese. Proteolyse, dient darüber hinaus der Zerstörung fehlgefalteter oder durch Umwelteinflüsse wie Strahlung oder Hitze geschädigter Proteine, die ihre biologische Funktion verloren haben und ungünstige Einflüsse auf die Zelle ausüben können. Andererseits wird durch Proteinabbau die irreversible Entfernung von Proteinen ermöglicht, die entweder innerhalb bestimmter Programme zeitlich limitierte Funktionen ausüben oder z.B. aufgrund bestimmter Anpassungsvorgänge von der Zelle nicht mehr benötigt werden. Somit besitzt die Proteindegradation eine wichtige Aufgabe bei der Kontrolle von Enzymaktivitäten.

Damit vermieden wird, dass Proteine, die ihre Funktion weiter ausüben sollen, degradiert werden, muss die intrazelluläre Proteolyse mit hoher Selektivität arbeiten. Dies wird über zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen erreicht: Einerseits die Proteindegradation innerhalb von Lysosomen (Hefe: Vakuole) und andererseits die gezielte Proteolyse am Wirkort von Proteinen z.B. im Zytoplasma oder im Zellkern.

Der hochreaktive aber unspezifische Abbau von Proteinen erfolgt in der Vakuole, einem speziell darauf eingerichteten Kompartiment der Hefezelle. Die darin eingeschlossenen Proteasen müssen räumlich von den übrigen Zellbestandteilen getrennt bleiben, um den unkontrollierten Abbau von solchen Proteinen zu verhindern, die gerade wichtige Aufgaben

innerhalb der Zelle erfüllen. Proteine, die über das vakuoläre System degradiert werden sollen, werden in Vesikeln eingeschlossen zur Vakuole transportiert, wo durch Fusion mit der Vakuolenmembran der Vesikelinhalt in die Vakuole gelangt. Dort erfolgt der vollständige Proteinabbau, der durch verschiedene hochaktive Endopeptidasen (z.B. yscA, yscB), Carboxypeptidasen (z.B. yscY) sowie Aminopeptidasen (z.B. yscI) vermittelt wird (Knop et al. 1993);(Rendueles and Wolf 1988).

Neben dem vakuolären System findet man hochentwickelte Proteasekomplexe, die ihre Zielproteine spezifisch erkennen. Die wichtigsten Vertreter solcher komplexer Proteasen sind die Proteasomen (Übersichtsartikel: (Coux et al. 1996);(Hilt and Wolf 1996, Hilt and Wolf 1999)). Die Proteolyse über dieses System wird durch die Markierung der Substrate mittels Ubiquitin reguliert (Hilt and Wolf 1992).

1.2.1 Proteasomen

Proteasomen sind hochentwickelte, hochspezifische Proteasen der Eukaryontenzelle. Sie erfüllen zentrale Zellfunktionen.

Die Entdeckungsgeschichte der Proteasomen reicht bis in die sechziger Jahre zurück. Basierend auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Harris 1971) wurde ein später als „Prosom“ benannter zylindrischer Ribonukleoproteinkomplex beschrieben (Schmid et al. 1984); (Schmid et al. 1995).

1980 entdeckten Wilk und Orłowski in Rinderhypophysengewebe eine mit 700 kDa hochmolekulare Protease, die multiple Aktivitäten besaß, und bezeichneten diese als multikatalytischen Protease-Komplex (Wilk and Orłowski 1980). Aufklärung darüber, dass beide Komplexe, Prosom und multikatalytische Protease, identisch sind, konnte erst 1988 erlangt werden (Arrigo et al. 1988); (Falkenburg et al. 1988).

In der Folge konnten bei Untersuchungen in unterschiedlichsten Eukaryontenzellen Proteasomen gefunden werden, die ihrer Sedimentationskonstanten entsprechend als 20S- (neuere Untersuchungen: 30,3S- (Yoshimura et al. 1993)) und 26S-Proteasomen bezeichnet wurden (Übersichten in (Rivett 1993); (Rechsteiner et al. 1993); (Goldberg and Rock 1992)).

Das 20S-Proteasom

Aufbau und Lage der katalytisch aktiven Zentren des 20S-Proteasoms konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, Röntgenstrukturdaten sowie dreidimensionale Elektronenmikroskopie am „Ur-Proteasom“ des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* (Löwe et al. 1995) sowie am 20S-Proteasom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Groll et al. 1997, Groll et al. 1999b) aufgeklärt werden.

Das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* besteht aus einem zylindrischen Komplex, der aus vier heptameren Ringen mit einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ Konfiguration gebildet wird (Baumeister et al. 1988, Djaballah et al. 1993, Löwe et al. 1995). Je sieben gleiche α -Untereinheiten bilden die beiden äußeren Ringe des Hohlzylinders, der eine Länge von ca. 15 nm und einen Durchmesser von 10 nm besitzt. Die insgesamt 14 identischen β -Untereinheiten der beiden heptameren inneren Ringe des Zylinders bilden die aktiven Zentren aus, welche bevorzugt die Spaltung von Proteinen am Carboxy-Ende von hydrophoben Aminosäuren katalysieren (chymotrypsinähnliche Aktivität). Diese proteolytisch aktiven Zentren sind an der Innenseite des hohlzylindrischen Komplexes lokalisiert (Löwe et al. 1995, Seemuller et al. 1995b).

Mutationsanalysen und Strukturdaten zeigten außerdem, dass das N-terminale Threonin der β -Untereinheiten des 20S *Thermoplasma* Proteasoms bei der Hydrolyse der Peptidbindungen als Nukleophil agiert (Seemuller et al. 1995a).

Das 20S-Proteasom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt einen komplexeren Aufbau:

Es wird aus Sätzen von sieben verschiedenen α - und sieben unterschiedlichen β -Untereinheiten aufgebaut, die jedoch untereinander Bereiche identischer oder ähnlicher Aminosäuresequenzen besitzen. Die Grundstruktur entspricht dem des *Thermoplasma* Proteasoms. Die beiden äußeren Ringe werden durch je sieben verschiedene α -Untereinheiten, die beiden inneren Ringe durch je sieben unterschiedliche β -Untereinheiten gebildet.

Die katalytisch aktiven Zentren des *Thermoplasma* Proteasoms sind im Inneren des aus den β -Untereinheiten gebildeten zentralen Kanals lokalisiert. Im Gegensatz dazu besitzt das 20S-Proteasom in *Saccharomyces cerevisiae* nur drei Spezies katalytisch aktiver β -Untereinheiten, die im Komplex jeweils zweimal vorkommen und unterschiedliche Substratspezifität aufweisen (Heinemeyer et al. 1991): Pre2/Doa3 trägt die chymotrypsinähnliche Aktivität (Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren), Pup1 die trypsinähnliche Aktivität (Spaltung nach basischen Aminosäuren) und Pre3 die Peptidyl-Glutamyl-Peptid-spaltende (PGPH) Aktivität (Spaltung nach sauren Aminosäuren) (Arendt and Hochstrasser 1997, Groll et al.

1999a, Heinemeyer et al. 1997, Heinemeyer et al. 1993). Mutationen in benachbarten β -Untereinheiten können die aktiven Zentren beeinflussen. Die *pre1-1* Mutation (Austausch von Serin gegen Phenylalanin an Position 142 der Pre1 Proteinsequenz in 5'-3'-Richtung) bewirkt eine nahezu vollständige Beeinträchtigung der durch Pre2 vermittelten chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms (Heinemeyer et al. 1991). Die Deletion von 15 Aminosäuren am C-Terminus der Pre4 Untereinheit (*pre4-1*) führt zur Aufhebung der PGPH Aktivität, die durch die benachbarte Pre3 Untereinheit vermittelt wird. Zellen mit beiden Mutationen, *pre1-1* und *pre4-1*, weisen einen besonders starken Defekt in der proteasomalen Proteolyse auf (Hilt et al. 1993b).

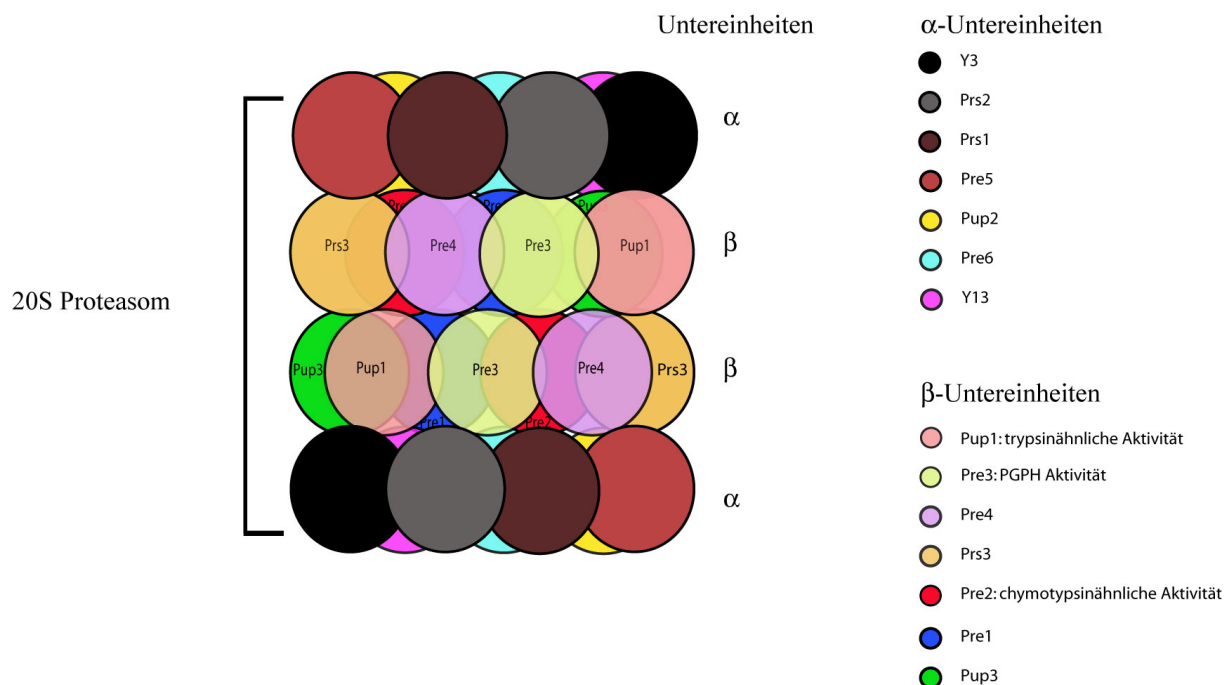


Abbildung 1: Schematische Darstellung des 20S Proteasoms. Angezeigt sind farblich abgestimmt die Anordnung der proteasomalen Untereinheiten sowohl in den α - und β -Ringen als auch zwischen den α -, β - und den beiden β -Siebenringen im Proteasomenkomplex (links). Außerdem sind die Abfolge der proteasomalen Untereinheiten einzeln und die enzymatische Aktivität der drei proteaseaktiven Beta-Untereinheiten (rechts) angegeben.

Das 26S-Proteasom

1986 konnte in Kaninchenretikulozyten eine 26S Protease charakterisiert werden, die das 20S-Proteasom beinhaltet. Dieses 26S-Proteasom besaß die Fähigkeit Ubiquitin markierte Proteine ATP-abhängig abzubauen (Hough and Rechsteiner 1986).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an 26S-Proteasomen von multizellulären Organismen (Peters et al. 1993) und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Glickman et al. 1998a, Glickman et al. 1999) sowie dreidimensionale Elektronenmikroskopie-Studien über das 26S-Proteasome embryonaler Zellen von *Drosophila melanogaster* und in Oocyten von *Xenopus laevis* (Walz et al. 1998) erbrachten folgende Ergebnisse:

Das 26S-Proteasom enthält als zentrales Proteasemodul das 20S-Proteasom. An dessen Ober- und Unterseite des 20S Zylinders ist je ein zusätzlicher, regulatorischer 19S Subkomplex assoziiert. Diese regulatorischen Komplexe (RP) bestehen aus einer Deckelstruktur (Lid) mit acht Untereinheiten und einer aus neun Untereinheiten gebildeten Basis (Base). Der Basis-Komplex enthält sechs der AAA-Familie angehörenden ATPase Untereinheiten, Rpt1-6 (Glickman et al. 1998a).

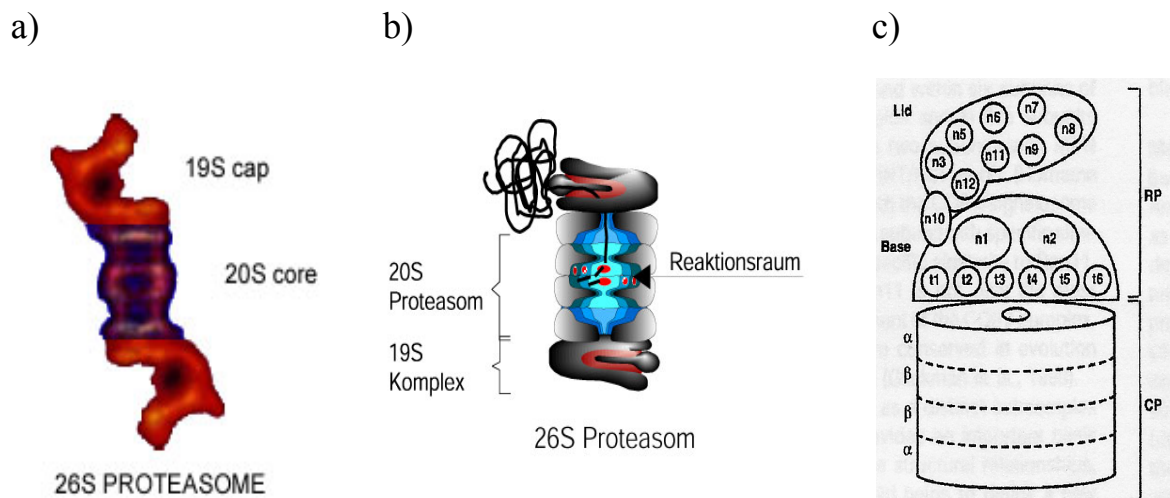


Abbildung 2: Aufbau des 26S-Proteasoms (a) Elektronendichte Aufnahme, (b) schematische Darstellung des Reaktionsraums im aufgeschnittenen Zylinder des 26S Proteasoms (CP) und des regulatorischen Komplex (RP), (c) Skizze zur Anordnung der regulatorischen Untereinheiten in der regulatorischen Einheit 19S cap; es stehen n1, n2, -n12 für Rpn1, Rpn2, -Rpn12 und t1, t2, -t6 für Rpt1, Rpt2, -Rpt6.

Im Gegensatz zu 20S-Proteasomen zeigen 26S-Proteasomen die Fähigkeit Ubiquitin-markierte Proteine unter ATP-Verbrauch zu degradieren (Hough et al. 1986). Das führt zur Annahme, dass die 19S Subkomplexe für die Erkennung und Entfaltung von Ubiquitin-

markierten Proteinen benötigt werden (Glickman et al. 1998a, Glickman et al. 1998b, Glickman et al. 2000, Gordon et al. 1993), und darüber hinaus die Zuführung der entfalteten Proteine zu den katalytischen Zentren des 20S Kernkomplexes bewirken (Rubin et al. 1998). Die Lokalisierung des Proteasoms *in vivo* durch funktionelle Fusionen des Komplexes mit fluoreszierenden Proteinen (GFP) ergaben folgendes Bild: In humanen Zellen befinden sich Proteasomen in einem stetigen, langsamen Transportprozess zwischen Zytoplasma und Zellkern (Reits et al. 1997). In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ließen sich Proteasomen an der nukleären Peripherie nachweisen (Wilkinson et al. 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden GFP-markierte Proteasomen (GFP fusioniert an 20S- oder 19S-Untereinheiten) in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums sowie an der Kernmembran gefunden (Enekel et al. 1998, Enekel et al. 1999).

1.2.2 Das Ubiquitin-System

Das Ubiquitinsystem, das den zytosolischen und nukleären Proteinabbau regelt, spielt eine zentrale Rolle in der Eukaryontenzelle. Dies wird dadurch untermauert, dass sich hefeeigenes Ubiquitin in nur drei Aminosäuren von Ubiquitin menschlicher Zellen unterscheidet. Ubiquitin ist ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, das in allen Eukaryontenzellen in einem außerordentlich hohen Konservierungsgrad gefunden wird (Bachmair et al. 1986, Jentsch et al. 1991). Das Ubiquitin-System sorgt für die Markierung von fehlgefalteten, falschen, abnormalen sowie kurzlebigen Proteinen, die für die proteasomale Degradation determiniert werden sollen. Die selektive Markierung zur proteasomalen Proteindegradation erfolgt über eine kovalente, isopeptidische Bindung von Ubiquitin an ϵ -Aminogruppen bestimmter Lysinreste der Substratproteine.

Die Verknüpfung mit Ubiquitin erfolgt dabei in drei Stufen: Zunächst wird Ubiquitin durch ein E1-Enzym (Ubiquitin-aktivierendes Enzym, Uba) über die ATP-abhängige Bildung einer energiereichen Thioesterbindung aktiviert. Dies erfolgt durch Bindung zwischen einer SH-Gruppe des E1-Enzyms und dem Carboxyterminus eines Glycinrests des Ubiquitinmoleküls. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin unter Ausbildung einer neuen Thioesterbindung auf ein weiteres Enzym (E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzym, Ubc) transferiert, um dann im dritten Schritt auf das Zielprotein übertragen werden zu können (Ciechanover 1994, Hershko and Ciechanover 1992, Jentsch 1992).

Je nach Substrat erfolgt der letzte Schritt mit oder ohne Beteiligung eines weiteren Enzyms den Ubiquitin-Protein Ligasen (E3, „auxiliary factor“).

Die Art der Ubiquitinierung kann über mehrere Wege erfolgen. Obwohl in den meisten Fällen eine Polyubiquitinierung notwendig ist, um ein Protein für die Proteolyse zu determinieren (Chau et al. 1989, Finley and Chau 1991), kann auch eine Monoubiquitinierung als Abbausignal genügen (Haas et al. 1990). Zur Polyubiquitinierung werden Ubiquitinreste mit einer bereits am Protein befindlichen Ubiquitinkette verknüpft, so dass sowohl lineare als auch verzweigte Polyubiquitinketten entstehen können. Neuere Untersuchungen über die Ausbildung der Polyubiquitinkette diskutieren, dass in bestimmten Fällen ein weiterer Faktor (E4, in *Saccharomyces cerevisiae* Ufd2) hervorgerufen durch Zellstress unter schlechten Wachstumsbedingungen an der Beeinflussung der Ubiquitinkettenlänge beteiligt ist (Koepl et al. 1999).

Neben den Enzymen zur Ubiquitinierung existieren auch katalysierende Hydrolasen (UCH, Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen) zur Deubiquitinierung, die freies Ubiquitin wieder zur Verfügung stellen und somit für die Reversibilität der Ubiquitinierung sorgen. Zusätzlich zu den beschriebenen Komponenten des Ubiquitin Proteasom-Systems existieren jedoch noch weitere Merkmale, die Proteinsequenzen, zur Degradation kennzeichnen. Diese werden Proteolyse oder Degradationssignale genannt.

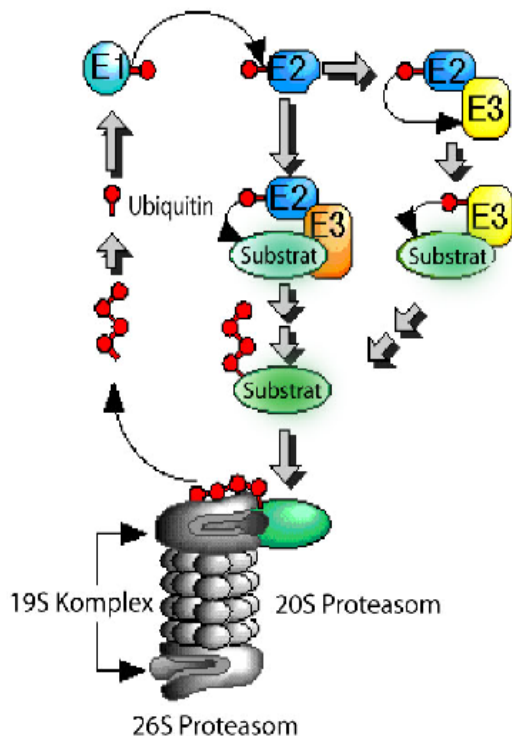


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom - System

1.2.3 Proteolyse-Signale

Um gezielt über das Ubiquitinsystem degradiert werden zu können, müssen Substratproteine bestimmte Informationen tragen, die als Abbausignale erkannt werden und die Degradation in Gang setzen. Für unterschiedliche Proteine sind verschiedene Erkennungsmerkmale bekannt: Einige kurzlebige Proteine mit einer Halbwertszeit unter zwei Stunden, wie z.B. die B-Typ-Zykline (Richter-Ruoff and Wolf 1993), tragen als notwendige Abbausignale für die Proteolyse über das Ubiquitinsystem charakteristische Sequenzabschnitte mit einer Länge von neun Aminosäuren, die als „destruction boxes“ bezeichnet werden (Glotzer et al. 1991); (Jentsch 1992); Übersichtsartikel: (Peters et al. 1998). Durch Deletion dieser Sequenzabschnitte, die meist ca. 40–50 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt lokalisiert sind, lässt sich eine deutlichen Stabilisierung der entsprechenden Proteine erzielen (Glotzer et al. 1991).

Andere, ebenfalls kurzlebige Proteine, enthalten sogenannte PEST-Sequenzen, die reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) sind (Hilt and Wolf 1996, Rechsteiner and Rogers 1996). Bei der Maus beispielsweise führt die Deletion der Ornithin-Decarboxylase, einem Enzym der Polyaminsynthese, das zwei solcher PEST-Sequenzen trägt, zur Stabilisierung des verkürzten Proteins im Vergleich zum nicht deletierten, natürlichen Protein (Ghoda et al. 1989). Durch Fusion der Ornithin-Decarboxylase mit der eigentlich stabilen Dihydrofolat-Reduktase konnte *in vitro* eine Destabilisierung des entstandenen Fusionsproteins nachgewiesen werden (Loetscher et al. 1991). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Ornithin-Decarboxylase in einem Ubiquitin-unabhängigen Schritt vom 26S-Proteasom (Murakami et al. 1992), andere PEST-Sequenzen tragende Proteine dagegen Ubiquitin-abhängig über das 26S-Proteasome (Hershko and Ciechanover 1992, Yaglom et al. 1995) abgebaut werden.

Gemäß der „N-end-rule“ kann die proteolytische Stabilität bestimmter Proteine durch die Art der N-terminalen Aminosäure determiniert sein (Übersichtsartikel:(Varshavsky 1996)). Untersuchungen an heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten *E. coli* β -Galaktosidase Proteinen ergaben, dass deren Halbwertszeit von der Art der aminoterminalen Aminosäure abhing (Bachmair et al. 1986). Da für diesen Abbauweg lange keine natürlichen Substrate bekannt waren (Varshavsky 1992, Varshavsky 1996), sprach einiges dafür, dass die Lebensdauer vieler Proteine durch posttranslationale, N-terminale Modifikation (z.B. durch Acetylierung) und damit Änderung der Struktur des Aminoterminus eines Proteins reguliert werden kann. Inzwischen konnte das carboxy-terminale Fragment von Scc1 als erstes physiologisches Substrat, das der N-end-rule folgend abgebaut wird, identifiziert werden. Die

beim Metaphase-Anaphase Übergang aktivierte Protease Esp1 (auch Separase genannt) schneidet die zum Cohesin Komplex zugehörige Untereinheit Scc1, die beide Schwesterchromatiden miteinander verbindet. Dabei entsteht ein carboxy-terminales Scc1 Fragment mit einem destabilisierenden aminoterminalen Arginin, das der N-end-rule folgend über das Ubiquitin Proteasom System in kurzer Zeit (Halbwertszeit ca. 2 min) abgebaut wird. Zu entsprechenden N-end-rule Substraten können demnach auch die wenigen bisher bekannten Proteine oder Fragmente gehören, die durch Esp1 Zellzyklus-abhängig prozessiert werden, wie z.B. Rec8 oder Slk19 (Rao et al. 2001); (Sullivan et al. 2004).

1.2.4 Funktionen der Proteasomen

Proteasomen erfüllen innerhalb einer Eukaryontenzelle essenzielle Funktionen. Dies belegen Untersuchungen, welche ergaben, dass die Deletionen von 13 der insgesamt 14 Gene, die für die α - und β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodieren, Letalität erzeugen. Außerdem wurde gezeigt, dass auch Gene, die für Untereinheiten des 19S Subkomplexes kodieren z.B. CIM5 (Ghislain et al. 1993), YTA1 (Schnall et al. 1994) für das Überleben der Zelle essenziell sind.

Proteasomen werden außerdem für die Stressantwort benötigt. Sie sorgen dabei für den ATP-unabhängigen (20S-Proteasom) (Pacifici et al. 1989, Rivett 1985, Sacchetta et al. 1990) oder den ATP-abhängigen Abbau (26S- Proteasom) (Hough et al. 1986) von abnormalen (ubiquitinierten) oder falschgefalteten Proteinen.

Einen Beweis liefern z.B. Hitzestress- und Canavaninstress-sensitive Proteasomenmutanten, die unter solchen Bedingungen abnormale (ubiquitinierte) Proteine anhäufen (Gerlinger et al. 1997b, Heinemeyer et al. 1991, Hilt et al. 1993b).

Zur Aufgabe des Proteasoms gehört auch der Abbau abnormaler Proteine des endoplasmatischen Retikulums (Hiller et al. 1996). Hierbei werden solch Proteine über einen retrograden Transportprozess, der durch den Sec61-Kanal-Komplex erfolgt, ins Zytosol transportiert und über das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut. Bei fehlgefalteten Proteinen, die aus der Membran des endoplasmatischen Retikulums herausgelöst werden (z.B. Pdr5*), findet der Transport ins Zytosol nach einem davon unabhängigen Mechanismus statt (Plemper et al. 1998). Im Zytosol werden die Proteine unter Beteiligung von Ubc6,7 ubiquitiniert (Hiller et al. 1996) und vom Proteasom abgebaut (Übersichtsartikel: (Plemper and Wolf 1999). Zu einer weiteren Funktion der Proteasomen zählt der Abbau regulatorischer Proteine. Proteasomen greifen dadurch in unterschiedliche zelluläre Prozesse ein (Hilt and Wolf 1996, Hilt and Wolf 1999). Dazu zählt erstens die Kontrolle der metabolischen

Anpassung durch Abbau von Enzymen wie z.B. Fructose-1,6-Bisphosphatase (Chiang and Schekman 1991, Schork et al. 1995) und Transkriptionsregulatoren wie z.B. Gcn4 (Kornitzer and Ciechanover 2000). Als zweites fällt in diesen Aufgabenbereich der Proteasomen der Abbau von regulatorischen Proteinen bei der Zelldifferenzierung, wie z.B. die Degradation des MAT α 2 Repressor (Chen et al. 1993, Richter-Ruoff et al. 1994).

Ein weiterer zellulärer Prozess, in dem Proteasomen auf unterschiedlichen Ebenen Funktionen erfüllen, ist der Zellteilungszyklus (Seufert et al. 1995, Willems et al. 1999): Durch Abbau von Zyklinen wie z.B. Cln1-3 oder Clb1-6 wird die Inaktivierung von zyklinabhängigen Kinasen (CDKs) bewirkt (Dahmann et al. 1995).

Der entgegengesetzte Fall der Aktivierung von CDKs durch den Abbau von CDK-Inhibitoren wie z.B. des Sic1 Proteins (Deshaies 1997, Feldman et al. 1997) erfolgt ebenfalls über das Ubiquitin-Proteasomsystem.

Zu einer weiteren proteasomalen Funktion im Zellteilungszyklus zählt sowohl die Degradation von CDK-unabhängigen Regulatoren wie z.B. des Anaphaseninhibitors Pds1 (Alexandru et al. 1999, Cohen-Fix et al. 1996) als auch die Proteolyse von Strukturkomponenten der Zellzyklusmaschinerie, wie z.B. der Spindelkomponente Ase1 (Juang et al. 1997).

1.3 Der Zellzyklus in *Saccharomyces cerevisiae*

Hefe und alle Eukaryontenzellen folgen einem streng kontrollierten und koordinierten Ablauf bei der Zellteilung. Der Zellzyklus wird in insgesamt vier Teilschritten untergliedert: Die erste Wachstumsphase G1 (Gap1-Phase), in der das Zellwachstum mit der Replikation und der Mitose koordiniert wird. Erst bei Erreichen der notwendigen Zellgröße wird den Zellen der Eintritt in die nächste Synthesephase erlaubt (G1-S-Übergang).

In der anschließenden S-Phase (Start-Phase) erfolgt die Replikation des Genoms. Daran schließt sich eine weitere Wachstumsphase G2 (Gap2-Phase) an, bevor die Zelle in der M-Phase (Mitose-Phase und nachfolgende Zytokinese: Trennung von Mutter- und Tochterzelle) die gleichmäßige Aufteilung des duplizierten Chromosomensatzes sowie die Abtrennung der genetisch identischen Mutter und Tochterzelle voneinander organisiert (Gordon et al. 1993).

Die Mitose selbst unterteilt sich nochmals in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, und Telophase. Während der Prophase kondensiert die ansonsten in Form von Chromatin vorliegende DNA, zu den streng strukturierten deutlich unterscheidbaren Chromosomen.

Während der Metaphase erfolgt die Kopplung der Mikrotubuli an den Kinetochoren und deren Ausrichtung (bei höheren Eukaryonten im Zentrum der Zelle, bei Hefen gerichtet nach der Spitze der entwickelten Knospe). Die erfolgreiche Trennung der Chromatiden startet dabei erst dann, wenn alle Kinetochoren mit Mikrotubuli (bei Hefe mit genau einem Mikrotubuli) verbunden sind und sich die Chromosomen entlang der zentralen Ebene der Spindel eingefunden haben.

Sobald dies erfolgt ist, tritt die Zelle in die Anaphase ein, die sich nochmals in die frühe und späte Anaphase unterteilt. Zunächst werden die Proteinkomplexe zwischen den Schwesterchromatiden enzymatisch geschnitten, sodass die Mikrotubuli anschließend in der Lage sind, durch Verkürzen die Chromatiden in Richtung der Spindelpolkörper auseinander zu ziehen. Als zweiter Schritt in der Anaphase verlängert sich die Spindel zwischen den Spindelpolen entlang ihrer Achse und schiebt dabei die Pole mit den beiden daran fixierten Chromosomensätzen auf ihre entgegengesetzte Endpositionen in der Zelle.

Nachdem in der Telophase das Zytoplasma und der Zellkern aufgeteilt worden sind, kommt es abschließend zum Dekondensieren der getrennten Chromosomen und zum Abtrennen von Mutter und Tochterzelle.

1.3.1 Zellzykluskontrolle

Die korrekte Replikation der DNA im Zellzyklus ist zum Weiterbestehen der Zelle lebensnotwendig. In gleichem Maß gilt dies für die korrekte Verteilung des Genoms während der Trennung zwischen Mutter und Tochterzelle. Deshalb besitzen die Zellen spezielle Kontrollpunkte sogenannte „checkpoints“, welche die Zellen vor folgenschweren, unwiderruflichen Schäden schützen, indem sie in Antwort auf bestimmte Fehler den Fortlauf des Zellzyklus stoppen, um die Reparatur der Fehler zu ermöglichen (Elledge 1996).

Der G1-Pasen/S-Phasen Übergang wird lediglich dann gestartet, wenn ausreichend Nährstoffe verfügbar sind, die Zelle eine geeignete Größe erreicht hat und zugleich keine Pheromone (α - oder α -Faktor) den Übergang in die START-Phase verhindern.

Während der S-Phase liegt das Hauptaugenmerk auf der Überwachung der korrekten Replikation und dem einwandfreien Zustand der DNA durch den „DNA damage checkpoint“ und den „DNA replication checkpoint“. Im Falle der Aktivierung dieser Kontrollpunkte wird der Zellzyklus vor dem Binden der Spindelfasern und der Auftrennung der Chromosomen also vor dem Start der Anaphase gestoppt (Alexandru et al. 1999).

Während der Mitose steht dann die korrekte Anknüpfung der Chromosomen an die Spindelfasern unter der Kontrolle des „Spindelverbindungskontrollpunkts“- bzw. des

Spindelschaden Kontrollpunkt“ (Fang et al. 1998). Die korrekte Orientierung der Spindel in Richtung der gebildeten Knospe der Mutterzelle wird durch den sogenannten „Spindel Positionierungs Kontrollpunkt“ kontrolliert (Adames et al. 2001).

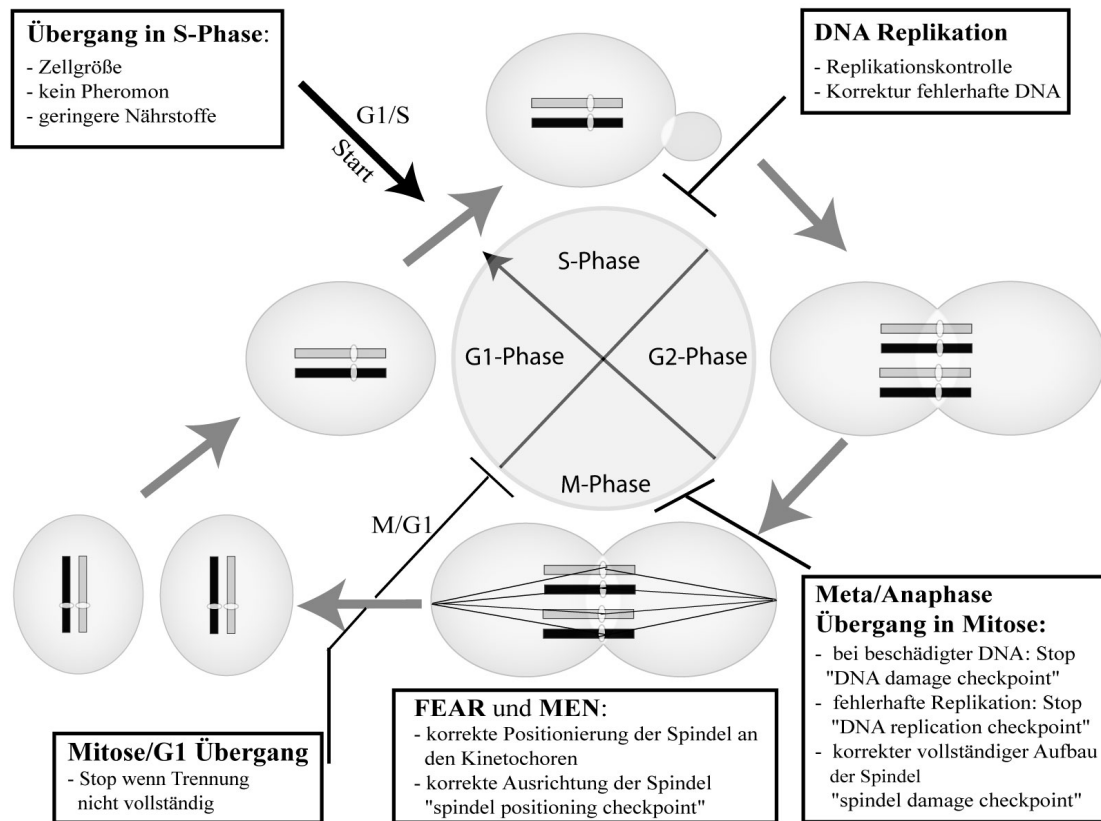


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus von *S. cerevisiae* und seine Kontrollpunkte („checkpoints“). G1: Erste Wachstumsphase (Gap1-Phase); S: Synthesephase, in der die Verdopplung der Chromosomen stattfindet; G2: Zweite Wachstumsphase (Gap2-Phase); M: Mitose, verdoppelter Chromosomensatz wird gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen aufgeteilt. Die Kontrollpunkte („checkpoints“) überwachen die Schlüsselfunktionen während des Zellzyklus und stoppen ihn, wenn es durch äußere Einflüsse zu Fehlern kommt. Der G1/S Übergang erfolgt lediglich wenn die Zelle groß genug gewachsen ist, genügend Nährstoffe vorhanden sind und keine Matingpheromone erkannt werden. In der S-Phase wird der Zustand der gerade replizierten DNA durch den „DNA Schaden“ Kontrollpunkt und den „DNA Verdopplungs“ Kontrollpunkt kontrolliert, der bei seiner Aktivierung einen Halt im Zellzyklus vor dem Start der Anaphase erzeugt. Für die Kontrolle der korrekten Bindung der Spindelfasern an die Chromosomen und ihre ordentliche Orientierung sorgen die zwei gekoppelten Netzwerke FEAR und MEN in der Mitose.

Bedeutende Vertreter Zellzyklus regulierender Komplexe sind die beiden E3 Enzyme SCF (Skip1-Cdc53-F-box Protein) und der Anaphase Promoting Complex (APC). Der SCF Komplex vermittelt hauptsächlich regulierende Schritte während der G1 und S/G2 Phase

(Hoyt 1997, Peters et al. 1998, Tyers and Willems 1999), während der APC Komplex hauptsächlich die Kontrolle von Prozessen in der Mitose übernimmt.

Eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation spielen die Zyklin-abhängige Kinasekomplexe (CdK). An erster Stelle steht dabei Cdc28. Seine Kinase Aktivität wird in der S-Phase von den regulatorischen Proteinen, den Zyklinen (G1-Zykline), initiiert. Seine hohe Kinaseaktivität ermöglicht das Binden von Cdc20 an APC, was zum Abbau von S-Phasen Zyklinen (Clb5), dem Anaphase Inhibitor Pds1, einem Teil des M-Phase Zyklins (Clb2) führt und die Cdc28 Aktivität wiederum reduziert. Verringerte Cdc28 Aktivität und Zyklinkonzentration führt dann in Verbindung mit steigender Cdc14 Phosphatase Aktivität zur Dephosphorylierung von Cdh1. Das führt zum Austausch des am APC gebundenen Cdc20 durch Cdh1, was den Abbau der restlichen APC abhängigen Substrate, z.B. restliches Clb2 einleitet (Harper 2002). Zellzyklus abhängige Transkription bzw. Degradation und posttranslationales Assoziieren der verschiedenen Zyklone mit Cdc28 regeln also die substratspezifische Cdc28 Aktivität passend zur Phase im Zellzyklus (Betting and Seufert 1996, Dirick et al. 1995, Goodger et al. 1997, Lew and Reed 1993, Mendenhall and Hodge 1998, Morgan 1997). Daher werden die Zyklone auch nach ihrem Auftreten in den Phasen des Zellzyklus unterscheiden.

Cln1, Cln2 und Cln3 gehören zu den G1 Zyklinen, Clb5, Clb6 zu den S-Phase Zyklinen und Clb1, Clb2, Clb3 und Clb4 sind Zyklone die in der Mitosephase wirken. Das wichtigste der B-Typ Zyklone ist Clb2 (Epstein and Cross 1992). Der Clb2-Cdc28 Komplex wirkt sich auf die Spindelverlängerung aus, verhindert aber gleichzeitig die Knospenbildung und die Transkription von G1 Zyklinen (Amon et al. 1993). Die komplette Deaktivierung von Clb2 über APC vermittelte Proteolyse stellt außerdem einen essentiellen Schritt, für den Austritt aus der Mitose dar (Baumer et al. 2000, Yeong et al. 2000). Dieser Schritt wird durch das MEN-Netzwerk vermittelt.

1.3.2 Das MEN-Netzwerk

Das MEN-Netzwerk steuert den Austritt aus der Mitose. Dazu triggert es den Abbau von Zyklinen und induziert damit die Inaktivierung mitotischer CDKs (z.B. Clb2-Cdc28). In der frühen Mitose wird das G-Protein Tem1, das an den Spindelpolkörpern lokalisiert, durch einen GTPase aktivierenden Komplex (GAP) aus Bub2 und Bfa1 inaktiv gehalten. Bei Eintritt des Spindelpolkörpers in die Tochterzelle erfolgt die Aktivierung von Tem1 durch den GTP Austausch Faktor (GEF) Lte1, welches nur in der Tochterzelle vorkommt (Bardin et al. 2000, Pereira et al. 2000). Dieses Signal steht am Anfang einer Signalkaskade, die über Cdc15

(Molk et al. 2004, Sohrmann et al. 1998) die Protein-Kinase Dbf2 im Mob1-Komplex aktiviert und so das MEN startet (Mah et al. 2001). Infolge dieser Aktivierung von MEN kommt es zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nucleolus und damit dessen Aktivierung. Aktive Cdc14-Phosphatase initiiert die Inaktivierung von Clb2-CDK indem es sowohl den Abbau von Clb2 stimuliert und gleichzeitig die Anhebung der Konzentration des Clb-CDKk spezifischen Inhibitors Sic1 induziert (Visintin et al. 1998). Interessanterweise konnte zusätzlich eine transiente MEN-unabhängige Freisetzung von Cdc14 in der frühen Mitose festgestellt werden. Dies wird durch das FEAR-Netzwerk reguliert.

1.3.3 Das FEAR Netzwerk

FEAR steht für den Ausdruck **F**ourteen (Cdc14) **E**arly **A**naphase **R**elease und vereint alle Faktoren, die vorübergehend zum Freisetzen von Cdc14 aus dem Nucleolus und dem Auftreten nur im Nucleus führen. Diese Erscheinung führt aber nicht zur Deaktivierung von Clb-CDK (B-Typ Zyklin aktivierte Zyklinabhängige Kinasen) und tritt in der frühen Anaphase auf, während sich die mitotische Spindel in einem Zeitraum von 5 bis 10 Minuten von 4 auf 7 μm verlängert (Pereira et al. 2002, Stegmeier et al. 2002, Sullivan and Uhlmann 2003, Yoshida et al. 2002).

Zu den beiden Proteinen, die das Auftreten FEAR negativ beeinflussen gehören in Hefe neben Fob1, das im Nucleolus lokalisiert, das Securin Pds1, der Inhibitor der Separase Esp1.

Die Faktoren, die für FEAR notwendig sind, beinhalten die Separase Esp1, die Polo Kinase Cdc5 sowie die Spindel- bzw. Kinetochorproteine Spo12, Slk19 und das nahe Homologe Bns1 (Stegmeier et al. 2002, Visintin et al. 2003).

Aufgrund jüngster Studien, in denen der Zusammenhang von FEAR und MEN untersucht wurde, ist noch unklar, ob *in vivo* die POLO-Kinase Cdc5 als definitive FEAR Komponente oder Clb-CDKs die MEN unabhängige Freisetzung von Cdc14 von seinem Inhibitorcomplex Cfi/Net1 einleiten. Aber sicher ist, dass Cdc5 auch als MEN Regulator wirkt, indem die Inaktivierung von Tem1 durch Phosphorylierung des Inhibitors Bub2-Bfa1 aufgehoben wird. Als zweite verbindende Komponente von FEAR und MEN wirkt Cdc14 selbst, da Cdc14 durch Dephosphorylierung die MEN initiiierende Kinase Cdc15 aktivieren und wohl auch andere MEN Komponenten regulieren kann. Allgemein wird momentan von dem Modell ausgegangen, dass Cdc14 durch das FEAR Netzwerk seine Freisetzung im MEN in einer Art positiver Rückkopplung initiiert und das FEAR Netzwerk als zeitlicher Puffer zwischen der Chromosomensegregation und dem Separieren der Mutter und Tochterzelle durch das MEN wirkt.

Das FEAR Netzwerk ist ebenfalls an der Kontrolle beider Meiose Schritte (Meiose I und Meiose II) beteiligt, was durch Auftreten meiose-typischer Phänotypen in Mutanten von FEAR Komponenten wie z.B. der *SLK19* Deletionen bestätigt wird (D'Amours and Amon 2004).

Jedoch bleiben noch viele Fragen offen, so z.B. durch welchen Mechanismus Cdc14 die MEN Aktivität stimuliert, was die Protease unabhängige Funktion der Separase Esp1 beim Austritt aus der Mitose oder die Rolle des Proteins Slk19 im FEAR Netzwerk sind. Weitere Einzelheiten über die beschriebenen Zusammenhänge zwischen FEAR und MEN und die Funktionen der beteiligten Proteine hinaus, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, sind anschaulich im Überblicksartikel von D'Amours zusammen gefasst (D'Amours and Amon 2004).

1.3.4 Meiose

Grundsätzlich unterscheidet sich die Meiose von der Mitose dadurch, dass nach der DNA-Replikation zwei methodisch verschiedene Segregationsschritte ablaufen. In der Mitose entstehen nach Verdopplung der 2N-DNA in diploiden Zellen durch Teilung Zellen mit doppeltem Chromosomensatz. Bei der Meiose durchläuft die Zelle nach der Verdopplung der DNA zwei Teilungszyklen; 4N Chromosomensätze werden dabei auf 4 Tochterzellen verteilt. Die vier gebildeten haploiden Sporen besitzen nur noch einen kompletten Satz von Chromosomen (Petronczki et al. 2003).

Die Teilung des Nukleus erfolgt in zwei Schritten, die Meiose I und Meiose II genannt werden. Auslöser der Meiose, die auch in der G1 Phase startet, sind das Fehlen von Stickstoff beinhaltenden Bausteinen während gleichzeitig fermentierbare Kohlenstoffquellen fehlen (Park et al. 1996). Das Protein Ime1 ist dabei einerseits für den Start der Meiose verantwortlich, andererseits verhindert es dabei gleichzeitig den Mitose-Start, durch Verhinderung der Aktivierung von Cdc28 durch G1 Zykline (Colomina et al. 1999).

Wichtige essentielle Funktionen in der S-Phase wie die Initiierung der DNA-Replikation oder das Bilden von Spindelpolkkörpern werden dann von der Meiose spezifischen Kinase Ime2 ausgeführt (Dirick et al. 1998). Die Meiose spezifische S-Phase ist dabei verlängert gegenüber der Mitose.

Verglichen mit der Mitose erfolgt die Positionierung der Chromosomen in der Prophase so, dass die homologen Chromosomenpaare sich nebeneinander anordnen. Dabei werden die beiden homologen Chromosomen durch den synaptonemischen Komplex (SC) miteinander verbunden (Kleckner 1995, Storlazzi et al. 1996). Die Verbindung zwischen den

Chromosomenarmen eines Chromosoms durch den Cohesin-Komplex wird im Gegensatz zur Mitose durch die zu Scc1/Mcd1 homologe Untereinheit Rec8 vermittelt (Lee et al. 2002). Während der Prophase der Meiose I (Prophase I) treten verschiedene, für die Meiose spezifische Phänomene auf, wie z.B. das Aufbrechen des DNA-Doppelstrangs (Burgess 2002, Neale et al. 2002) oder der Austausch von Genen zwischen zwei überkreuzten homologen Chromosomen („crossing-over“ (Cha et al. 2000)). Für die korrekte Auftrennung der homologen Chromosomenpaare während dem ersten Schritt der Meiose sind einerseits die physikalischen Wechselwirkungen zwischen den homologen Chromosomen (synatonemischer Komplex) wichtig, um die Zugkräfte der Spindel auszuhalten. Andererseits müssen die Schwesterchromatiden über den Meiose I Schritt hinaus verbunden bleiben. Zusätzlich muss dabei gewährleistet sein, dass beide Kinetochoren eines Schwesterchromatidenpaars an Mikrotubuli gebunden werden, die vom selben Pol ausgehen. Ferner bedarf es zur korrekten Separation homologer Chromosomen der Auflösung von entstandenen rekombinatorischen Ereignissen wie z.B. Chiasmata (Galbraith et al. 1997). Dazu muss jedoch auch die Schwesterchromatiden-Kohesion entlang der Arme der Chromosomen, die von der Meiose spezifischen Cohesin Untereinheit Rec8 vermittelt wird, durch die Separase Esp1 getrennt werden (Buonomo et al. 2000). Die ebenfalls von Rec8 vermittelte Kohesion in der Zentromerregion der Schwesterchromatiden darf allerdings davon während der Meiose I nicht beeinträchtigt werden, um die korrekte Segregation in Meiose I zu gewährleisten und in Meiose II die Auftrennung der physikalischen Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden zu ermöglichen (Watanabe and Nurse 1999). Für das Phänomen, dass Rec8 in der Zentromerregion während der Meiose I nicht prozessiert wird spielen einerseits das Protein Spo13 und andererseits Slk19 eine essentielle Rolle. Spo13 schützt während dem ersten Segregationsschritt in der Meiose Rec8 vor der Prozessierung durch Esp1, während Slk19 trotzdem von der Separase Esp1 prozessiert wird (Lee et al. 2002). Fehlen von Slk19 verursacht das Prozessieren von zentromerem Rec8 und außerdem die Trennung von Schwesterchromatiden während Meiose I (Kamieniecki et al. 2000).

Im mit der Mitose vergleichbaren Meiose II Schritt wird dann durch das Schneiden von zentromerem Rec8 durch die Separase Esp1 (Buonomo et al. 2000) die Kohesion zwischen den Schwesterchromatiden aufgelöst. Somit kann die Aufteilung der Schwesterchromatiden erfolgen, was dann zum Auftreten von vier untereinander Zellwand getrennten, haploiden Sporen im Ascus (Tetrade) führt. Übereinstimmend mit der Modellvorstellung bleibt Pds1 vor seiner Proteolyse solange verschont und verhindert dadurch die Aktivierung der Separase Esp1, bis im Meiose II Schritt die APC vermittelte Proteolyse erfolgt (Shonn et al. 2000).

Für die Orientierung der homologen Chromosomen, zur korrekten Trennung in Meiose I und Meiose II spielt neben Faktoren, wie Bub1 und Mam1 das an der Kinetochorregion lokalisierte Slk19 eine sehr wichtige kontrollierende Rolle (Kamieniecki et al. 2000).

Die entscheidenden Schritte in Meiose I und Meiose II werden wie in der Mitose von der Kinase Cdc28 durch Aktivierung von den Zyklinen Clb1, Clb3 und Clb4 vermittelt. Die Expression der B-Typ Zykline wird dabei vom Transkriptionsfaktor Ntd80 reguliert (Dahmann et al. 1995). Clb2 spielt dagegen in der Meiose keine Rolle. Der Promotor des *CLB2* Gens besitzt keine Ntd80 Bindestelle und somit erfolgt auch keine Expression während der Meiose (Grandin and Reed 1993).

1.3.5 Slk19 (Yor195w)

Unter Verwendung der „Two-Hybrid-Methode“ wurde bei der Suche nach Proteinen, die mit der β -Untereinheit Pre4 des Proteasoms interagieren, das Protein Yor195w gefunden. Aufgrund seiner Eigenschaft, bei Deletion in Zellen mit mutiertem Kinesinmotorprotein Kar3 synthetische Letalität zu erzeugen, wird heute Yor195w als Slk19 (synthetic lethality with kar3) (Zeng et al. 1999) bezeichnet.

Das 2,46 kb große *SLK19/YOR195w* Gen kodiert ein aus 821 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einem Molekulargewicht von 95 kDa. Strukturvorhersagen über Slk19 weisen auf ein dimeres Protein mit sogenannter „coiled-coiled-Struktur“ hin.

Es sind bisher nur homologe Proteine bekannt mit maximal 25% Identität wie z.B. Tropomyosin aus Muskel von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), das ebenfalls eine coiled-coil Struktur wie der Carboxy-terminale Teil von Slk19 besitzt (siehe Abb. 5a,b). Tropomyosin stabilisiert Aktin durch Umwinden, reguliert die Wechselwirkung mit Myosin und inhibiert die Proteolyse von Muskelproteinen über das Proteasom (Patchell et al. 2005, Phillips et al. 1986, Solomon and Goldberg 1996).

Slk19 lässt sich in zwei unterschiedliche Domänen aufteilen:

Eine globuläre N-terminale Domäne und anschließend die schraubenförmige, langgestreckte, coiled-coiled Domäne, die sich bis zum C-Terminus hin erstreckt (siehe Abb. 5a).

a)



b)

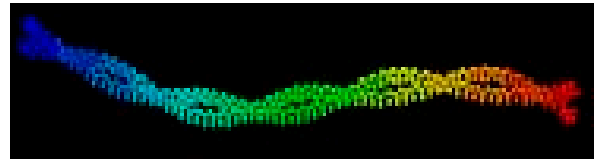


Abbildung 5: Struktur von Slk19: (a) Modell des Proteins nach Strukturvorhersagen, (b) Zum Vergleich Röntgenstrukturmodell von Tropomyosin einem Slk19 homologen Muskelprotein aus Kaninchen: Tropomyosin ist zu 21% identisch mit dem carboxy-terminalen Bereich der „coiled-coil“ Struktur von Slk19.

Untersuchungen der letzten Jahre im Zusammenhang mit der Aufklärung von Kontroll- und Regulationsmechanismen des Zellzyklus zeigen, dass Slk19 eine wichtige bisher noch nicht eindeutig geklärte Funktion in den Netzwerken, die Mitose und Meiose regulieren, spielt (D'Amours and Amon 2004).

Funktion von Slk19 in der Meiose

Gezeigt werden konnte bisher, dass Slk19 die korrekte Chromosomensegregation in beiden Meiose-Schritten beeinflusst (Zeng and Saunders 2000). Homozygot deletierte *slk19*-Nullmutanten bilden unter Sporulationsbedingungen anstatt vier Sporen im Ascus ausschließlich zwei Sporen, deren Überlebensrate bei lediglich 50 % lag.

Genauere Betrachtung dieses Sporulationsphänotyps in Diploiden mit zentromer gekoppelten auxotrophen Markern wiesen das Auftreten von verschiedenen Missegregationsmustern schon im ersten Meiose Schritt nach.

Neben Chromosomenverlust tritt sehr häufig schon im ersten Schritt ausgleichende Segregation (Trennung und Verteilung von Schwesterchromatiden) anstelle der reduktionalen Segregation (Verteilen der homologen Chromosomenpaare) auf. Bei der Verfolgung mehrerer Chromosomen findet man häufig gemischte Segregation (zwei Chromosomen werden unabhängig voneinander, das eine reduktional und das andere ausgleichend, verteilt) (Zimmermann 1998). Weiterhin konnte durch Untersuchungen des Segregationsverhaltens von artifiziellen Chromosomen in Sporen, die den Meiose I Schritt korrekt durchlaufen hatten, nachgewiesen werden, dass Slk19 auch in dem Mitose-ähnlichen Schritt in der Meiose II eine Rolle spielt (Pfiz et al. 2002).

Folglich führt Slk19 eine ordnende Aufgabe bei der zentromer gesteuerten Kontrolle der beiden verschiedenen Meioseschritte aus (Zimmermann 1998); (Zeng and Saunders 2000). Zusätzliche Studien zeigten, dass die Teilung des Nukleolus und das Freisetzen von Cdc14 während der Anaphase in Meiose I von der Separase Esp1, Spo12 und Slk19 also den Komponenten des FEAR Netzwerks gesteuert werden (Buonomo et al. 2003, Marston et al. 2003). In diesem Prozess spielt die Prozessierung von Slk19 durch die Separase Esp1 keine Rolle; es werden dagegen die Lokalisierung von Esp1 durch Slk19 in der Zentromerregion an den Spindelfasern als entscheidender Punkt diskutiert (D'Amours and Amon 2004).

Funktion von Slk19 in Mitose

Die aufgrund der Meiosestudien getroffene Annahme, dass die Deletion von *SLK19* dann auch zum korrekten Ablauf der Mitose beitragen müsste, konnte durch Untersuchungen zur Verlustrate von artifiziellen Chromosomen ebenfalls bestätigt werden (Pfiz et al. 2002). *SLK19*-Deletionen zeigen abnormale, kurze mitotische Spindeln und sich vermehrt entwickelnde astrale Mikrotubuli.

Auch die durch Deletion von *SLK19* bewirkte synthetische Letalität von *kar3* Nullmutanten kann durch den schnellen Spindelabbau und Arrest der Zellen während der Mitose erklärt werden. Verfolgt man zusätzlich GFP-Fusionen von Slk19 fluoreszenzspektrometrisch, so lokalisiert Slk19 an den Kinetochoren der mittleren Spindelregion während Kar3-GFP am anderen Ende der Spindeln an den Spindelpolkörpern lokalisiert. Trotz dieser räumlichen Trennung führen die beiden Proteine wie durch die synthetischen Letalität belegt eine gemeinsame Aufgabe bei der Spindelstabilisierung aus (Zeng et al. 1999).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Slk19 zusammen mit anderen Komponenten, wie der Separase Esp1, der Polo-Kinase Cdc5 und Spo12 zur Freisetzung von Cdc14 im FEAR Netzwerk in der frühen Anaphase notwendig ist und dadurch auch der Austritt aus der Mitose über das MEN-Netzwerk gesteuert wird (D'Amours and Amon 2004, Stegmeier et al. 2002, Visintin et al. 2003).

Interessanter Weise wechselwirkt Slk19 nicht nur mit der Separase Esp1, sondern wird während der Anaphase zusammen mit nur wenigen anderen bisher bekannten Proteinen durch Esp1 auch prozessiert. Zu diesen Proteinen zählen z.B. Scc1, ein Protein im Kohesin-Komplex in der Mitose, und Rec8, das Scc1 in der Meiose ersetzt (Sullivan et al. 2004, Sullivan et al. 2001, Sullivan and Uhlmann 2003).

Slk19 zeigt Abhängigkeit von *pre4* Mutationen

Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 gaben Anlass zur Annahme, dass das Proteasom über die Pre4-Untereinheit eine Funktion auf Slk19 ausübt (Zimmermann 1998). Die Annahme, dass die Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 bei Deletion von *SLK19* verhindert wird, liefert deshalb eine plausible Erklärung für das Auftreten der synthetischen Letalität in Zellen mit Deletion von *SLK19* und *KAR3* (Slk19: synthetic lethality with *kar3*). In einem *pre4*-Allel, das mit der *KAR3*-Deletion synthetisch letal ist, wird daher die Störung der Slk19-Pre4 Interaktion erwartet, falls diese für die essentielle Funktion von Slk19 bei Fehlen von Kar3 von Bedeutung ist.

Ein weiterer bekannter Effekt, der die Vermutung einer direkten Wechselwirkung von Slk19 mit Pre4 unterstützt, wird durch die *pre4-1* Mutante erzeugt. Während in *pre4-1* Mutanten bei Anwesenheit von Slk19 die PGPH Aktivität drastisch reduziert ist, tritt nach der *SLK19*-Deletion in *pre4-1* Mutanten die Wiederherstellung der PGPH Aktivität zu 50% ein (Zimmermann 1998).

1.4 Suche nach direkten Interaktionen zwischen Proteinen

1.4.1 Synthetische Letalität

Als synthetische Letalität wird das Phänomen des Zelltods bezeichnet, der durch die Kombination zweier, auf unterschiedlichen Genen befindlicher, einzeln nicht letaler Mutationen verursacht wird. Verhält sich die Kombination zweier deletierter oder mutierter Gene synthetisch letal, so stehen die Produkte der beiden Gene zumindest in einem funktionellen Zusammenhang, können aber auch direkt physikalisch interagieren.

Bei der Suche nach synthetisch letalen Mutationen kann nach folgendem Muster vorgegangen werden: Eine bereits vorhandene Mutation wird durch ein Plasmid, das ein entsprechendes Wildtyp-Gen trägt, komplementiert. Danach werden weitere Mutationen erzeugt. Nach der Mutagenese sucht man dann nach Zellen, bei denen der Verlust des komplementierenden Wildtyp-Plasmids - Wechsel von Einzelmutanten zu Doppelmutanten - den Zelltod bedingt. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit des Wildtyp-Plasmids essenziell für das Überleben der Zelle war, und dass die Zellen eine zusätzliche, synthetisch letale Mutation besitzen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, haploide Mutanten zu kreuzen und in den Nachkommen das Fehlen von Doppelmutanten zu beobachten.

1.4.2 Co-Immunopräzipitation

Durch Epitop-Markierung sowohl am N- als auch am C-Terminus ist es möglich, Proteine an Antikörper, die das entsprechende Epitop erkennen, zu binden. Durch diese Methode lassen sich Proteine, die kein entsprechendes Epitop besitzen selektiv abtrennen. Bestehen jedoch *in vivo* direkte Wechselwirkungen anderer Proteine mit dem Epitop-markierten Protein, z.B. in Komplexen, so werden diese gemeinsam isoliert und können immunologisch oder durch Sequenzierung (MALDI-TOF) identifiziert werden (Phizicky and Fields 1995, Qoronfleh et al. 2003, Ren et al. 2003).

1.4.3 „Two-Hybrid“-Experimente

Das „Two-Hybrid“-System stellt eine weitere elegante genetische Methode dar, um in Hefe *in vivo* Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen (Fields und Song, 1989). „Two-Hybrid“-Systeme basieren auf der Wiederherstellung der Funktion von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von der Wechselwirkung zwischen zwei Zielproteinen (Phizicky and Fields 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Zellzyklus, der koordinierte und regulierte Ablauf von Prozessen zur korrekten Vervielfältigung, Trennung und dem zielgerichteten Transport der Chromosomen, spielt eine sehr wichtige Rolle für die genetische Stabilität der Zellen und die Entwicklung eines Organismus. Veränderungen in den verantwortlichen Proteinen können drastische Auswirkungen auf diese Abläufe haben. So zeigen *slk19* Nullmutanten der Hefe *S. cerevisiae* sowohl im WCG als auch im W303 Hintergrund allgemein starke Defekte in Meiose sowie Mitose. Dazu gehören fehlerhafte Chromosomensegregation und reduzierte Lebensfähigkeit.

Da der korrekte Ablauf des Zellzyklus ebenfalls vom gezielten Abbau bestimmter Regulator- und Strukturproteine entscheidend beeinflusst wird, führen gerade auch Veränderungen im Proteasekomplex Proteasom, das für diese Prozesse verantwortlich ist, zu entscheidenden Fehlern.

In „Two-Hybrid“-Experimenten und in *in vitro* Versuchen mit GST-Fusionsproteinen von Slk19 war die Wechselwirkung zwischen der proteasomalen Untereinheit Pre4 und Slk19 nachgewiesen worden (Zimmermann 1998). Zur Aufklärung, ob Slk19 nur mit Pre4 oder dem gesamten Proteasomenkomplex interagiert, waren in vorangegangenen Arbeiten Immunoprecipitationsexperimente durchgeführt worden, in denen die Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom zwar gezeigt aber nicht verifiziert werden konnte.

Um einen biochemischen Nachweis für die direkte Wechselwirkung von Slk19 mit dem Proteasom zu erhalten, sollten Co-Immunoprecipitationsversuche mit HA-markiertem Slk19 und Protein-A-markiertem Pre6 durchgeführt werden.

In einem genetischen Ansatz sollte unter Verwendung von durch mutagene PCR erzeugten *pre4* Mutantenallelen versucht werden, solche mutierten *pre4* Allele zu finden, die in Zellen nur in Kombination mit der Deletion von *KAR3* Letalität hervorrufen. Die letale Wirkung solcher mutierter *pre4* Plasmide sollte durch Austausch von *PRE4* Wildtyp Plasmiden mit den mutierten *pre4* Plasmiden in *KAR3* Wildtyp Zellen und *kar3* Nullmutanten verifiziert werden. Dieses genetische Screening-Verfahren sollte die Wechselwirkung von Slk19 und Pre4 bestätigen.

Sequenzierung der mutierten *pre4* Allele und Untersuchung der vereinzelt Punktmutationen sollte darüber hinaus die Lokalisierung der Interaktion von Slk19 am Pre4 Protein und dem Proteasomenkomplex erlauben.

In „Two-Hybrid“-Experimenten sollte dann als Kontrolle die Slk19-Pre4 Interaktion nachvollzogen und unter Verwendung der mutierten Pre4 Proteine die Beeinträchtigung oder Blockade der Wechselwirkung mit Slk19 bestätigt werden.

Einerseits sollten die gefundenen *pre4* Mutantenallele dann dafür verwendet werden, durch chromosomale Integration, und Rückkreuzen mit *PRE4 kar3Δ* Zellen die synthetische Letalität der *pre4-72 kar3Δ* Doppelmutanten nach Tetradisdissektion zu verifizieren. Andererseits konnten die chromosomalen und plasmidabhängigen *pre4* Mutanten dazu verwendet werden, phänotypische Untersuchungen zum mitotischen und meiotischen Wachstumsverhalten durchzuführen, um einen Vergleich mit Phänotypen von *slk19* Nullmutanten zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Applied Biosystems, Norwalk, USA	ABI 373A DNA-Sequenzer
BioRad, München	Netzgeräte, SDS-Gelelektrophorese, DNA-Elektrophorese, Elektroporator
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifugen Typ 5417, Photometer 1101M
Fröbel, Lindau	Geltrockner, TransferBlot (semi-dry-system)
Heraeus, Hanau	Inkubationsschränke Typ B-6200 und B-6120, Tischzentrifuge Biofuge pico
Hermle, Grosheim	Tischzentrifuge T-231M
Jasco, Tokio, Japan	Spektrophotometer V-530
Kontron, Neufarn	Kühlzentrifugen Centrikon H-401 und T-124, Ultrazentrifuge Centrikon T-1065
Kühner, Basel, Schweiz	Minischüttler, Labshaker für Flüssigkulturen
MWG, Ebersberg	Geldokumenter
Nikon, Tokio, Japan	Mikromanipulator
Pharmacia, Freiburg	Gelelektrophoresekammer, PCR-Gerät
Shimadzu, Tokio, Japan	Fluoreszenzphotometer
Stratagene	PCR-Gerät RoboCycler 40
Zeiss, Oberkochen	Mikroskope, Fluoreszenzmikroskop

2.1.2 Chemikalien

Soweit hier nicht explizit aufgeführt, wurden alle Chemikalien über die üblichen Bezugsquellen in der höchstmöglichen Reinheit bezogen.

Amersham-Pharmacia, Braunschweig	ECL TM -Kit, ECL TM -Hyperfilm, Hybond-N ⁺ -Nylonmembran, random prime module RPN 3540, Gene Images CDP-Star detection module
Anamed, Offenbach	SeeBlue Proteinmarker
Dianova, Hamburg	Geneclean II [®] Kit, Antikörper
Difco, Detroit, USA	Bacto Pepton, Bacto Trypton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base
Du Pont, Nemours	Glusulase

Invivogen	Antikörper (HA)
MWG-Biotech, Ebersberg	Oligonukleotide
Promega	Heringssperma-DNA
Qiagen, Hilden	Qiaprep [®] Miniprep System, PCR Purification Kit, Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics, Mannheim	Restriktionsendonukleasen, RNase A, Lysozym, DNA-Längenstandards, Nukleotide, Ampicillin, Taq-Polymerase, High Pure PCR Purification Kit
Roth, Karlsruhe	β -Mercaptoethanol, Pall Gelman, Roßdorf Nitrozellulose
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blue, Bromphenolblau
Sigma, Deisenhofen	Ethidiumbromid, Cycloheximid
TRC, North York, Kanada	5FOA

2.2 Medien

2.2.1 Hefemedien

Vollmedium (YPD)

1 %	Yeast Extract
2 %	Bacto-Pepton
2 %	D-Glucose
50 mg/l	Adenin
50 mg/ml	Uracil
	auf pH 5,5 mit NaOH/HCl eingestellt

Zur Verwendung als Selektionsmedium wurden 200 mg/l Geneticin zugegeben

Synthetisches Vollmedium (CM)

0,13 %	Dropout Powder (Ausubel et al. 1989-1997)
0,67 %	Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids
2 %	D-Glucose
	auf pH 5,6 mit NaOH/HCl eingestellt

Zusätzliche Supplemente für auxotrophe Sämme:

20,0 mg/ml Ade; 20,0 mg/ml His; 30,0 mg/ml Leu; 30,0 mg/ml Lys oder 20,0 mg/ml Ura

Minimalmedium (MV)

0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids

2 % D-Glucose

auf pH 5,6 mit NaOH/HCl eingestellt

Zusätzliche Supplemente für auxotrophe Sämme:

20,0 mg/ml Ade; 20,0 mg/ml His; 30,0 mg/ml Leu; 30,0 mg/ml Lys oder 20,0 mg/ml Ura

5-FOA Medium

0,67 Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids

2 % D-Glucose

1,0 g/l 5-Fluoroorotat (5-FOA)

50 mg/ml Uracil

auf pH 5,6 mit NaOH/HCl eingestellt

Zusätzliche Supplemente für auxotrophe Sämme:

20,0 mg/ml Ade; 20,0 mg/ml His; 30,0 mg/ml Leu; oder 30,0 mg/ml Lys

2.2.2 Medien für *E.coli* Kulturen

Vollmedium (LB)

1 % Yeast Extrakt

1 % Bacto-Pepton

0,5 % Natriumchlorid

auf pH 7,5 mit NaOH/HCl eingestellt

Zur Verwendung als Selektionsmedium wurden entsprechende Mengen des Antibiotikums zugesetzt (50 mg/l Ampicillin).

SOC-Medium

2 % Bacto Trypton

0,5 % Yeast Extrakt

20 mM D-Glucose

10 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat

2,5 mM Kaliumchlorid

Sporulationsmedium

1 % Kaliumacetat (w/v)

2.3 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben angezogen, deren Volumen dem 4-5 fachen des Flüssigkeitsvolumen entsprach.

2.3.1 Hefen

Von Hefe-Zellkulturen wurden zunächst Vorkulturen mit dem entsprechenden Hefestamm angeimpft und bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30°C inkubiert. Dann wurden Hauptkulturen mit der flüssigen Vorkultur angeimpft.

Dauerkulturen

Aus stationären Zellkulturen wurden Hefe-Dauerkulturen in sterilem Glycerin (15 %) angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 E. coli

E. coli Kulturen wurden direkt mit Zellen von Agarplatten angeimpft und bei 37°C auf einem Rundschüttler bei 220 U/min über Nacht inkubiert.

Dauerkulturen

Über Nacht in LB_(amp) Flüssigmedium angezogene *E.coli* Kulturen wurden 1:1 mit sterilem Glycerin (60 %) gemischt und als Dauerkulturen bei -80°C eingefroren.

2.3.3 Zellwachstumsbestimmung

Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte der entsprechend verdünnten Kulturen bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Hierbei entspricht einem OD₆₀₀-Wert von 1,0 die Menge von etwa 2×10^7 Zellen/ml.

2.4 Stämme und Plasmide

2.4.1 Verwendete Hefestämme

Stammname	Genotyp	Herkunft
17/14 (MAT α Kontrolle)	<i>MATα his1-123</i>	M. Hoffmann
17/17 (MAT α Kontrolle)	<i>MATα his1-123</i>	M. Hoffmann
WCG4 α	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ</i>	W. Hilt
WCG4a	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ</i>	W. Hilt
WCG4a/ α	<i>MATα/MATα his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/ leu2-3,112 ura3-Δ/ura3-Δ</i>	W. Hilt
WCG4a-11a	<i>MATα pre1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-can GAL</i>	W. Hilt
CY630	<i>MATα ade2 trp1-90 leu2-3,112 his3-200 gal4 gal80 URA3::lexa op-lacZ</i>	M. Christman
Y190	<i>MATα ade2 trp1-901 leu2-3,112 his3-200 ura3-52 URA3::GAL op-lacZ LYS2::GAL op-HIS3</i>	S. Elledge
YSP25	<i>MATα /MATα slk19Δ::KAN^R/slk19Δ::KAN^R</i>	S. Pfütz
YSP26	<i>MATα SLK19::HA₃::HIS5</i>	S. Pfütz
YSP27	<i>MATα SLK19::HA₃::HIS5</i>	S. Pfütz
YHi29/1 α	<i>MATα pre1-1</i>	W. Hilt
YHi29/4a	<i>MATα pre4-1</i>	W. Hilt
YHi29/14a	<i>MATα pre1-1 pre4-1</i>	W. Hilt
YHi31/4 α	<i>MATα pre4-1</i>	W. Hilt
yHi39/1/2 α	<i>MATαpre4Δ::HIS3 [URA3 PRE4]</i>	W. Hilt
yHi38/1/1 α	<i>MATαpre4Δ::HIS3 [LEU2 PRE4]</i>	W. Hilt
YHi61/11C	<i>MATα pre4-1 slk19Δ::URA3</i>	W. Hilt
YHi61/14D	<i>MATα pre4-1 slk19Δ::URA3</i>	W. Hilt
YL088	<i>MATα trp1Δ::loxp-loxp</i>	M. Ligr
YRG11	<i>MATα pre3-1</i>	W. Heinemeyer
YRL3	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i>	R. Lisy
YRL5	<i>MATα kar3Δ::KAN^R</i>	R. Lisy

Stammname	Genotyp	Herkunft
YRL6	<i>MATα kar3Δ::KAN^R</i>	R. Lisy
YRL11	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i>	R. Lisy
YRL12	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i>	R. Lisy
YRL13	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]</i>	R. Lisy
YRL14	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72][HIS3 KAR3]</i>	R. Lisy
YMB180	<i>MATα/MATα pre4Δ ::URA3/PRE4 (pre4Δ ::URA3= pre4-3)</i>	M. Bernert
FYS7	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ -200 ade2-101 lys2-108 YAC12 CEN4 LYS2 HIS3</i>	W. Hilt
YB016	<i>MATα/MATα ura3-52/ura3-52 leu2Δ1/leu2Δ1 his3-Δ -200/his3Δ -200 ade2-101/ade2-101 lys2-108/ lys2-108 preΔ::URA3/PRE4 YAC12 CEN4 LYS2 HIS3[LEU2 pre4-72]</i>	B. Wagner
YB016/Xa, α	<i>MATα/α ura3-52 leu2Δ1 his3Δ 200 ade2-101 lys2- 108/ preΔ::URA3 YAC12 CEN4 LYS2 HIS3 [LEU2 pre4-72]</i>	Sporen aus YB016
YJJ11	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]</i>	YRL3[pJJ14/1]
YJJ12	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]</i>	YJJ11 nach 5FOA
YJJ13	<i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4] [LEU2 pre4-72]</i>	YRL12[pJJ14/1]
YJJ14	<i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72] [HIS3 KAR3]</i>	YRL13 [pMA1428] nach 5FOA
YJJ19	<i>MATα/MATα pre4Δ ::URA3/PRE4 [LEU2 pre4-72]</i>	YMB180[pJJ14/1]
YJJ20a, α	<i>MATα pre4-1 kar3Δ::KAN^R, MATα pre4-1 kar3Δ::KAN^R</i>	Sporen aus YRL6 x yHi29/4

Stammname	Genotyp	Herkunft
YJJ21a, α	<i>MATa pre4Δ::URA3 [LEU2 pre4-72],</i> <i>MATα pre4Δ::URA3 [LEU2 pre4-72]</i>	Sporen aus YJJ19
YJJ22	<i>MATa/MATα pre4Δ::KIURA3/PRE4</i>	diese Arbeit
YJJ23	<i>MATa/MATα pre4Δ::KIURA3/PRE4[LEU2 pre4-72]</i>	YJJ22[pJJ14/I]
YJJ25	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-142]</i>	YRL3[pJJ15]
YJJ26	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-60]</i>	YRL3[pJJ16]
YJJ27	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-52]</i>	YRL3[pJJ17]
YJJ29	<i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i> <i>[LEU2 pre4-142]</i>	YRL12[pJJ15]
YJJ30	<i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i> <i>[LEU2 pre4-60]</i>	YRL12[pJJ16]
YJJ31	<i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]</i> <i>[LEU2 pre4-52]</i>	YRL12[pJJ17]
YJJ33	<i>MATa/MATα bim1Δ::KAN^R/BIM1</i>	<i>BIM1</i> Deletion
YJJ34a, α	<i>MATa bim1Δ::KAN^R,</i> <i>MATα bim1Δ::KAN^R</i>	Sporen aus YJJ33
YJJ35	<i>MATa/MATα kar3Δ::KAN^R/KAR3 pre4Δ::HIS3/PRE4</i> <i>[URA3 PRE4]</i>	YRL5 x yHi39/1/2 α
YJJ36a, α	<i>MATa kar3Δ::KAN^R pre4Δ::HIS3 [URA3 PRE4],</i> <i>MATα kar3Δ::KAN^R pre4Δ::HIS3 [URA3 PRE4]</i>	Sporen aus YJJ35
YJJ37	<i>MATa/MATα bim1Δ::KAN^R/BIM1 pre4-1/PRE4</i>	YJJ34 α x yHi29/4
YJJ38a, α	<i>MATa bim1Δ::KAN^R pre4-1,</i> <i>MATα bim1Δ::KAN^R pre4-1</i>	Sporen aus YJJ37
YJJ39	<i>MATa/MATα pre4-1/PRE4 kar3Δ::KAN^R/KAR3</i> <i>bim1Δ::KAN^R/BIM1</i>	YJJ34 α x YJJ20a
YJJ40	<i>MATα pre4-1 kar3Δ::KAN^R bim1Δ::KAN^R</i>	Sporen aus YJJ39
YJJ41	<i>MATa/MATα pre4-1/PRE4 slk19Δ::URA3/SLK19</i> <i>bim1Δ::KAN^R/BIM1</i>	YJJ34 α x YHi61/11C
YJJ42	<i>MATa/MATα bim1Δ::KAN^R/BIM1 kar3Δ::KAN^R/KAR3</i> <i>pre4Δ::HIS3/PRE4 [URA3 PRE4]</i>	YJJ34 α x YJJ36a YJJ34a x YJJ36 α

Stammname	Genotyp	Herkunft
YJJ43a, α	<i>MATa bim1Δ::KAN^R kar3Δ::KAN^R,</i> <i>MATα bim1Δ::KAN^R kar3Δ::KAN^R</i>	Sporen aus YJJ42
YJJ44a, α	<i>MATa bim1Δ::KAN^R kar3Δ::KAN^R pre4Δ::HIS3 [URA3</i> <i>PRE4],</i> <i>MATα bim1Δ::KAN^R kar3Δ::KAN^R pre4Δ::HIS3 [URA3</i> <i>PRE4]</i>	Sporen aus YJJ42
YJJ45a, α	<i>MATa pre4-1slk19Δ::URA3 trpΔ::loxp-loxp,</i> <i>MATα pre4-1slk19Δ::URA3 trpΔ::loxp-loxp</i>	Sporen aus YL088 x YHi61/11C
YJJ46a, α	<i>MATa slk19Δ::URA3 trpΔ::loxp-loxp,</i> <i>MATα slk19Δ::URA3 trpΔ::loxp-loxp</i>	Sporen aus YL088 x YHi61/11C
YJJ48	<i>MATa/MATα [LEU2 pre4-72]</i>	Spore aus YJJ19
YJJ49	<i>MATα pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72][HO URA3]</i>	YJJ12[Br52]
YJJ50/7	<i>MATa pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]</i>	YJJ49 MAT α → a
YJJ51	<i>MATa/MATα pre4Δ::KAN^R/pre4Δ::KAN^R</i> <i>[LEU2 pre4-72]</i>	YJJ12 x YJJ50/7
y859	<i>MATa ade2 leu2-3,112 his3 trpΔ ura3 cdc5-1</i>	A.. Amon
y2596	<i>MATa ade2 leu2-3,112 his3 trpΔ ura3 cdc15-2</i>	A.. Amon
YJJ52	<i>MATa/MATα cdc5-1/CDC5 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19</i>	YSP26 x y859
YJJ53	<i>MATa cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5</i>	Spore aus YJJ52
YJJ54	<i>MATα cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5</i>	Spore aus YJJ52
YJJ55	<i>MATa/MATα cdc15-2/CDC15 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19</i>	YSP26 x y2596
YJJ56	<i>MATa cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5</i>	Spore aus YJJ55
YJJ57	<i>MATα cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5</i>	Spore aus YJJ55
WCG-ProtA	<i>MATaPRE6::PROTA::HIS3</i>	C. Enenkel
YJJ58	<i>MATa cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3</i>	Spore aus YJJ60
YJJ59	<i>MATα cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3</i>	Spore aus YJJ60
YJJ60	<i>MATa/MATα cdc5-1/CDC5 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19</i> <i>PRE6::PROTA::HIS3/PRE6</i>	WCG ProtA x YJJ54
YJJ61	<i>MATa/MATα cdc15-2/CDC15 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19</i> <i>PRE6::PROTA::HIS3/PRE6</i>	WCG ProtA x YJJ57

Stammname	Genotyp	Herkunft
YJJ62	<i>MATα cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5</i> <i>PRE6::PROTotA::HIS3</i>	Spore aus YJJ61
YJJ63	<i>MATα cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5</i> <i>PRE6::PROTA::HIS3</i>	Spore aus YJJ61
YJJ64	<i>MATα cdc5-1</i>	Sporen aus YJJ60
YJJ65	<i>MATα cdc15-2</i>	Sporen aus YJJ61
YJJ66	<i>MATα cdc 15-2 PRE6::PROTA::HIS3</i>	Sporen aus YJJ61
YJJ67	<i>MATα SLK19::HA3PRE6::PROTA::HIS3</i>	Sporen aus YJJ61

Tabelle 1: Verwendete Hefestämme: Alle verwendeten Stämme ohne spezifische Beschreibung sind isogen zum WCG Stammhintergrund *his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ Can^S Gal⁺*.

2.4.2 E. coli Stämme

Für Klonierungen wurde der E.coli Stamm DH5 (F'/endA1 hsdR17 (r_K.m_K+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal_r) (lacZYAargF)_{U169} relA1 deoR (80dlacZM15), (Woodcock et al. 1989) zur gezielten Plasmidvermehrung verwendet.

2.5 Verwendete Plasmide

2.5.1 *p15 E4* *pRS 315 Δ Ecl136II HindII::PRE4 5'→3'*

Das 7,5 kb große Plasmid *p15 E4* ist vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *HindII* die Gensequenz für das *PRE4* Gen in 5'→3' Richtung. Dieses Plasmid stammt von W.Heinemeyer.

2.5.2 *p15UBE4* *pRS 315 Δ SphI BamHI::UBI::PRE4 5'→3'*

Das 7,6 kb große Plasmid *p15 UBE4* ist ebenfalls vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet. Es enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *BamHI* die *PRE4* Sequenz in 5'→3' Richtung, die zusätzlich am N-Terminus die Sequenz, die für das Ubiquitin kodiert, *UBI*, insertiert hat. Dieses Plasmid wurde ebenfalls von W.Heinemeyer generiert.

2.5.3 *pUG6*

loxP KAN^R loxP ampR

Das 4 kb große Plasmid *pUG6* (Gueldener et al. 1996) enthält das Kanamycin-Resistenzgen *KAN^R* unter Kontrolle von Promotor und Terminator des *TEF* Gens aus *Ashbya gossypii* (Wach et al. 1994). Diese Genkassette wird von Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (*loxP*) flankiert. Das Plasmid *pUG6* wurde als DNA Matrize (Template) für *KAN^R* Deletionskassetten verwendet.

2.5.4 *pL079*

loxP K. l-URA3 loxP ampR

Das 4 kb große Plasmid *pL079* basiert auf dem Plasmid *pUG6* (Gueldener et al. 1996) und enthält das *Kluyveromyces lactis URA3* Gen unter Kontrolle von Promotor und Terminator des *TEF* Gens aus *Ashbya gossypii* (Wach et al. 1994). Diese Genkassette wird von Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (*loxP*) flankiert. Das Plasmid *pL079* wurde als DNA Matrize (Template) für *K.l URA3* Deletionskassetten verwendet.

2.5.5 *pMA 1428*

KAR3 HIS3 CEN4

Das 7.9 kb große Plasmid *pMA 1428* stammt von M.A. Hoyt (Cottingham et al. 1999) und enthält wahrscheinlich das Plasmid *Y Cp 50* (Rose 1987) als Grundkörper. Weiterhin besitzt es die Sequenz für das *KAR3* Gen, sowie einen *HIS3* Marker.

2.5.7 *CB362*

Amp^R TRP1

Das 5,5 kb große 2 μ Plasmid *CB362* enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die für das gesamte LexA-Protein kodiert (1-202) und unter Kontrolle des ADH-Promotors steht (Christman).

2.5.8 *pACT2*

Amp^R LEU2

Das 8,6 kb große 2 μ Plasmid *pACT* enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz für die Transkriptionsaktivator-domäne von Gal4 (768-881) kodiert und unter Kontrolle des ADH-Promotors steht (Elledge).

2.5.9 *pAS1*

Amp^R TRP1

Das 7,1 kb große 2 μ Plasmid *pAS1* enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die für das HA-Epitop und die DNA-Bindedomäne von Gal4 (1-147) kodiert und unter Kontrolle des ADH-Promotors steht (Elledge).

2.5.10 *pAS2*

Amp^R CYH2 TRP1

Das 8,5 kb große 2μ Plasmid *pAS2* enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die für das HA-Epitop und die DNA-Bindedomäne von Gal4 (1-147) kodiert und unter Kontrolle des ADH-Promotors steht. Zusätzlich enthält es das *CYH2*-Gen. Hefestämme mit dem *pAS2* Vektor werden damit sensitiv für Cycloheximid (Elledge).

2.5.11 *pJZ1*

CB362 Δ EcoRI BamHI::PRE4 4-801 5'→3'

Das 6,7 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *CB362* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *EcoRI*-Schnittstelle für die LexA DNA-Bindedomäne und zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle und der *BamHI*-Schnittstelle für das ganze *PRE4* Gen ohne das Startkodon kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von LexA mit dem gesamten Pre4 Protein ohne die erste Aminosäure (Methionin) unter der Kontrolle des ADH-Promotors (Zimmermann 1998).

2.5.12 *pJZ3*

pAS2 Δ NcoI BamHI::PRE4 91-801 5'→3'

Das 10,2 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *pAS2* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *NcoI*-Schnittstelle für die Gal4 DNA-Bindedomäne und zwischen der *NcoI*-Schnittstelle und der *BamHI* Schnittstelle für ein N-terminal um 30 Aminosäuren verkürztes Fragment von Pre4 kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 (Aminosäuren 1-147), einer nukleären Lokalisierungssequenz, einem HA-Epitop zur Detektion des Hybridproteins mit Antikörpern und dem N-terminalen Teil des Pre4-Proteins (Aminosäuren 31-266) unter der Kontrolle des ADH-Promotors (Zimmermann 1998).

2.5.13 *pJZ6*

CB362 Δ Sall PstI::PRS2 158-756 5'→3'

Das 7,2 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *CB362* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *Sall*-Schnittstelle für die LexA DNA-Bindedomäne und zwischen der *Sall*-Schnittstelle und der *PstI*-Schnittstelle für ein N-terminal um 50 Aminosäuren verkürztes Fragment von Pre4 kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von LexA und den Aminosäuren 50 bis 252 von PRS2 unter der Kontrolle des ADH-Promotors (Zimmermann 1998).

2.5.14 *pJZ46*

pACT2 Δ BamHI XhoI::slk19Δ 1- 963 5'→3'

Das 10 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *pACT2* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *BamHI*-Schnittstelle für die Transkriptionsaktivator-domäne von Gal4 (768-881) kodiert und zwischen der *BamHI*-Schnittstelle und der *XhoI*-Schnittstelle für ein N-terminal um 321 Aminosäuren verkürztes Fragment von Slk19 kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne und den Aminosäuren 322 bis 821 von Slk19 unter der Kontrolle des ADH-Promotors in den Teststämmen CY630 und Y190 (Zimmermann 1998).

2.5.15 *pJZ47*

pACT2 Δ BamHI XhoI:: slk19Δ 1- 3 5'→3'

Das 10 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *pACT2* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *BamHI*-Schnittstelle für die Transkriptionsaktivator-domäne von Gal4 (768-881) kodiert und zwischen der *BamHI*-Schnittstelle und der *XhoI*-Schnittstelle für das ganze *SLK19*-Gen ohne das Startkodon kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne und den Aminosäuren 2 bis 821 von Slk19 unter der Kontrolle des ADH-Promotors in den Teststämmen CY630 und Y190 (Zimmermann 1998).

2.5.16 *CB440*

Amp^R TRP1 LAMIN C

Das 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *CB362* und enthält eine Sequenz, die für eine Fusion der LexA DNA-Bindedomäne und dem vom Proteasom unabhängigen humanen Protein Lamin C kodiert (Zimmermann 1998).

2.6 Konstruierte Plasmide

2.6.1 *pJJ14-1*

pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-72 5'→3'

Das 7,5 kb große Plasmid *pJJ14-1* ist vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *HindII* die Sequenz des *pre4-72* Allels in 5'→3' Richtung mit den drei Punktmutationen: Position 60 (in der *PRE4* Sequenz) AAt → Aaa Austausch, Position 277 (in der *PRE4* Sequenz) aTG → tTG Austausch und an Position 548 (in der *PRE4* Sequenz) AtG → AaG Austausch.

2.6.2 *pJJ14-1x*

pJJ 14-1 Δ Ecl 136II XbaI::pre4-72 Δ 672-801 5'→3'

Das 7,0 kb große Plasmid *pJJ14-1x* ist vom Plasmid *pJJ14-1* (diese Arbeit) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *XbaI* die um 129 Basen verkürzte Sequenz das *pre4-72* Allels (Deletion von Basen 672-801) in 5'→3' Richtung mit den drei Punktmutationen: Position 60 (in der *PRE4* Sequenz) AAt → Aaa Austausch, Position 277 (in der *PRE4* Sequenz) aTG → tTG Austausch und an Position 548 (in der *PRE4* Sequenz) AtG → AaG Austausch. Das Plasmid wurde durch Verdau von *pJJ14-1* mit *XbaI* und Religation des um 432 bp verkürzten Plasmidrückgrats (Verlust der doppelten *XbaI* Schnittstelle) erzeugt.

2.6.3 *p15 E4x*

p15 E4 Δ Ecl 136II XbaI::PRE4 Δ 672-801 5'→3'

Das 7,0 kb große Plasmid *pJJ14-1x* ist vom Plasmid *pJJ14-1* (diese Arbeit) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *XbaI* die um 129 Basen verkürzte Sequenz das *PRE4* Allels (Deletion von Basen 672-801) in 5'→3' Richtung. Das Plasmid wurde durch Verdau von *p15 E4* mit *XbaI* und Religation des um 432 bp verkürzten Plasmidrückgrats (Verlust der doppelten *XbaI* Schnittstelle) erzeugt.

2.6.4 *pJJ15*

pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-142 5'→3'

Das 7,5 kb große Plasmid *pJJ15* ist vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *HindII* die *pre4-142* Sequenz in 5'→3' Richtung mit einer Punktmutation aus *pre4-72*: Position 548 (in der *PRE4* Sequenz) AtG → AaG Austausch.

2.6.5 *pJJ16*

pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-60 5'→3'

Das 7,5 kb große Plasmid *pJJ16* ist vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und *HindII* die Gensequenz für das *pre4-60* Gen in 5'→3' Richtung mit zwei Punktmutationen aus *pre4-72*: Position 60 (in der *PRE4* Sequenz) AAt → Aaa Austausch und Position 277 (in der *PRE4* Sequenz) aTG → tTG Austausch.

2.6.6 *pJJ17*

pRS 315 Δ Ecl136II HindII::pre4-52 5'→3'

Das 7,5 kb große Plasmid *pJJ17* ist vom Plasmid *pRS 315* (Sikorski and Hieter 1989) abgeleitet und enthält an den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Ecl136II* und

HindIII die Gensequenz für das *pre4-52* Gen in 5'→3' Richtung mit einer Punktmutation aus *pre4-72*: Position 277 (in der *PRE4* Sequenz) aTG → tTG Austausch

2.6.7 *CB362 pre4-72* *CB362 Δ EcoRI BamHI::pre4-72 4-801 5'→3'*

Das 6,3 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *CB362* und enthält vor der Multikloning Site eine Sequenz, die bis zur *EcoRI*-Schnittstelle für die LexA DNA-Bindedomäne und zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle und der *BamHI*-Schnittstelle für das ganze *pre4-72* Allel ohne das Startkodon (Basen 4-801) kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von LexA mit dem gesamten *pre4-72* ohne die erste Aminosäure (Methionin) unter der Kontrolle des ADH-Promotors.

2.6.8 *pAS1 pre4-72* *pAS1 Δ EcoRI BamHI::pre4-72 4-801 5'→3'*

Das 7,9 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *pAS1* und enthält zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle und der *BamHI*-Schnittstelle eine Sequenz, die für das ganze *pre4-72* Allel ohne das Startkodon kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 (Aminosäuren 1-147), einer nukleären Lokalisierungssequenz, einem HA-Epitop zur Detektion des Hybridproteins mit Antikörpern und allen Aminosäuren von *pre4-72* außer der ersten Aminosäure (Methionin) unter der Kontrolle des ADH-Promotors.

2.6.9 *pAS2 pre4-72* *pAS2 Δ NcoI BamHI::pre4-72 91-801 5'→3'*

Das 9,5 kb große 2μ Plasmid basiert auf dem Plasmid *pAS2* und enthält zwischen der *NcoI*-Schnittstelle und der *BamHI*-Schnittstelle eine Sequenz, die für ein N-terminal verkürztes *pre4-72* (Aminosäuren 31-266) kodiert. Es dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 (Aminosäuren 1-147), einer nukleären Lokalisierungssequenz, einem HA-Epitop zur Detektion des Hybridproteins mit Antikörpern und einem N-terminal um 30 Aminosäuren verkürzten Fragments von *pre4-72* unter der Kontrolle des ADH-Promotors. Das Hybridprotein besitzt immer noch die beiden Punktmutationen M52-L und M142-K des prozessierten Pre4.

2.7 Molekularbiologische und biochemische Methoden

Alle beschriebenen Methoden wurden unter Verwendung steriler Lösungen und Gefäße durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, kamen Standardprotokolle zur Anwendung (Ausubel et al. 1989-1997, Guthrie and Fink 1991, Sambrook et al. 1989).

Zentrifugationsschritte in Eppendorfgläsern wurden, soweit nicht anders angegeben, in Tischzentrifugen bei Raumtemperatur und maximaler Drehzahl (14000 rpm) durchgeführt.

2.7.1 Häufig verwendete Puffer

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Natriumacetat pH 7,0; 2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer: 50 mM EDTA; 50 % (w/v) Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau;
0,25 % Xylen Cyanol

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* („boiling mini prep“)

1,5 ml einer *E.coli* Kultur wurden abzentrifugiert, in 300 µl STET-Puffer (8 % D-Glucose; 5 % (w/v) Triton-X 100; 50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und mit 400 µl STET-Lysozym (0,5 mg/ml Lysozym in STET-Puffer) versetzt. Nach 3 Minuten Inkubieren bei 99°C und anschließend 10 Minuten auf Eis wurde 10 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das dabei ausgeflockte Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt, der Überstand nochmals 10 Minuten zentrifugiert, in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen (Holmes and Quigley 1981).

2.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe („plasmid rescue“)

5 ml einer Zellkultur wurden abzentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und in 200 µl Aufschlusspuffer (2 % (w/v) Triton-X 100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform wurde die Suspension eine Minute mit einem Vortex-Mischer geschüttelt und 5 Minuten zentrifugiert. 100 µl der wässrigen Phase wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µl Natriumacetat (3 M pH 6,0) wurde die DNA mit 280 µl Ethanol 5 Minuten bei -80°C präzipitiert, 5 Minuten abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 25 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

In Anlehnung an eine Methode von Ausubel et al. (Ausubel et al. 1989-1997) wurden 1,5 ml einer stationären Hefekultur abzentrifugiert (20 s, 14000 rpm) und zweimal mit je 1 ml Wasser gewaschen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 200 µl „breaking buffer“ (1 % SDS, 2 % Triton X-100, 1mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM NaCl), woraufhin zur Suspension 200 µl Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform gegeben wurden.

Nach fünfminütigem intensivem Durchmischen auf einem Vortexer wurde für 5 s zentrifugiert und anschließend 200 µl Wasser zugegeben. Anschließend wurde 5 min pelletiert (14000 rpm) und 300 µl der wässrigen Phase sorgfältig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol und darauffolgender Kühlung bei -80°C. Danach wurde der Niederschlag abzentrifugiert, das dabei entstandene Pellet mit 400 µl Wasser und 30 g RNase versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 5M Ammoniumacetatlösung und 1 ml 100 % Ethanol wurde die Reaktion gestoppt und die DNA nochmals für 15 min bei -80°C ausgefällt. Das Präzipitat wurde nach erneuter Zentrifugation (2 min, 14000 rpm) mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die chromosomale DNA in 25 µl Wasser gelöst und bei -20°C eingefroren.

2.7.5 Restriktionen und Ligationen

Probeverdau

In einer Standardreaktion wurden 1 µl der in Wasser gelösten Plasmid-DNA mit 0,2 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease und 0,2 µl in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut. Zum Einstellen der geeigneten Inkubationsbedingungen für das Enzym wurden 1 µl der entsprechenden 10-fach konzentrierten Pufferlösungen (RocheDiagnostics, Mannheim) verwendet. Anschließend erfolgte für 2 h Inkubation bei der für das betreffende Enzym erforderlichen Temperatur.

Präparativer Verdau von DNA

In einer Standardreaktion wurden 5- 10 µl der in Wasser gelösten Plasmid-DNA mit 2 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdaut. Zum Einstellen der geeigneten Inkubationsbedingungen für das Enzym wurden 10 µl der entsprechenden 10-fach konzentrierten Pufferlösungen (RocheDiagnostics, Mannheim) verwendet. Anschließend erfolgte für 2 h Inkubation bei der für das betreffende Enzym erforderlichen Temperatur. Die verdaute DNA wurde durch Zugabe von 100 µl Isopropanol und anschließender Inkubation (10 min) auf Eis gefällt und dann zentrifugiert (10 min, 14000 rpm). Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette von der DNA abgenommen und verworfen. Restliches Isopropanol wurde dann an der Vakuumzentrifuge entfernt und die erhaltene DNA in 15 µl Milli-Q Wasser aufgenommen.

Ligationen von DNA-Fragmenten

In einem Gesamtansatz von 20µl wurden 10 µl der zu insertierenden DNA-Fragmente mit 1 µl des Plasmidrückgrats, 2µl 10x T₄-Ligase-Puffer, 2µl BSA Lösung (1mg/ml) und 4 µl Milli-Q Wasser unter Kühlung auf Eis gemischt. Die Ligation erfolgte dann durch Zugabe von 1 µl T₄-Ligase und und Inkubation bei 18°C über Nacht. Die Reaktion wurde danach durch 10 min Inkubieren bei 70°C abgebrochen.

2.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA Fragmente wurden nach Zugabe von DNA-Probenpuffer (1 µl auf 5 µl DNA-Lösung) in einer Flachbett-Elektrophoresekammer (Pharmacia, GNA-100/200) in 0,8 % Agarose-Gelen mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer unter Verwendung eines Längenstandards (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetrennt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einem Geldokumenter (MWG-Biotech, Ebersberg) photographiert (UV-Licht 302 nm).

2.7.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA Fragmente, die nach Präparativem Verdau mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren und eine Sequenzlänge von mehr als 300 bp besaßen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung von GeneClean II[®] Kit oder Gel Extraction Kit (Dianova, Quiagen) entsprechend dem Protokoll der Hersteller isoliert und gereinigt.

2.7.8 PCR

PCR am Pharmacia (ein Heizblock)

Für einen 100µl PCR-Ansatz unter nicht mutagenen Bedingungen wurden jeweils 1 µl (0,01µM) Primer, 2µl (10mM) dNTP-Mix, 10µl (10-fach) Taq-Polymerase-Puffer, 3µl (50mM) MgCl₂, 1µl DNA und 0,5µl Taq-Polymerase in 81,5 µl zweifach deionisiertem (Milli-Q-) Wasser verwendet (Gibbs 1991, Gibbs 1990).

Für 50 µl Ansätze zur Darstellung mutagener PCR Produkte wurden dagegen jeweils 0,5 µl (0,01µM) Primer, 5 µl (10mM) dNTP-Mix **A**, **G**, **A/G** (**A**: 2mM dATP, je 10mM dCTP, dTTP; **G**: 2mM dGTP, je 10mM dCTP, dATP, dTTP; **A/G**: 2mM dATP, dGTP, je 10mM dCTP, dTTP), 5µl (10-fach) Taq-Polymerase-Puffer, 6µl (50mM) MgCl₂, 5 µl (5 mM) MnCl₂, 0,5µl DNA und 0,5µl Taq-Polymerase in 27 µl zweifach deionisiertem (Milli-Q-) Wasser verwendet (Fromant et al. 1995, Gibbs 1991, Gibbs 1990). Nach Überschichten der

Ansätze mit Mineralöl wurde die PCR mit einem COLD-START (Polymerase wurde schon vor dem Aufheizen auf 94°C zugegeben) begonnen.

Die DNA Amplifizierung mittels PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 1 Minute 94°C
2. 1 Minute 94°C
3. 1 Minute 45°C
4. 1 Minute 72°C
5. 25 faches Wiederholen der Schritte 2.-4.

PCR am Stratagene PCR-Gerät RoboCycler 40 (vier Heizblöcke)

Für 50µl PCR-Ansätze unter nicht mutagenen Bedingungen wurden jeweils 0,5 µl (0,01µM) Primer, 1 µl (10mM) dNTP-Mix, 5 µl (10-fach) Polymerase-Puffer, 1,5 µl (50mM) MgCl₂ (für Taq-Polymerase) bzw. 1,5 µl (50 mM) MsSO₄ (für Vent-Polymerase), 0,5 µl DNA und 0,5 µl Polymerase (Taq- bzw. Vent-Polymerase) in 40,5 µl zweifach deionisiertem Wasser (Milli-Q-Wasser) verwendet (Gibbs 1991, Gibbs 1990).

Überschichten der Ansätze mit Mineralöl war nicht notwendig, da das PCR-Gerät mit einer Deckelheizung versehen war. Sämtliche PCR wurden mit HOT-START (Polymerase wurde erst dem Aufheizen des PCR-Reaktionsmediums auf 95°C zugegeben) begonnen.

Die DNA Amplifizierung mittels PCR erfolgte dabei nach folgendem Programm:

1. 3 Minuten 95°C
2. 45 Sekunden 95°C
3. 35-60 Sekunden 45°C- 66°C (entsprechend der Bindetemperatur der Primer)
4. 2 Minuten 72°C
5. 30-35 faches Wiederholen der Schritte 2.-4.
6. 5 Minuten 72°C
7. 15 Minuten 6°C

2.7.9 Reinigung von DNA Fragmenten

Die Reinigung der durch PCR amplifizierten DNA erfolgte nach dem zu verwendenden Standardprotokollen der Hersteller mit High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche

Diagnostics, Mannheim, Quiagen). DNA Fragmente, die nach Präparativem Verdau mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung von GeneClean II®Kit oder Gel Extraction Kit (Dianova, Quiagen) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.7.10 DNA Sequenzierung

Die für Sequenzierungen verwendete Plasmid-DNA wurde in *E. coli* amplifiziert über Mini-Präparations Kit (Quiagen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert und gereinigt. Zur Sequenzierung verwendete DNA-Fragmente wurden über PCR amplifiziert und über High Pure PCR Purification Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Die Sequenzierung erfolgte mittels Primerwalking

Als Primer wurden die synthetischen Oligonukleotide (siehe Tabelle 2) der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet. Nach der PCR-Reaktion wurden die DNA-Proben isoliert, gereinigt und sequenziert.

2.7.11 Verwendete Oligonukleotide

Primername	Sequenz
RENE1	5'-GAA ATA AAG GAC TTA GAG AAA TTC TGG CAA CTA TTA AAC TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'
RENE2	5'-TTT GTC AAA GGA GTG AAA AAG ACC AGA AAA GGC CTT GAC CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
RENE3	5'-GAA ACA GCT ATG ACC ATG AT-3'
RENE4	5'-GAC GGC CAG TGA ATT GTA AT-3'
RENE5	5'-ACC AGA ACA ACT ATC CGG AGT C-3'
RENE6	5'-GTT ACA TGT GAT GAA TGT ATG G-3'
RENE7	5'-AGG AAT CCT TCA TCT TCC GCC GAA AAC AAC ATA AAA ACC CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'
RENE8	5'-TTG AAA AAT AAA AAT AAA ATG AGT ATT TAA TGA AGG TGG GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
RENE11	5'-AGG AAT CCT TCA TCT TCC GCC G-3'
RENE12	5'-GAG TAT TTA ATG AAG GTG GGG C-3'
PrBW3	5'-CCA TTA ACT CTA ACT ACA TGG-3'
PrBW4	5'-GCT ACA CCT ATA AGA TTA GCA-3'
Pr-Nat-fw	5'-AAC CCG AAT TCA ATC ACG ATC CTT TCA GTT GG-3'

Pr-Nat-rev	5'-ATA AAG GAT CCC TAA ATT TTT TGA GTA CCG TAG C-3'
PrJJ11	5'-ATG AAT CAC GAT CCT TTC AGT TGG GGC AGG CCC GCA GAC TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'
PrJJ12	5'-AAT TTT TTG AGT ACC GTA GCC TTT AAT ATC CTT GGC GAA GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
PrJJ13	5'-GAG CTC CCT TAC GAC GTC ATC R-3'
PrJJ14	5'-GTA TTG ACG CTG GCG TAC TGG-3'
PrJJ15	5'-CGA GCT ACC TGC TAG GTT TCG-3'
PrJJ18	5'-ATT TCA TGT TTT CAA CTT GC-3'
PrJJ19	5'-TTT TTG AAT ATC TAG CTA CC-3'
PrJJ21	5'-ACC CAA TGC GTC TCC CTT GTC-3'
PrJJ22	5'-AAA AGC AAG GAT AAT ATT CCA CCA AAT CAG GGA CGA AGC ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'
PrJJ23	5'-AAA AGT TTC CTC GTC GAT GAT CAA GTT GTT GCT CAC GCC AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
PrJJ24	5'-CTG AGA GGC ATC TTC TTA CC-3'
PrJJ25	5'-AAC AGC GAT CGC GTA TTT CG-3'
PrJJ26	5'-GGA TCC AAA GAG CAA TAC CG-3'
PRE4 Sequenzierung 1	5'-AAT CAC GAT CCT TTC AGT TG-3'
PRE4 Sequenzierung 2	5'-TCA GAT TCT CGA TCT ACA AC-3'

Tabelle 2: Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Primer.

2.7.12 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Herstellung kompetenter Zellen

500 ml LB-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur des entsprechenden *E.coli* Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Nach 20 Minuten Eiskühlung wurden die Zellen abzentrifugiert (5 Minuten; 3000 rpm; 4°C), anschließend zweimal mit je 200 ml, dann mit 20 ml eiskalter 10 % (w/v) Glycerinlösung gewaschen und in 40 Aliquots zu je 50 µl bei -80°C eingefroren.

Elektroporation von *E.coli* Zellen

Zur Transformation wurde 1 µl isolierte Plasmid-DNA, auf unter Eiskühlung aufgetaute *E.coli* Zellen pipettiert und der Ansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Überführung in vorgekühlte Elektroporationsküvetten wurde die Transformation mit einem elektrischen Puls

(400 Ω ; 2,3 kV; 25 μ F; Gene-Pulser, Biorad) initiiert. Sofort nach der Pulsgebung erfolgte die Resuspension der Zellen in 1 ml SOC Medium. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in TE-Puffer aufgenommen, auf LB_(amp) Agarplatten (50 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Mercenier and Chassy 1988).

2.7.13 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Eine Streichholzkopf-große Menge Zellmaterial wurde zweimal mit sterilem Wasser und anschließend mit Lithiumacetat/Sorbitol (100 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 1 M Sorbitol pH 7,5) gewaschen, in 50 μ l TE/LiOAc (100 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA pH 7,5) resuspendiert, mit 2-5 μ l Plasmid DNA und 5 μ l Heringssperma DNA (10 mg/ml) versetzt und nach Zugabe von 300 μ l frisch hergestelltem 40 % igem PEG (in TE/LiOAc) sorgfältig gemischt. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 30°C, dann 15 Minuten bei 42°C inkubiert, schonend abzentrifugiert, in Wasser resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert (Gietz and Schiestl 1991, Gietz et al. 1995, Schiestl and Gietz 1989).

Kotransformationen (Integrative Transformation der beiden DNA Fragmente aus mutagener PCR bzw. verdaulichem Basisplasmid) erfolgte nach oben beschriebener Methode der Transformation. Jedoch wurden logarithmische Hauptkulturen mit einer OD₆₀₀ von 0,8-1,5 eingesetzt und jeweils 5 μ l mutagenes PCR Fragment sowie 2,5 μ l des DNA Fragments aus verdaulichem Basisplasmid verwendet. Direkt vor dem Temperaturschock wurde DMSO (5 % (v/v)) zur Erhöhung der Transformationsrate zugegeben (Takita et al. 1997).

Für Genbanktransformationen wurden ebenfalls logarithmische Hauptkulturen mit einer OD₆₀₀ von 0,8-1,5 eingesetzt. Zur Erhöhung der Transformationsrate wurde unmittelbar vor dem Temperaturschock DMSO zugefügt (5 % (v/v)).

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Denaturierende alkalische Lyse

Für eine denaturierende alkalische Lyse wurden 3×10^7 Zellen in 1 ml Wasser suspendiert, anschließend 150 μ l Lyselösung (1,85 M NaOH, 7,5 % β -Mercaptoethanol) zugegeben und nach guter Durchmischung 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 μ l 50 % TCA-Lösung zupipettiert, gemischt und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 14000 rpm) wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 500 μ l Aceton gewaschen und anschließend bei 60 °C getrocknet. Schließlich wurde das getrocknete

Pellet in 75 µl Harnstoffpuffer (40 mM Tris (pH 6,8), 8 M Harnstoff, 5 % SDS , 0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,02 % Bromphenolblau, 1 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen, 30 min bei 37 °C geschüttelt und bei –20 °C eingefroren

2.8.2 Nativer Zellaufschluß

Zur Herstellung eines Nativen Rohextraktes wurden jeweils 2×10^8 Zellen einer Flüssigkultur (logarithmisches Zellwachstum) bei 4 °C abzentrifugiert (7 min, 2000 rpm), mit 500 µl kaltem Wasser gewaschen, nochmals abzentrifugiert und anschließend in 312 µl Aufschlußpuffer resuspendiert. Dieser Aufschlußpuffer besaß folgende Zusammensetzung:

250 µl 0,5 M Tris/HCl pH 8,5

50 µl 0,5 M EDTA pH 8,0

8 µl 50 x Complete Proteaseinhibitoren (RocheDiagnostics, Mannheim)

4 µl 0,2 M PMSF (frisch bereitet in DMSO (5,5 % v/v))

Optional wurden diesem Puffer 12,5 µl Triton X-100 Lösung (10 % w/v) zugesetzt.

Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen (neutralisiert, 0,5 mm Durchmesser) wurde mindestens 10 min bei 4 °C heftig geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Der Überstand wurde sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für maximal zwei Tage aufbewahrt.

Zur Verwendung der Proteinproben in einem Affinitäts-Blotting wurden diese im Verhältnis 1:5 in TBS-T Puffer (140 mM NaCl, 40 mM Tris (pH 7,5), 0,1 % Tween 20 (Polyoxymethylensorbitan-Monolaurat)), in welchem 0,15 % w/v BSA (Sigma) gelöst worden waren, verdünnt.

2.8.3 Herstellung der Antikörper-Matrix

Zur Immobilisierung des Anti-HA-Antikörpers wurde dieser durch Amidierung kovalent an Protein-A-Sepharose gekoppelt. Hierzu wurde 1ml 10 % Protein-A-Sepharose Suspension in IPG Puffer (20 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 7,5), 1 mM EGTA, 5 % Glycerin) hergestellt (Quellzeit mind. Eine Stunde). Nach Zugabe von 500 µl Anti-HA Antikörper (0,4 µg/µl) wurde die Suspension eine Stunde bei 4°C sanft geschüttlet. Die Sepharose wurde zweimal mit 4 ml 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) gewaschen, zentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4°C) und in 4ml 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) resuspendiert. Nach Zugabe von

festem Pimelindiimidsäuredimethylester (Endkonzentration 20 mM) wurde die Suspension 30 Minuten bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert, zweimal mit 0,2 M Ethanolamin gewaschen und zwei Stunden bei Raumtemperatur in 0,2 M Ethanolamin inkubiert. Die Sepharose wurde in PBS-Puffer (53 mM Na₂HPO₄; 13mM NaH₂PO₄; 75 mM NaCl) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Zur Kontrolle der Effektivität der Kopplungsreaktion wurde je eine Probe der Sepharose vor und nach der Reaktion mit Pimelindiimidsäuredimethylester entnommen und bei 95°C in Lämmli-Puffer gelöst. Durch Auftrennung über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels erfolgte die Analyse. Das „heavy chain“ Signal bei 55 kDA sollte bei erfolgter Kopplung verschwinden (Gersten and Marchalonis 1978, Simanis and Lane 1985).

2.8.4 Immunopräzipitation unter nativen Bedingungen

Es wurden 2×10^8 Zellen bei einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 geerntet, mit kaltem Wasser gewaschen und mit 600 µl IP-Puffer (20 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 7,5), 1 mM EGTA, 5 % Glycerin; (vor Verwendung zugeben: 1 mM PMSF, 15 µl 50x complete Proteaseinhibitoren) versetzt. Für eine denaturierende Immunopräzipitation gab man 60 µl 20 % SDS Pufferlösung zu. Anschließend wurde die Suspension zusammen mit 300 µl Glasperlen 15 min bei 4 °C geschüttelt, danach mit 0,2- 1,0 % Triton-X 100 (Endkonzentration) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 min, 5000 g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 15- 50 µl Protein-A Sepharose oder Igg-Sepharose Suspension (mit α-HA Antikörper kovalent gekoppelt) versetzt und für 3-4 Stunden bei 4°C im Überkopf-Schüttler präzipitiert. Daraufhin wurden die Proben vier mal mit je 500 µl IP-Puffer gewaschen, in 50 µl Lämmli-puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt (Pereira et al. 1998).

2.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoresen wurden als diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli 1970) in *Mini-Protean II Dual Slab Cells* (Biorad, München) durchgeführt. Es wurden je Spur 7- 15 µl Proteinextrakt aufgetragen. Als Längenstandard wurden *SeeBlue Marker* (Novex) oder Precision Plus Protein Standards (Bio Rad) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 15- 20 mA pro Gel durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

2.8.6 Western-Blot

Zum Transfer der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Schleicher&Schüll, Dassel) wurden die Gele in einer *Semi-Dry Blotting*-Apparatur (Fröbel, Lindau) in Blotting-Puffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) 90 Minuten bei 70 mA pro Gel geblottet. Hierfür wurden drei Lagen mit Blotpuffer getränktes Filterpapier (Schleicher&Schüll, Dassel) vorgelegt, das SDS-Gel aufgelegt und mit der mit Blotpuffer angefeuchteten Nitrozellulose-Membran bedeckt. Anschließend wurde mit drei Lagen puffergetränktem Filterpapier abgedeckt. Nach dem Transfer wurden zur Detektion der Proteine die Membranen mit Hilfe des ECL™-Detektionssystems (Amersham, Braunschweig) entwickelt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran wurde die Membran eine Stunde bei RT mit 10 % Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T (3 mal je 10 min) wurde die Membran eine Stunde bei RT mit dem Primärantikörper behandelt. Daraufhin wurde die Membran erneut mit TBS-T gewaschen (3 mal je 10 min) und eine Stunde mit dem HRPO-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Vor der abschließenden Chemoluminiszenzreaktion mit dem ECL™-System wurde die Membran 5 mal je 5 min mit TBS-T gewaschen. Nach einminütiger Inkubation mit der frisch zubereiteten Entwicklungslösung wurde ein ECL™ Röntgenfilm belichtet, entwickelt und somit die zu detektierenden Proteine sichtbar gemacht.

2.8.7 *In situ* Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität

Steriles Rundfilterpapier wurde auf Platten mit CM-Selektivmedium gelegt und mit 1 ml Wasser benetzt, so dass das Papier luftblasenfrei auf der Agarschicht lag. Die zu testenden Hefestämme wurden darauf repliziert und 24- 48 h bei 30°C inkubiert. Das Filterpapier mit den Hefekolonien wurde abgezogen und für 30 sec in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Anschließend wurde das Filterpapier mit den Hefezellen auf der oberen Seite in einer Glasbetriebschale auf ein zweites Filterpapier gelegt, das vorher mit 3 ml Z-Puffer mit x-Gal (0,8 mM X-Gal, 0,04 mM β -Mercaptoethanol in Z-Puffer) getränkt worden war. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Filtern bilden. Inkubiert wurde solange (30 Minuten bis 12 h) bei 30 Grad Celsius, bis sich eine deutliche Blaufärbung entwickelte.

Z Puffer: 8,52 g/l Na₂HPO₄
 5,50 g/l NaH₂PO₄
 0,75 g/l KCl
 0,246g/l MgSO₄+7H₂O

X-Gal Stocklösung (20 mg/ml):

200 mg 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-Galaktopyranosid in 10 ml N,N-Dimethylformamid (DMF)

2.8.8 In situ Nachweis der Peptidyl-glutamyl-peptid spaltenden Aktivität (PGPH) des Proteasoms (Overlay-Test)

Steriles Filterpapier (Schleicher und Schuell) wurde auf YPD-Platten gelegt und mit 1 ml YPD-Medium benetzt, so dass das Papier luftblasenfrei auf der Agarschicht ruhte. Die zu testenden Hefestämme wurden darauf repliziert und 24- 48 h bei 30°C inkubiert. Der Filter wurde danach mit den Zellen nach oben in einer Petrischale aus Glas so mit wenigen Tropfen 1 %-igem Agar fixiert (1 % Agar, 50 mM Tris/HCl pH 8,0), dass keine Zellen bedeckt wurden. Anschließend wurde der Filter zum Permeabilisieren der Zellen 20 min mit Chlorform überschichtet, danach das Chloroform entfernt und der Filter getrocknet. Nach erneutem Fixieren mit 1 %-igem Agar in einer Kunststoffpetrischale wurde der Filter mit 10 ml substrathaltiger Agarose überschichtet und 4 h bei 37°C inkubiert. Durch Einfüllen von 10 ml Fast Garnet Lösung wurde dann die Entwicklung des Experiments eingeleitet. Das aus dem Substrat durch die PGPH Aktivität des Proteasoms freigesetzte β-Naphtylamid bildet unter Einwirkung der Fast Garnet Lösung einen roten Farbstoff aus (Heinemeyer et al. 1991).

Substrat-Lösung:

31,6 mg/ml Cbz-Leu-Leu-Glu-β-Naphtylamid im Dimethylsulfoxid (DMSO)

Substrat Agarose:

100 µl Substratlösung in 9,9 ml 1%-iger Agarose Lösung (1% Agarose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0)

Fast Garnet Lösung:

100 µl Fast Garnet Lösung (50 mg/ml Fast Garnet Salz in Dimethylsulfoxid)
in 9,9 ml Natriumcitratpuffer (0,2 M Natriumcitrat, 4% Tween 20, pH 4,4)

2.8.9 In situ Nachweis der chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms (Overlay-Test)

Wiederum wurde steriles Filterpapier (Schleicher und Schuell) auf YPD-Platten gelegt und mit 1 ml YPD-Medium benetzt, so dass das Papier luftblasenfrei auf der Agarschicht ruhte. Die zu testenden Hefestämme wurden darauf repliziert und 24– 48 h bei 30°C inkubiert. Der Filter wurde dann mit den Zellen nach oben in einer Petrischale aus Glas mit wenigen Tropfen 1 % Agar fixiert (1 % Agar, 50 mM Tris/HCl pH 8,0), dass keine Zellen bedeckt wurden. Anschließend wurde der Filter zum Permeabilisieren der Zellen 20 min mit Chloroform überschichtet, danach das Chloroform entfernt und der Filter getrocknet. Nach erneutem Fixieren mit 1 %-igem Agar in einer Kunststoffpetrischale wurde der Filter mit 10 ml substrathaltiger Agarose überschichtet und 3 h bei 37°C inkubiert. Durch Einfüllen von 10 ml 0,1 % Natriumnitrit Lösung , anschließend 0,5 % Ammoniumsulfamat Lösung (in 1N HCl; 5 min, RT) wurde dann die Entwicklung des Experiments eingeleitet. Das aus dem Substrat durch die chymotrypsinähnliche Aktivität des Proteasoms freigesetzte p-Nitroanilin bildet dann unter Einwirkung von 10 ml 0,05 % 1-Naphtyl-ethylendiamin in 47 % Ethanol einen violetten Azofarbstoff aus (Heinemeyer et al. 1991).

Substrat-Lösung:

10mM Cbz-Gly-Gly-Leu-pNA im Dimethylsulfoxid (DMSO)

Substrat Agarose:

100 µl Substratlösung in 9,9 ml 1%-iger Agarose Lösung (1% Agarose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0)

2.9 Physiologische Methoden

2.9.1 Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen

Die Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen erfolgte über Kreuzungsexperimente unter Verwendung der Testerstämmen 17/17 und 17/14. Diese Testerstämmen besitzen als einzigen auxotrophen Marker einen Defekt im *HIS1* Gen (*his1-123* Mutation), der auf

histidinfreiem Medium zum Zelltod führt und in keinem der sonst verwendeten Stämme auftaucht. Nur die aus der Kreuzung resultierenden diploiden Stämme sind daher in der Lage, auf aminosäurefreiem CM-Medium zu wachsen. Hierfür wurden nacheinander Abdrücke der zu testenden Stämme und der Testerstämme auf YPD-Agaroseplatten angefertigt und für einen Tag bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut Abdrücke der Stämme dieses mal auf aminosäurefreien CM-Platten angelegt und nach ein bis zwei weiteren Tagen Inkubation bei 30 °C konnte aus dem Auftreten bzw. dem Fehlen diploider Stämme auf den Paarungstyp der zu testenden Stämme geschlossen werden.

2.9.2 Kreuzung von Hefestämmen

Zur Paarung haploider Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp wurden zwei Stecknadelkopf große Mengen beider Stämme auf einer YPD-Agaroseplatte miteinander vermischt. Anschließend wurden die Zellen für 6-8 h bei 30 °C inkubiert und danach mit Hilfe eines Mikromanipulators von den übrigen Zellen abgetrennt.

2.9.4 Sporulation und Tetradendisektion

Zur Induktion der Sporulation wurde eine Stecknadelkopf große Menge von über Nacht auf einer YPD-Agarplatte herangewachsenen diploiden Hefezellen in 2 ml Sporulationsmedium suspendiert und 5-10 Tage bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop sporulierte Zellen als Tetraden zu erkennen waren. Anschließend wurden 200 µl der Sporulationskultur entnommen, abzentrifugiert (2min, 3000 rpm) und einmal mit Wasser gewaschen. Zur Lyse der Ascuswände wurden die Zellen in 200 µl Wasser resuspendiert und nach Zugabe von 1,5 µl Glusulase für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Eiswasser gestoppt und die Zellen 3-12 Stunden bei 4 °C quellen gelassen. Schließlich wurden 20 µl der Zellsuspension auf einer YPD-Platte aufgetragen und die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators dissektiert und vereinzelt.

3 Ergebnisse

Untersuchungen über „Two-Hybrid“-Experimente wiesen in einer vorausgegangenen Arbeit auf eine Wechselwirkung zwischen der proteasomalen Pre4-Untereinheit und Slk19 hin. Säulenchromatographische Experimente mit einem Slk19-GST-Fusionsprotein bestätigten anschließend die Wechselwirkung von Slk19 mit Pre4 *in vitro* (Zimmermann 1998).

Durch phänotypische Untersuchungen von Nullmutanten konnte die Beteiligung des Proteins Slk19 bei entscheidenden Schritten der Mitose (synthetische Letalität von *KAR3* deletierten *slk19* Nullmutanten) und Meiose (Bildung von Dyaden anstatt Tetraden bei der Sporulation von diploiden *slk19* Nullmutanten) nachgewiesen werden.

Die Funktion des Kinetochorproteins Slk19 sollte in dieser Arbeit weiter aufgeklärt und seine Interaktion mit der proteasomalen Untereinheit Pre4 näher untersucht werden.

Dazu sollten einerseits Ergebnisse aus einem bisher nicht verifizierten genetischen Experiment (Lisy 2000) reproduziert und ihre Bedeutung tiefgreifender untersucht werden: Beabsichtigt war dabei, einen weiteren spezifischen Nachweis der direkten Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 zu liefern. Dazu sollten mutierte *pre4* Allele erzeugt werden, durch welche die Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 blockiert wurde.

3.1 Synthetische Wechselwirkungen von *pre4* Mutanten

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Proteinen kann das Auftreten synthetischer Effekte ausgenutzt werden. Dabei weist das Auftreten synthetischer Letalität von Mutantenzellen durch Kombination zweier separat nicht letaler Mutationen auf einen direkten Zusammenhang der beteiligten Proteine hin.

3.1.1 Suche nach mutierten *pre4* Allelen mit synthetischer Letalität in *kar3* Nullmutanten

Um solche *pre4* Allele zu isolieren, durch die die Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 blockiert wird, sollte der bekannte Effekt der synthetischen Letalität, der bei Kombination von *SLK19* Deletion mit der Deletion von *KAR3* auftritt, ausgenutzt werden. Sollte die Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 wichtig für die essentielle Funktion von Slk19 bei Fehlen von Kar3 sein, sollte es möglich sein, *pre4* Allele zu erzeugen, die wie die *SLK19* Deletion einen synthetischen Effekt mit der Deletion von *KAR3* erzeugen (siehe Abb. 6)

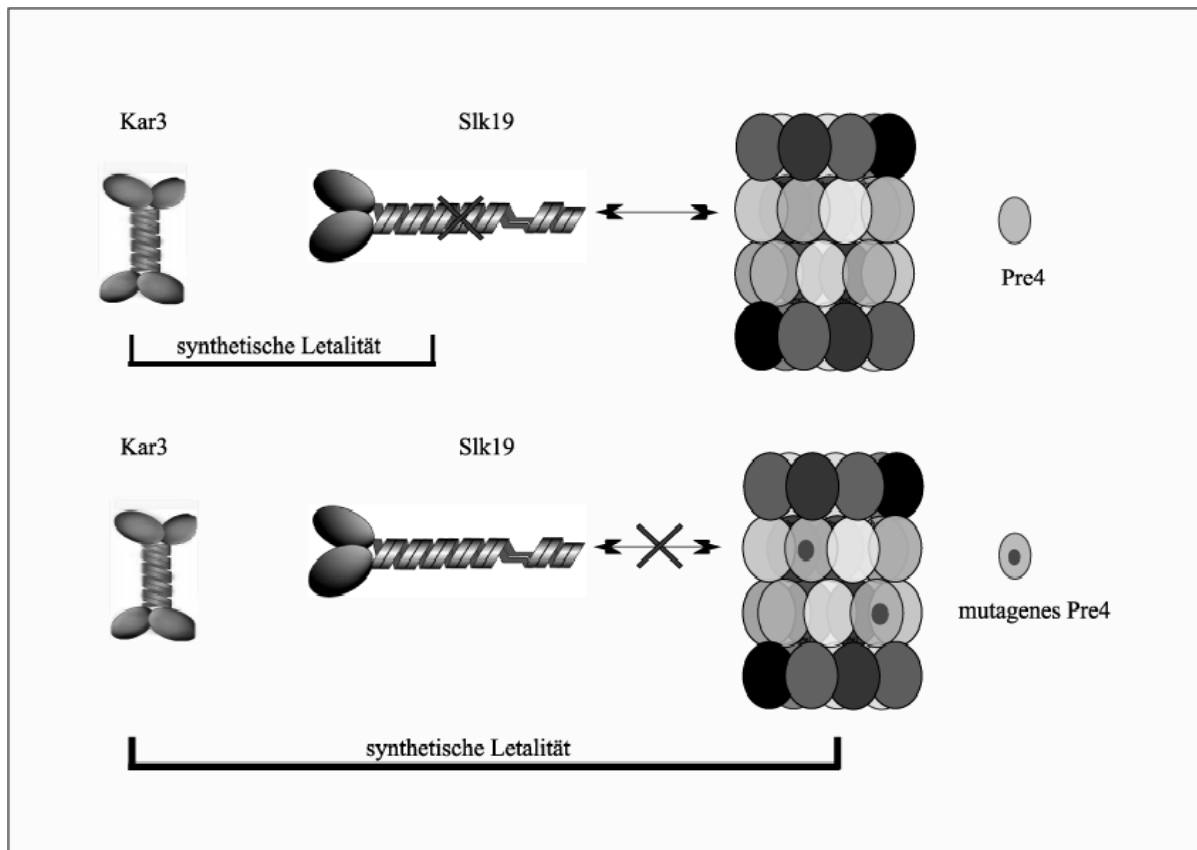


Abbildung 6: Modell des genetischen Experiments zum Nachweis der Interaktion zwischen Slk19 und Pre4. Dargestellt ist der bekannte synthetische Effekt zwischen Kar3 und Slk19 (oben). Ist die Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 wichtig für die essentielle Funktion von Slk19 in *kar3* Nullmutanten, sollten in *kar3* Nullmutanten synthetische Effekte für bestimmte, die Pre4-Slk19 Interaktion störende *pre4* Allele beobachtet werden.

Screeningmethode

Um basierend auf der im vorhergehenden Abschnitt (Abb. 6) beschriebenen Idee nach *pre4* Allelen zu suchen, die in *kar3* Nullmutanten synthetische Letalität hervorrufen, war es zunächst notwendig, einen geeigneten Stamm zu erzeugen. Dieser musste erstens den Austausch des *PRE4* Gens durch mutierte *pre4* Allele ermöglichen, und zweitens eine *KAR3* Deletion besitzen. Durch Transformieren eines Stamms mit einem Plasmid, das ein *KAR3* Wildtypgen enthielt sollte es möglich sein, die synthetisch letalen Effekte zwischen den erzeugten *pre4* Allelen und der *KAR3* Deletion zu komplementieren. Als Ausgangsstamm bot sich deshalb der Stamm YHI39/1/2 α an, der schon eine *HIS3* Deletion am *PRE4* Locus besaß und ein *PRE4* Plasmid mit einem *URA3*-Marker enthielt, das den letalen Effekt der *PRE4* Deletion kompensiert. Dieser Stamm musste nur noch dahingehend modifiziert werden, dass das *KAR3*-Gen chromosomal durch Ersatz mit einer *KAN^R*-Kassette ausgeschaltet wurde. Anschließend konnten diese Zellen mit einem *LEU2* Plasmid, das durch mutagene

Polymerasekettenreaktion (PCR) zufällig erzeugte mutagenisierte *pre4*-Sequenzen enthielt, transformiert werden. Inkubation der erhaltenen Transformanten auf 5-FOA-Medium induzierte den Verlust des *URA3*-markierten, komplementierenden *PRE4* Wildtyp Plasmids und ermöglichte dadurch, anschließend die Transformanten mit letalen *pre4*-Mutationen zu identifizieren. Zur Überprüfung, dass die Letalität der Transformanten mit dem mutierten *pre4*-Allel tatsächlich in Kombination mit der Deletion von *KAR3* auftrat, wurden diese Transformanten mit einem *HIS3* Plasmid, das ein die *KAR3* Deletion komplementierendes *KAR3*-Wildtyp-Gen enthielt, transformiert. Nach Inkubation dieser Transformanten mit dem komplementierendem *KAR3* Wildtyp Plasmid und dem *PRE4* Wildtyp Plasmid auf 5-FOA-Medium waren nur diejenigen Transformanten in der Lage zu wachsen, deren Letalität durch das *KAR3* Wildtyp Plasmid kompensiert werden konnte.

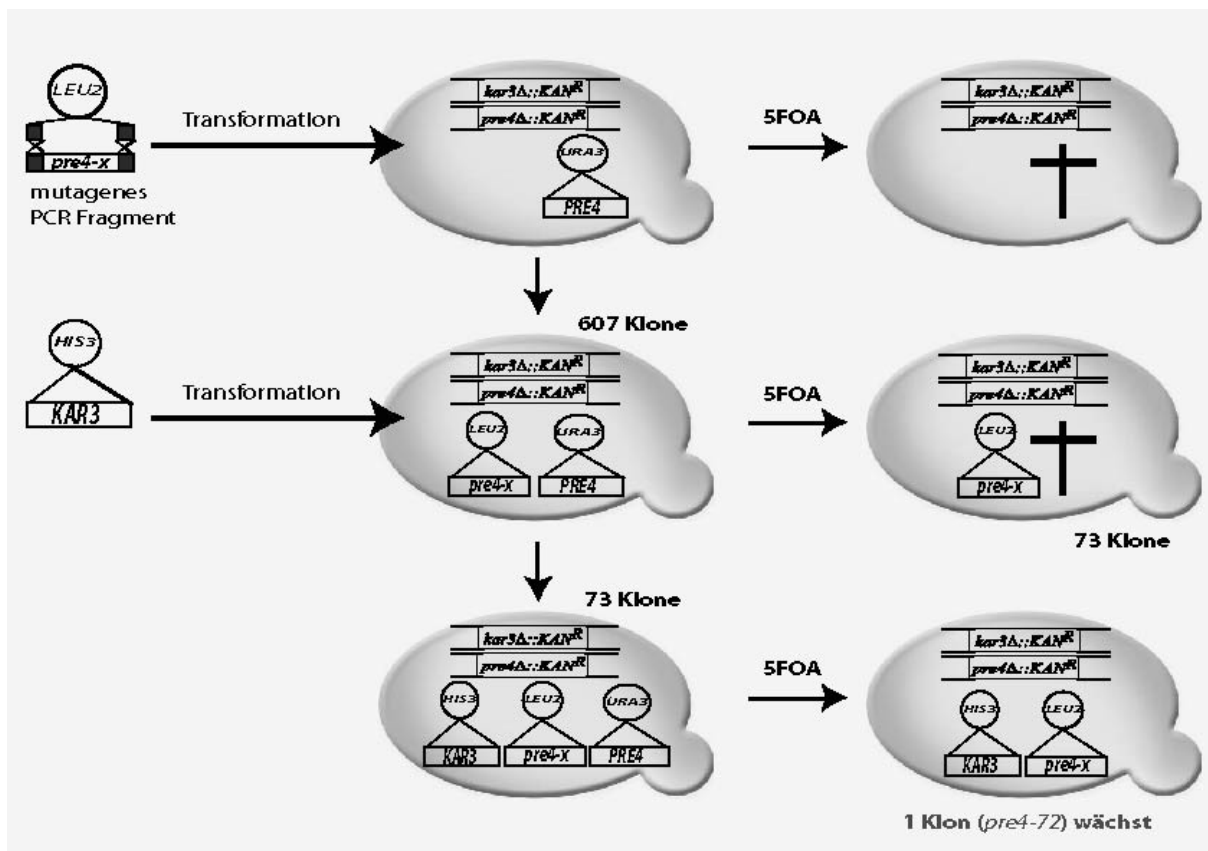


Abbildung 7: Suche nach mit der *KAR3* Deletion synthetisch letalen *pre4* Mutanten. Durch Transformation von *kar3Δ pre4Δ* [*PRE4 URA3*] Zellen mit *LEU2* markierten Plasmiden, die mutierte *pre4* Allele enthielten, wurden *pre4* Mutanten erhaltenen, die durch Ausstreichen auf 5-FOA Medium auf synthetische Letalität in Kombination mit der Deletion von *KAR3* untersucht wurden. Von den 73 durch die mutierten *pre4*-Allele letalen Klone zeigte lediglich ein Klon synthetische Letalität in Kombination mit der *KAR3*-Deletion.

Aus den Stämmen, deren *pre4* Allel in *kar3* Nullmutanten synthetische Letalität erzeugte, wurden dann die Plasmide mit dem mutierten *pre4* Allel isoliert, und deren synthetischer Effekt durch Retransformieren in *KAR3* Wildtyp und *kar3* Nullmutanten kontrolliert.

3.1.2 Erzeugung der *pre4-72* Mutanten

Um die Interaktion zwischen dem Slk19 Protein und der proteasomalen β -Typ Untereinheit Pre4 mit Hilfe von genetischen Methoden nachzuweisen, wurde ein Stamm benötigt, in welchen Mutationen des *PRE4* Gens integriert werden konnten. Aufgrund seines geeigneten Stammhintergrunds diente YHI39/1/2 α als Ausgangsstamm. Dieser Stamm besaß eine chromosomale *HIS3* Deletion am *PRE4* Locus. Da Hefen mit *PRE4* Deletion jedoch nicht lebensfähig sind, enthielt dieser Stamm ein *URA3* markiertes Plasmid mit *PRE4* Wildtyp Allel.

Kontrolle des Ausgangsstamms YHI39/1/2 α

YHI39/1/2 α Zellen wurden zunächst auf die Korrektheit des angegebenen Phänotyps getestet. Nach Ausstreichen des Stamms auf einer histidinfreien, einer uracilfreien und einer leucinfreien CM-Platte und vier Tage Inkubation bei 30 °C zeigte der Stamm die erwartete Histidin- und Uracil Prototrophie sowie die gewünschte Leucin Auxotrophie.

Zusätzlich wurde dann getestet, ob im Stamm YHI39/1/2 α durch Selektion ein Plasmidaustausch mit dem *LEU2 PRE4* Plasmid (*p15 UBE4*), das später die mutierten *pre4*-Allele tragen sollte, möglich ist. Die Transformanten, die sowohl das *URA3 PRE4* Plasmid als auch das *LEU2 PRE4* Plasmid (*p15 UBE4*) trugen, erwiesen sich sowohl auf leucinfreiem CM-Medium als auch nach Selektion auf Verlust des *URA3 PRE4* Plasmids auf 5-FOA Medium als lebensfähig.

Modifizierung des Markergens im Ausgangsstamm YHI39/1/2 α

Zur Kontrolle der Kar3 Abhängigkeit der erzeugten *pre4* Mutantenallele war es wichtig, die gefundenen letalen Mutantenstämme am Ende des Experiments mit einem *KAR3* Wildtyp Plasmid mit *HIS3* Markergen (*pMA 1428*) zu transformieren und auf histidinfreiem Medium gezielt nach Kar3-abhängig vitalen Transformanten zu selektionieren. Dazu musste jedoch das im Ausgangsstamm YHI39/1/2 α chromosomal vorhandene *HIS3* Gen im Pre4-Locus durch Austausch gegen ein *KAN* Resistenz-Gen deletiert werden.

Mit dem Plasmid *pUG6* als Matrize und den Primern RENE7 und RENE8 wurde durch PCR eine Disruptionskassette erzeugt. Anschließend wurde der Stamm YHI39/1/2 α mit diesem

PCR-Produkt transformiert und auf geneticinhaltigem Medium auf die chromosomale Integration des *KAN^R* Deletionskonstrukts selektioniert.

Von acht der erhaltenen Transformanten wurde die chromosomale DNA isoliert. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* zeigten sieben der acht verwendeten DNA-Proben in der Southern Analyse die erwarteten Fragmente von 3,2 kb und 2,6 kb, was die erfolgreiche Deletion der *HIS3*-Sequenz in den entsprechenden Transformanten bestätigte. Die Korrektheit eines dieser Klone, YRL3 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4]*), wurde durch Ausstreichen auf genithicinhaltigem, auf uracilfreiem und auf histidinfreiem Medium überprüft und für die weiteren Experimente verwendet.

Deletion von *KAR3* in YRL3 durch *KAN^R*

Wegen Vorhandensein des *KAN^R*-Markers in YRL3 war eine direkte Deletion von *KAR3* durch Integration einer entsprechenden *KAN^R*-Kassette unmöglich. Deshalb sollte das *KAR3* Deletionsallel durch Kreuzung eingeführt werden. Deshalb wurde zunächst ein *KAN^R*-Deletionskonstrukt durch Polymerasekettenreaktion mit dem Plasmid *pUG6* und den Primern RENE1 und RENE2 erzeugt. Mit dieser *KAN^R*-Deletionskassette wurde der diploide Wildtyp-Stamm WCG4a/ α transformiert und die erhaltenen Transformanten auf genithicinhaltigen Platten auf die Integration des Deletionskonstrukts getestet. Von vier der erhaltenen Transformanten wurde die chromosomale DNA isoliert und mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Die Southern-Analyse zeigte in allen vier DNA-Proben die erwarteten Fragmente von 6,7 kb und 5,1 kb, was bedeutet, dass die Deletion der *KAR3*-Sequenz erfolgreich war.

Die Negativkontrolle einer DNA-Probe von WCG4a/ α wies erwartungsgemäß keine Fragmente einer *KAN^R* Disruptionskassette auf. Ein korrekter Klon, YRL2 (*MAT α /MAT α his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3- Δ ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R*), wurde für die weiteren Experimente verwendet.

Um haploide Zellen mit *KAR3*-Deletion zur Kreuzung mit YRL3 zu erhalten wurden YRL2 Zellen dann sporuliert und die entstandenen Tetraden auf YPD Medium mit einem Mikromanipulator vereinzelt. In allen dissektierten Tetraden konnte nach Ausstreichen auf genithicinhaltigen Platten eine 2:2 Segregation des Kanamycinmarkers festgestellt werden. Nach Bestimmung des Paarungstyps mit Hilfe der beiden Testerstämme 17/14 und 17/17 wurden zwei Stämme mit gegensätzlichem Geschlechtstyp, die beide die *KAN^R* Disruptionskassette am *KAR3* Locus besaßen, isoliert. Der Stamm mit dem Geschlechtstyp

MAT α , YRL5 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R*), sowie der Stamm mit dem Geschlechtstyp *MAT α* , YRL6 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R*), wurden für die weiteren Experimente verwendet.

Um nun Mutanten zu erzeugen, die sowohl die Deletion von *KAR3* als auch die Deletion von *PRE4* mit dem komplementierendem *PRE4* Wildtyp Plasmid besaßen, wurde der Stamm YRL3 gegen YRL5 gekreuzt. Nach Sporulation des erhaltenen heterozygot diploiden Stamms YRL10 (*MAT α /MAT α his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3- Δ /ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4]*) wurden die entstandenen Tetraden auf YPD-Platten dissektiert. Wie für *kar3* Mutanten in der entsprechenden Literatur beschrieben, konnten deutliche Sporulationsprobleme festgestellt werden (Bascom-Slack and Dawson 1997). Dazu zählen Bildung einer hohen Zahl von Dyaden und Triaden im Vergleich zu den erwarteten Tetraden, wie sie auch bei diploiden *slk19 Δ* Stämmen auftreten, was ein Indiz für die Beziehung zwischen *Pre4* und *Slk19* ist. Zusätzlich konnte eine erhöhte Letalität der dissektierten Tetradensporen verzeichnet werden. Aus 154 dissektierten Tetraden konnte in lediglich sieben Fällen eine komplette Tetrade mit vier vitalen Sporen gefunden werden. Sämtliche Tetraden wurden auf genithicinhaltiges und auf uracilfreies Medium replikaplatziert, um sie auf Kanamycinresistenz und die Präsenz des Plasmids [URA3 PRE4] zu kontrollieren. 20 Sporen mit den gewünschten Eigenschaften wurden dann auf die Anwesenheit der KAN^R-Marker sowohl am *PRE4* Locus als auch am *KAR3* Locus getestet. Dazu wurde die chromosomale DNA dieser Stämme isoliert und in einer Polymerasekettenreaktion mit den Primern RENE5 und RENE6 zur Kontrolle des *KAR3* Locus, und mit den Primern RENE11 und RENE12 zur Kontrolle des *PRE4* Locus amplifiziert. Die Kontrolle mit Hilfe der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte, dass nur zwei der 20 untersuchten Sporen die entsprechenden DNA-Fragmente von 1775 bp und 1675 bp gleichzeitig aufwiesen. Vollständiger Nachweis dieses Ergebnisses wurde in einer Southern Analyse der DNA-Proben der beiden Stämme erbracht. Anschließend Prüfung der Stämme auf den Geschlechtstyp mit den beiden Testerstämmen 17/14 und 17/17 erwies, dass beide Klone, YRL11 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4]*) und YRL12 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4]*), von unterschiedlichem Geschlechtstyp waren.

Erzeugung und genomische Integration mutagener *PRE4* Sequenzen

Willkürlich mutierte Allele der für die proteasomale Untereinheit *Pre4* kodierenden Gen-Sequenz wurden mittels PCR unter mutagenen Bedingungen und Verwendung des *PRE4*

Wildtyp Plasmids *p15 E4* (W. Heinemeyer) als Matrizen-DNA sowie den Primern RENE3 und RENE4 erzeugt. Die erhaltenen 1,6 kb großen PCR Produkte wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft, aus dem Gel isoliert, über das Gel-Extractions-Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers gereinigt und zu einem einzigen Produkt vereinigt. Um daraus Plasmide mit den *pre4* Mutantenallelen zu erzeugen, wurde die Methode der homologen Rekombination verwendet. Dazu wurde zunächst ein geeignetes *LEU2* markiertes Plasmid *p15 UBE4* (W. Heinemeyer) mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *BamHI* geschnitten und nach der elektrophoretischen Auftrennung das Fragment (Backbone) mit der Größe von 6,3 kb aus dem Agarose-Gel isoliert. Anschließend wurden die Stämme YRL11 und YRL12 mit dem Produkt der PCR und dem isolierten Backbone co-transformiert und auf leucinfreiem Medium selektioniert. Dadurch konnten die Transformanten identifiziert werden, bei denen die Reparatur der *LEU2* Plasmide durch homologe Rekombination der mutierten PCR Fragmente mit dem Backbone erfolgt war. Insgesamt wurden 607 auf leucinfreiem Medium vitale Klone erhalten, die dann auf 5-FOA haltiges Medium replikaplatziert wurden. Dadurch konnten diejenigen Klone selektioniert werden, die nach Verlust des *PRE4* Wildtyp Plasmids letalen *pre4*-Mutationen besaßen. Für das Auftreten der Letalität bestanden mehrere Möglichkeiten. Einerseits konnte die Rekonstitution eines *LEU2* tragenden Plasmids ohne Integration der *pre4* Allels erfolgt sein, was dann unbedingt die Anwesenheit des *PRE4* Wildtyp Plasmids mit dem *URA3* Marker erforderte. Andererseits musste für Kandidaten, die ein *pre4* Allel enthaltendes Plasmid trugen, zwischen zwei Möglichkeiten unterschieden werden. Dazu zählte erstens das Auftreten solcher Klone, die ein allgemein letales *pre4* Allel enthielten, und zweitens die gesuchten Klone, bei denen die Letalität vom Fehlen des *KAR3* Gens abhing. Unter den 607 Klonen befanden sich nach Ausstreichen auf 5-FOA Medium dann insgesamt 73 letale Kandidaten.

Kontrolle der mutagenen *PRE4* Sequenzen

Um zu überprüfen, ob die Letalität der erhaltenen 73 *pre4* Mutanten mit dem Fehlen des *KAR3* Gens zusammenhing, wurden diese mit dem Plasmid *pMA 1428 [KAR3 HIS3]* zur Komplementation des *Kar3Δ* Defekts transformiert. Zur Selektion der Transformanten wurden die Zellen auf leucin- und histidinfreiem Medium ausplattiert. Dabei gelang es jedoch bei zwei Klonen nicht, Transformanten zu erhalten. Von den erfolgreich transformierten Stämmen wurden je zwei Klone auf 5-FOA Medium ausgestrichen. Ein Klon, bei dem die durch das mutierte *pre4* Allel erzeugte Letalität nur in Kombination mit der *KAR3* Deletion auftritt, sollte nach Transformation in der Lage sein, das komplementierende *PRE4* Wildtyp

Plasmid zu verlieren; d.h. die gesuchten Klone konnten daran erkannt werden, dass nach Transformation mit *KAR3* Plasmiden das Wachstum auf 5-FOA Medium möglich war. In den beiden anderen Fällen, d.h. generell letales *pre4* Allel bzw. Missintegration in das Plasmid-Backbone, wären die Transformanten weiterhin auf dem 5-FOA Medium nicht lebensfähig. Unter allen untersuchten Klonen fand sich schließlich ein einzelner Stamm, YRL13 (*MAT α his3-11,15 leu2-3,112 ura3- Δ kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]*), mit einem mutierten *pre4* Allel (*pre4-72*), das die gewünschten Eigenschaften aufwies. YRL14, in Transformant von YRL13 mit dem Plasmid *pMA 1428 [KAR3 HIS3]*, war nach Ausstreichen auf 5-FOA Medium und Verlust des [URA3 PRE4] Plasmids in der Lage, auf 5-FOA Medium zu wachsen. Anschließend wurden die beiden Stämme YRL13 und YRL14 zur Kontrolle nochmals auf ihre Phänotypen hin untersucht. (siehe Abb. 8).

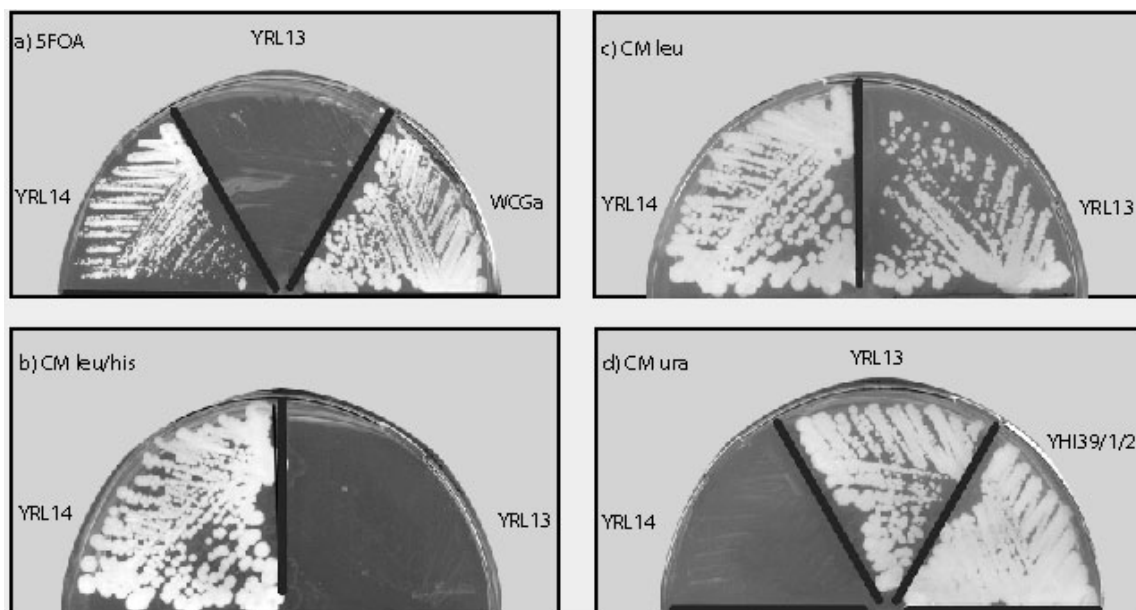


Abbildung 8: Das *pre4-72* Allel zeigt synthetische Letalität mit einer *KAR3* Deletion. Die Stämme YRL13 (*kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]*) und YRL14 (*kar3 Δ ::KAN^R pre4 Δ ::KAN^R [LEU2 pre4-72][HIS3 KAR3]*) wurden a) auf 5-FOA Medium, b) auf leucinfreiem- und histidin Medium, c) auf leucinfreiem Medium und d) auf uracilfreiem Medium ausgestrichen und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Nach Transformation mit einem *KAR3 HIS3* Plasmid sind *pre4-72* Klone wieder in der Lage, das komplementierende *PRE4* Wildtyp Gen zu verlieren und auf 5-FOA zu wachsen (a).

3.1.3 Reproduktion der auf *pre4-72* basierenden synthetischen Letalität

Methodik

Als weitere Kontrolle sollte der synthetisch letale Effekt des *pre4-72* Allels mit der *KAR3*-Deletion direkt durch Retransformation in *KAR3* Wildtyp Zellen und *Kar3 Δ* Zellen nachvollzogen werden. Nach Isolierung des Plasmids mit dem *pre4-72* Allel aus YRL14 und

Retransformieren in die Stämme YRL3 (*KAR3* Wildtyp) und YRL 12 (*kar3Δ::KAN^R*) sollten, die Transformanten durch Ausstreichen auf 5-FOA und den dadurch initiierten Verlust des *URA3 PRE4* Plasmids die synthetische Letalität des *pre4-72* Allels mit der *KAR3*-Deletion bestätigen.

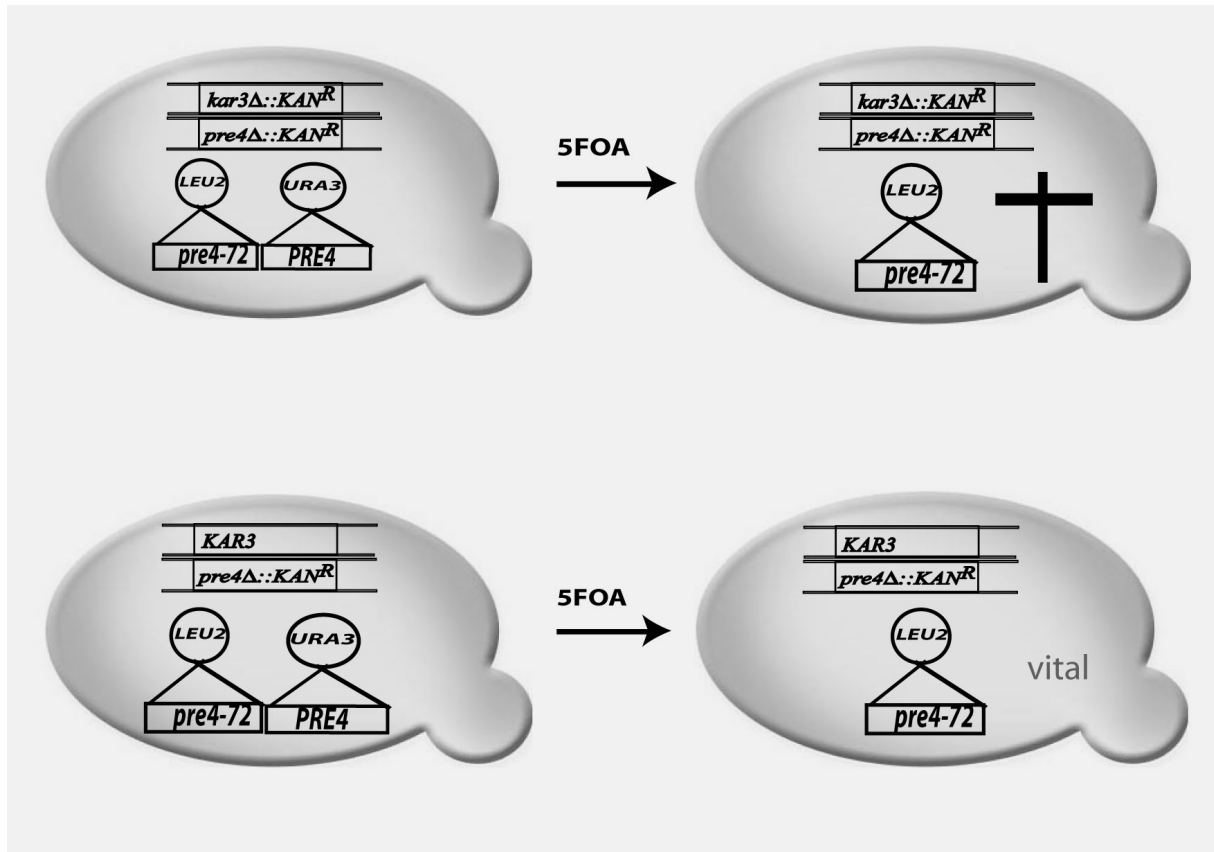


Abbildung 9: Methode zur Reproduktion des synthetisch letalen Effekts von *kar3* und *pre4-72* Mutanten. In *pre4Δ* Zellen (YRL3) und *pre4Δ kar3* Doppelmutanten (YRL12) die jeweils ein komplementierendes *PRE4 URA3* Plasmid enthielten, wurden mit dem *pre4-72LEU2* Plasmid *pJJ14/1* transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend auf Verlust des *PRE4* Wildtyp Plasmids durch Ausstreichen auf 5-FOA Medium überprüft. Wie erwartet zeigen nur *KAR3* Wildtyp Zellen Überlebensfähigkeit bei Verlust des *PRE4* Plasmids.

Isolierung des *pre4-72* Plasmids

Die im erzeugten Hefestamm YRL14 enthaltenen Plasmide wurden durch die Plasmid-Rescue Methode isoliert und die entsprechende Plasmid DNA nach Amplifizieren in *E. coli* über die „boiling-mini-prep“ Methode isoliert. Bei der Restriktionsanalyse von insgesamt sechzehn DNA Proben durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *NcoI* sowie anschließender Agarose-Gelelektrophorese konnten elf als Plasmide mit mutiertem *pre4* Allel (erwartete Fragmente bei 0,4 kb, 0,6 kb und 6,4 kb) und fünf als *pMA1428* (*HIS3* markiertes

Plasmid mit *KAR3* Wildtyp Gen) identifiziert werden. Das Plasmid mit dem *pre4-72* Allel, das für die weiteren Untersuchungen Verwendung fand, wurde im weiteren mit *pJJ14/1* bezeichnet.

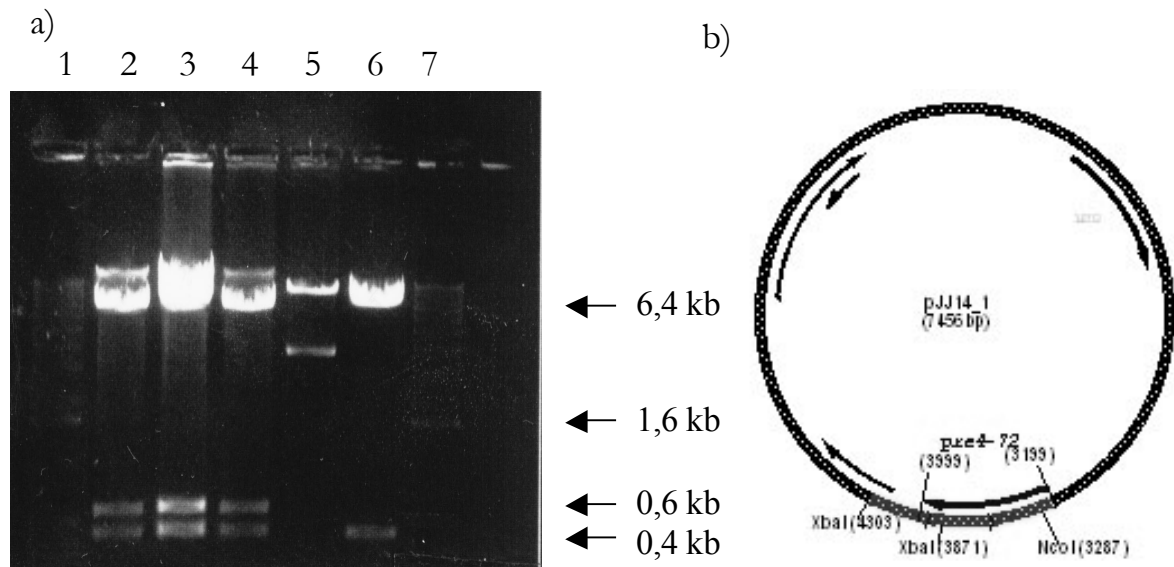


Abbildung 10: Kontrolle von drei aus YRL14 Zellen isolierten Plasmiden durch Verdau mit *XbaI* und *NcoI*. (a) UV-Fotographie der Gelelektrophorese. Spur1: 1kb DNA-Marker; Spur2: *pJJ14/1*; Spur3: *pJJ14/10*; Spur4: *pJJ14/14*; Spur5: Kontrollplasmid *pMA 1428*; Spur6: Kontrollplasmid *p15 UBE4*; Spur7: 1kb DNA-Marker; (b) Plasmidkarte von *pJJ14/1* mit den Restriktionsschnittstellen von *XbaI* und *NcoI*.

Retransformation der *pre4-72* Plasmide bestätigt synthetische Letalität mit *kar3Δ*

Um die *pre4-72* Plasmide auf synthetische Letalität mit der *KAR3* Deletion zu testen, wurde versucht, den gefundenen synthetisch letalen Effekt in *kar3* Nullmutanten und *KAR3* Wildtyp Zellen nachzuvollziehen. Dafür wurden die Stämme YRL12 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]*) und YRL3 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]*) mit dem Plasmid *pJJ14/1* transformiert und die Transformanten auf leucin- und uracilfreiem CM-Medium selektiert. Für den Nachweis der synthetischen Letalität von *pre4-72* in Kombination mit der Deletion von *KAR3* wurden die erhaltenen Transformanten YJJ11 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]*) und YJJ13 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]*) verwendet und auf 5-FOA-haltigen Medienplatten ausgestrichen.

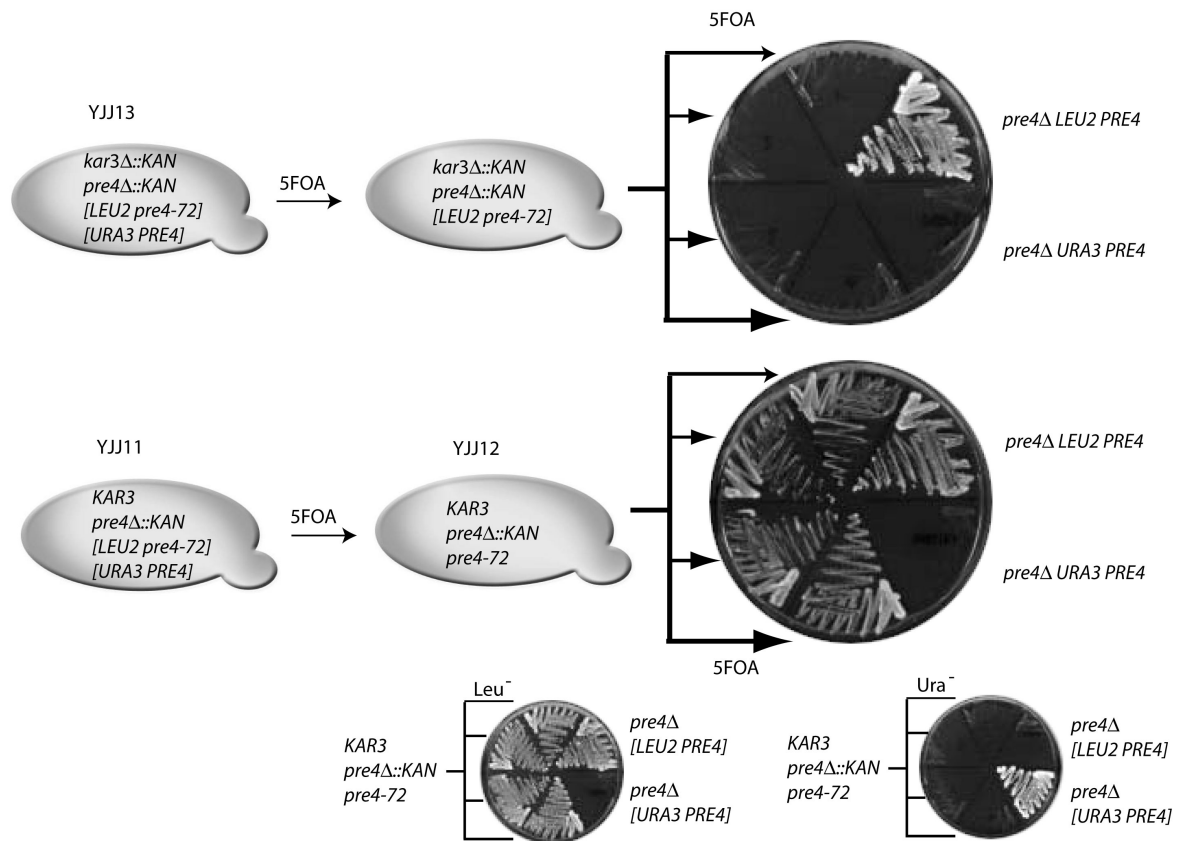


Abbildung 11: Bestätigung der synthetischen Letalität des *pre4-72* Allels mit der *KAR3* Deletion. 4 Klone der Stämme YJJ11 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-72]*) und YJJ13 (*KAR3 pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]*) wurden zusammen mit den Kontrollstämmen yHI38/1/1 (*pre4Δ::HIS3 [Leu2 PRE4]*) und yHI39/1/2 (*pre4Δ::HIS3 [URA3 PRE4]*) auf 5-FOA Medium ausgestrichen und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Die auf 5-FOA gewachsenen Klone wurden zur Kontrolle der auxotrophen Marker der integrierten Plasmide zusammen mit den Kontrollstämmen yHI38/1/1 (*pre4Δ::HIS3 [Leu2 PRE4]*) und yHI39/1/2 (*pre4Δ::HIS3 [URA3 PRE4]*) auf leucinfreiem Medium und auf uracilfreiem Medium ausgestrichen.

Die YJJ11 Transformanten waren aufgrund des vorhandenen, komplementierenden *LEU2 pre4-72* Plasmids in der Lage sein, das Plasmid [*URA3 PRE4*] zu verlieren, und deshalb auf 5-FOA wachsen. Die Unfähigkeit des Wachstums von YJJ13 Zellen nach Verlust des Plasmids [*URA3 PRE4*] (keine Kolonienbildung auf 5-FOA Medium) konnte damit eindeutig auf die synthetische Letalität der Kombination von *pre4-72* und *kar3Δ* zurückgeführt werden. Somit konnte die synthetische Letalität der *KAR3* Deletion mit dem *pre4-72* Allel eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 11).

3.1.4 Lokalisierung der *pre4-72* Mutationen

Aufklärung der *pre4-72* Sequenz

Zur Aufklärung, welche Mutationen für den synthetisch letalen Effekt des *pre4-72* Plasmids mit der *KAR3* Deletion verantwortlich sind, wurde die Plasmid-DNA von *pJJ14/1* in *E. coli* amplifiziert, über eine Mini-Präparation isoliert und gereinigt. Nach DNA-Konzentrationsbestimmung über eine Messung der optischen Dichte bei 260 nm am UV-Spektrometer wurde die präparierte DNA-Probe zur Sequenzierung mittels Einstrangsequenzierung in Auftrag gegeben. Der zu sequenzierende Bereich umfasste den kompletten offenen Leserahmen des *PRE4* Gens. Das Ergebnis der Sequenzierung (siehe Abb. 12 und Tabelle 3) zeigte, dass im *pre4-72* Allel drei Basen ausgetauscht sind, die zu drei Punktmutationen in der Sequenz von nicht prozessiertem Pre4 führen.

Punktmutationen von <i>pre4-72</i>	Basenaustausch <i>PRE4</i> / <i>pre4-72</i>	Position des Basenaustauschs in der DNA-Sequenz	Aminosäureaustausch <i>Pre4</i> / <i>pre4-72</i>	Position des Aminosäureaustauschs in der Proteinsequenz
1	T - A	60	Asparagin - Lysin	20
2	A - T	277	Methionin - Leucin	93 (52)
3	T - A	548	Methionin - Lysin	183 (142)

Tabelle 3: Übersicht über die gefundenen Punktmutationen im *pre4-72* Allel. Angegeben sind die ausgetauschten Basen und ihre jeweiligen Positionen im *PRE4* ORF und die resultierenden Positionen der Punktmutationen der Aminosäuresequenz von nicht prozessiertem Pre4 sowie prozessiertem Pre4 (in Klammern).

Durch Prozessieren der Pro-Sequenz von Pre4 während des Aufbaus des Proteasoms kommt es jedoch zur Entfernung einer 41 Aminosäuren umfassenden Sequenz am N-Terminus von Pre4. Dabei wird auch die erste der drei Punktmutationen in Position 20 entfernt, sodass diese Punktmutation im gereiften Pre4 und im Proteasomenkomplex keine Bedeutung mehr haben dürfte. Das Hauptaugenmerk bei den anschließenden Experimenten wurde daher verstärkt auf die zwei Punktmutationen M93L und M183K (M52L/M142K) im reifen Pre4 Protein gelegt.

1 ATG AAT CAC GAT CCT TTC AGT TGG GGC AGG CCC GCA GAC TCT ACT TAT GGT
TAC TTA GTG CTA GGA AAG TCA ACC CCG TCC GGG CGT CTG AGA TGA ATA CCA
1 Met Asn His Asp Pro Phe Ser Trp Gly Arg Pro Ala Asp Ser Thr Tyr Gly

NlaIII (90-93)
NcoI

52 GCT TAC AAa ACA CAA ATT GCG AAC GCA GGC GCC TCT CCC ATG GTT AAT ACA
CGA ATG TTt TGT GTT TAA CGC TTG CGT CCG CGG AGA GGG TAC CAA TTA TGT
18 Ala Tyr Lys Thr Gln Ile Ala Asn Ala Gly Ala Ser Pro Met Val Asn Thr

103 CAG CAA CCA ATA GTA ACA GGT ACT TCC GTC ATA TCA ATG AAA TAT GAT AAT
GTC GTT GGT TAT CAT TGT CCA TGA AGG CAG TAT AGT TAC TTT ATA CTA TTA
35 Gln Gln Pro Ile Val Thr Gly Thr Ser Val Ile Ser Met Lys Tyr Asp Asn

154 GGG GTT ATC ATT GCA GCA GAT AAT TTA GGT TCA TAT GGC TCT CTT CTA AGA
CCC CAA TAG TAA CGT CGT CTA TTA AAT CCA AGT ATA CCG AGA GAA GAT TCT
52 Gly Val Ile Ile Ala Ala Asp Asn Leu Gly Ser Tyr Gly Ser Leu Leu Arg

205 TTC AAT GGC GTG GAG AGG CTT ATT CCC GTG GGT GAT AAC ACC GTT GTG GGC
AAG TTA CCG CAC CTC TCC GAA TAA GGG CAC CCA CTA TTG TGG CAA CAC CCG
69 Phe Asn Gly Val Glu Arg Leu Ile Pro Val Gly Asp Asn Thr Val Val Gly

256 ATT TCA GGT GAT ATT TCT GAT tTG CAA CAC ATT GAG AGA TTA TTG AAA GAT
TAA AGT CCA CTA TAA AGA CTA aAC GTT GTG TAA CTC TCT AAT AAC TTT CTA
86 Ile Ser Gly Asp Ile Ser Asp Leu Gln His Ile Glu Arg Leu Leu Lys Asp

307 CTA GTC ACT GAA AAT GCG TAT GAC AAT CCT CTA GCG GAT GCT GAA GAA GCG
GAT CAG TGA CTT TTA CGC ATA CTG TTA GGA GAT CGC CTA CGA CTT CTT CGC
103 Leu Val Thr Glu Asn Ala Tyr Asp Asn Pro Leu Ala Asp Ala Glu Glu Ala

NlaIII (396-399)

358 CTC GAA CCC AGC TAT ATT TTT GAA TAT CTA GCT ACC GTC ATG TAC CAG CGA
GAG CTT GGG TCG ATA TAA AAA CTT ATA GAT CGA TGG CAG TAC ATG GTC GCT
120 Leu Glu Pro Ser Tyr Ile Phe Glu Tyr Leu Ala Thr Val Met Tyr Gln Arg

```

409 AGA TCA AAG ATG AAT CCA CTT TGG AAT GCC ATC ATT GTT GCT GGT GTA CAG
    TCT AGT TTC TAC TTA GGT GAA ACC TTA CGG TAG TAA CAA CGA CCA CAT GTC
137▶ Arg Ser Lys Met Asn Pro Leu Trp Asn Ala Ile Ile Val Ala Gly Val Gln
-----
460 TCT AAT GGT GAT CAA TTC CTA AGA TAC GTA AAT CTT CTA GGT GTT ACG TAT
    AGA TTA CCA CTA GTT AAG GAT TCT ATG CAT TTA GAA GAT CCA CAA TGC ATA
154▶ Ser Asn Gly Asp Gln Phe Leu Arg Tyr Val Asn Leu Leu Gly Val Thr Tyr
-----
511 TCG TCT CCC ACC TTG GCC ACA GGT TTT GGG GCA CAC AaG GCA AAC CCA CTG
    AGC AGA GGG TGG AAC CGG TGT CCA AAA CCC CGT GTG TtC CGT TTG GGT GAC
171▶ Ser Ser Pro Thr Leu Ala Thr Gly Phe Gly Ala His Lys Ala Asn Pro Leu
-----
562 TTA AGG AAA GTT GTA GAT CGA GAA TCT GAT ATT CCA AAG ACC ACT GTA CAG
    AAT TCC TTT CAA CAT CTA GCT CTT AGA CTA TAA GGT TTC TGG TGA CAT GTC
    ←
188▶ Leu Arg Lys Val Val Asp Arg Glu Ser Asp Ile Pro Lys Thr Thr Val Gln
-----
613 GTT GCT GAA GAG GCG ATC GTA AAT GCA ATG AGA GTT CTT TAT TAT AGA GAT
    CAA CGA CTT CTC CGC TAG CAT TTA CGT TAC TCT CAA GAA ATA ATA TCT CTA
205▶ Val Ala Glu Glu Ala Ile Val Asn Ala Met Arg Val Leu Tyr Tyr Arg Asp
-----
664 GCC CGT TCT TCT AGA AAC TTC TCA CTG GCC ATA ATT GAT AAG AAC ACA GGT
    CGG GCA AGA AGA TCT TTG AAG AGT GAC CGG TAT TAA CTA TTC TTG TGT CCA
222▶ Ala Arg Ser Ser Arg Asn Phe Ser Leu Ala Ile Ile Asp Lys Asn Thr Gly
-----
                                NlaIII (747-750)
715 TTA ACT TTC AAG AAA AAC TTG CAA GTT GAA AAC ATG AAA TGG GAC TTC GCC
    AAT TGA AAG TTC TTT TTG AAC GTT CAA CTT TTG TAC TTT ACC CTG AAG CGG
    ←
239▶ Leu Thr Phe Lys Lys Asn Leu Gln Val Glu Asn Met Lys Trp Asp Phe Ala
-----
766 AAG GAT ATT AAA GGC TAC GGT ACT CAA AAA ATT TAG
    TTC CTA TAA TTT CCG ATG CCA TGA GTT TTT TAA ATC
256▶ Lys Asp Ile Lys Gly Tyr Gly Thr Gln Lys Ile ...
    →

```

Abbildung 12: DNA-Sequenz (oben) und Proteinsequenz (unten) von *pre4-72*. Die Auswertung der Sequenzierung wurde mit dem Computerprogramm DNA-Strider vorgenommen. Die Darstellung der Sequenz erfolgte mit dem Computerprogramm Gene Construction Kit. Zusätzlich angezeigt sind die drei Restriktionsschnittstellen von *NlaIII*, die eine Unterscheidung gegenüber dem *PRE4* Wildtyp Allel (vier *NlaIII* Schnittstellen im *PRE4* ORF gegenüber drei im *pre4-72* Allel) zulassen, durch Verdau von PCR-Fragmenten (amplifiziert zwischen den als blaue Pfeile angezeigten Primern PrJJ18 und PrJJ19). Primer für die Sequenzierung der isolierten Mutationen in den Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* sind als grüne Pfeile angezeigt. Ausgetauschte Basen gegenüber *PRE4* sind als kleine blaue Buchstaben in der DNA Sequenz (große, rote Buchstaben) markiert.

Lokalisierung im Protein und im Proteasomenkomplex

Durch Veranschaulichen der zwei Punktmutationen M52L und M142K im gereiften Pre4 Protein und Integration im gesamten Proteasomenkomplex konnte nunmehr untersucht werden, ob eine Beeinflussung der Wechselwirkung von Pre4 mit Slk19 durch diese Mutationen plausibel ist. Dazu wurden die Punktmutationen in einer dreidimensionalen Darstellung des Proteins Pre4 (siehe Abb. 13) und in den beiden Pre4 Untereinheiten des Proteasoms (siehe Abb. 14) gekennzeichnet, die auf Röntgenstrukturdaten des 20S Proteasoms aus der PDB-Datenbank basieren (Groll et al. 2000).

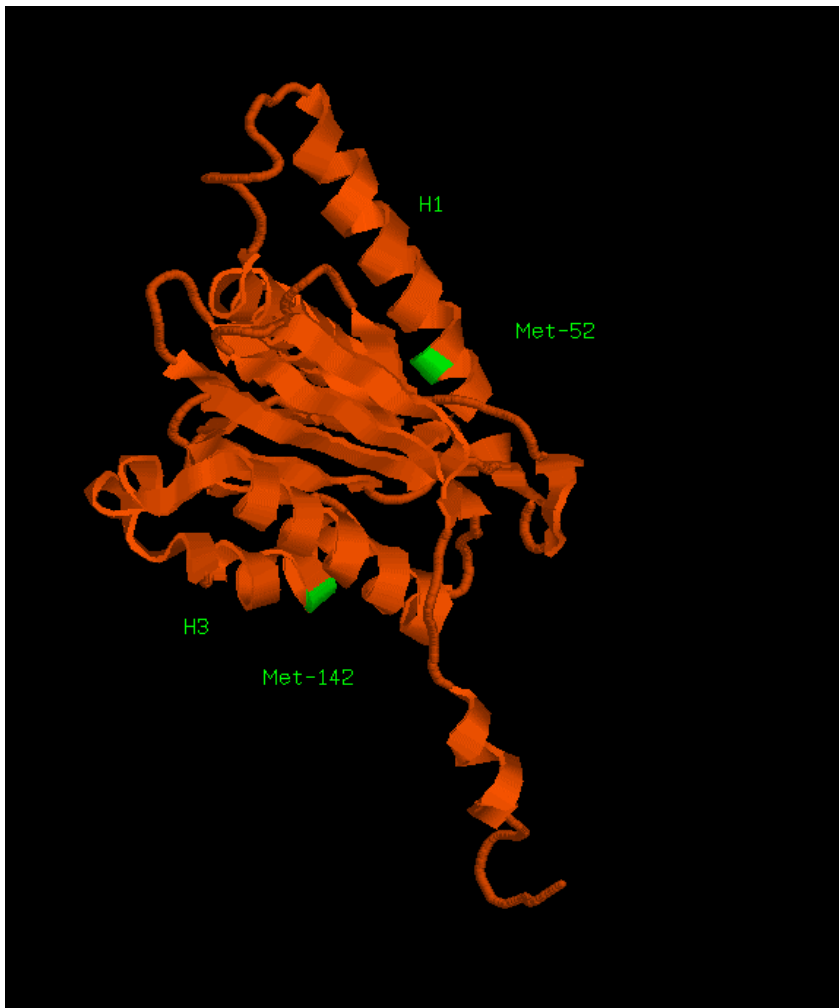
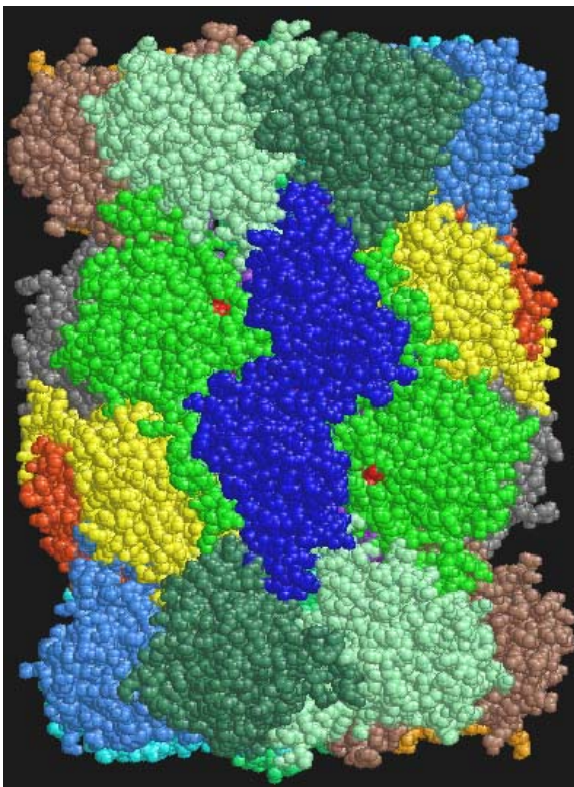


Abbildung 13: Struktur der Pre4 Untereinheit des Proteasoms mit Positionen der *pre4-72* Mutationen.

Die Darstellung der Proteinstruktur erfolgte mit dem Computerprogramm RasMol unter Verwendung der Röntgenstrukturdaten für die Pre4 Untereinheit. Die Position der Punktmutationen M52L in Helix 1 (H1) und M142K in Helix 3 (H3) im Pre4 Protein sind grün gekennzeichnet.

In der dreidimensionalen Darstellung des Proteins Pre4 zeigte sich, dass die Punktmutationen M52L in Helix 1 (H1) und M142K in Helix 3 (H3) im Pre4 Protein lokalisiert sind (Abb. 13). Des weiteren konnte durch das Markierung der beiden Aminosäuren im dreidimensionalen Schaubild des Proteasoms unter Anzeige von Atomradien festgestellt werden, dass die beiden Punktmutationen an der Oberfläche des Proteasomenkomplexes zugänglich sind. Dieser Befund unterstützt weiter die Hypothese der Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 in *pre4-72* Mutanten (siehe Abb.14a, b).

a)



b)

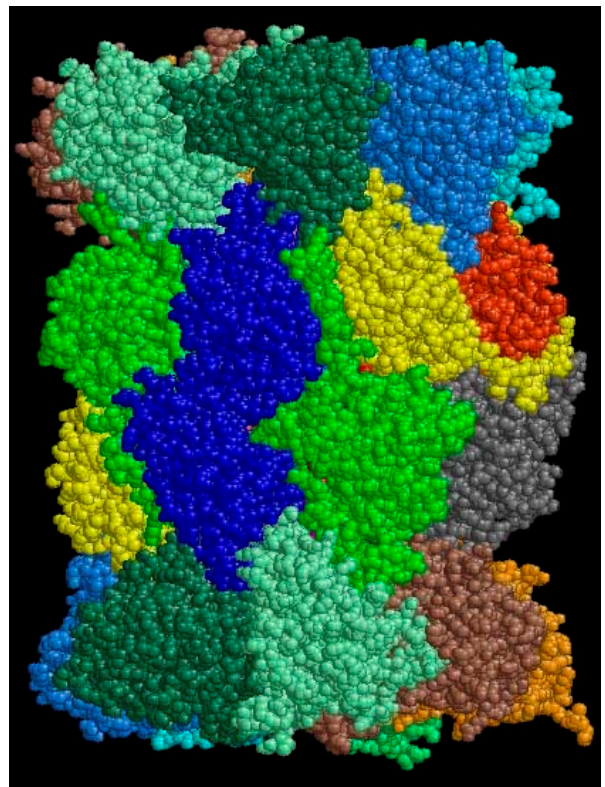


Abbildung 14: Struktur des 20S Proteasoms mit Positionen der *pre4-72* Mutationen. Die Darstellung der Proteinstruktur erfolgte mit dem Computerprogramm RasMol unter Verwendung der Röntgenstrukturdaten für das 20S Proteasom der Hefe *S. cerevisiae*. Die Positionen der Punktmutationen M52L und M142K in den beiden grünen Pre4 Untereinheiten sind durch Rotfärbung markiert. Gezeigt ist die seitliche Sicht auf das Proteasom aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln (a)/(b).

Betrachtet man sich die Punktmutationen genauer, so könnte diskutiert werden, dass der Austausch der neutralen Aminosäure Methionin mit der schwach polaren Methionyl-Seitenkette, durch das basische Lysin in Position 142 gegenüber dem Austausch durch das neutrale Leucin in Position 52, mit seiner unpolaren Seitenkette unterschiedlich starke

Auswirkungen bezüglich der Störung der Slk19-Pre4 Interaktion haben können. Deshalb erschien es sinnvoll, den Einfluss der einzelnen Mutationen auf die Wechselwirkung von Slk19 mit Pre4 anhand der synthetischen Effekte bei Kombination mit *kar3Δ* näher zu untersuchen.

3.1.5 Synthetische Effekte von *pre4-72* Einzelmutationen

Die aus der Sequenz von *pre4-72* und den Strukturdaten gewonnen Erkenntnisse über die Lokalisierung der Punktmutationen erforderten, den Einfluss der einzelnen Mutationen für das Auftreten der synthetischen Letalität mit der *KAR3* Deletion zu untersuchen. Unter Verwendung einer Restriktionsverdau- und Ligationstrategie erfolgte die Isolierung der drei Mutationen von *pre4-72* (siehe Abb.15):

Isolierungsstrategie der *pre4-72* Mutationen

Basis der Isolierung bildeten die beiden Vektoren *p15 E4 (PRE4)* und *pJJ14/1 (pre4-72)*, beide Vektoren sind bis auf die Mutationen im *PRE4*-ORF identisch. Durch Ausschneiden eines 0,4 kb großen DNA-Fragments mit dem Restriktionsenzym *XbaI* und anschließende Religation konnten die beiden Basisvektoren *p15 E4* und *pJJ14/1* um ein 0,4 kb *XbaI* Fragment verkürzt werden. Die verkürzten Vektoren *pJJ14/1x* und *p15 E4x* machen die Analyse der nachfolgend durch Insertion von Fragmenten entstandenen Konstrukte eindeutig; durch Verdau mit *XbaI* kann die korrekte Integration der DNA-Fragmente über die wieder auftretende 0,4 kb große *XbaI* Bande überprüft werden. Durch Integration des 0,8 kb großen *BglIII/NotI* DNA-Fragments (enthält M142K zwischen *BglIII* und *XbaI*) aus *pJJ14/1 (pre4-72)* in den mit *BglIII/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *p15 E4x* konnte dann das gewünschte Plasmid *pJJ15 (pre4-142)* mit der Mutation M142K erhalten werden. Durch Integration des 0,8 kb großen *BglIII/NotI* DNA-Fragments aus *p15 E4 (PRE4)* in den mit *BglIII/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *pJJ14/1x* wurde das gewünschte Plasmid *pJJ16 (pre4-60)* mit den Mutation N20L, M52L erhalten. Durch Integration des 0,9 kb großen *NdeI/NotI* DNA-Fragments aus *pJJ16* in den mit *NdeI/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *p15 E4x* konnte dann das gewünschte Plasmid *pJJ17 (pre4-52)* mit der Mutation M52L erhalten werden (siehe Abb. 15).

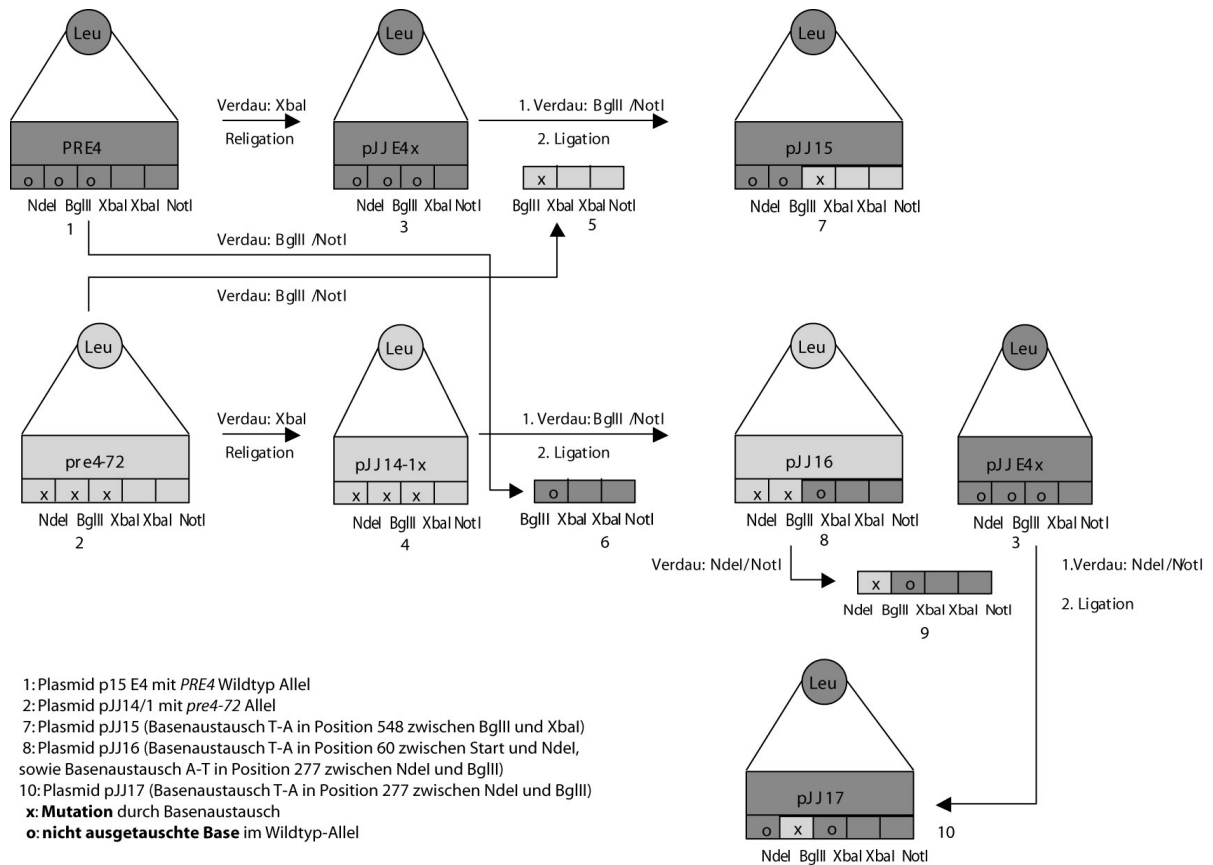


Abbildung 15: Strategie zur Isolierung der *pre4-72* Mutationen auf den Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* bzw. *pJJ17*.

Kontrolle der klonierten verkürzten Vektoren *p15 E4x* und *pJJ14/1x*

Nach Ausschneiden eines 0,4 kb großen DNA-Fragments mit dem Restriktionsenzym *XbaI* und anschließende Religation konnten die beiden Basisvektoren *p15 E4* und *pJJ14/1* um ein 0,4 kb *XbaI* Fragment verkürzt worden. Zur Überprüfung der korrekten Integration der DNA Fragmente wurden jeweils 15 DNA-Proben von *p15 E4x* und *pJJ14/1x* mit *XbaI* verdaut. In 12 Proben der Religationen aus *p15 E4* und in 10 Proben der Religationen aus *pJJ14/1* konnte das Fehlen des 0,4 kb großen Fragments festgestellt werden. Mit den Plasmiden *pJJ14/1x-1* und *p15 E4x-1* wurde weiter gearbeitet (siehe Abb. 16).

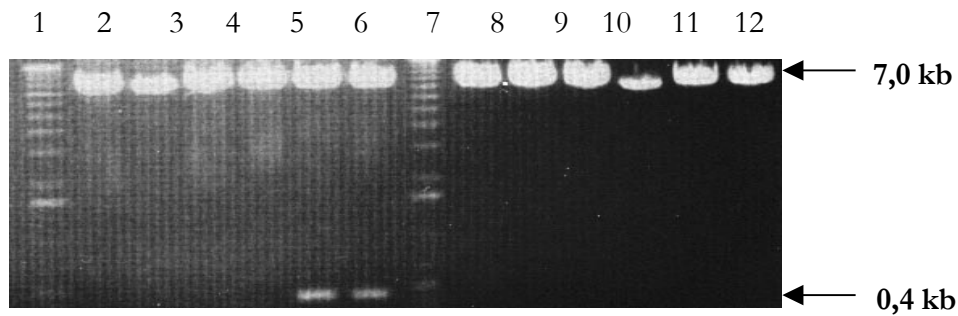


Abbildung 16: Probeverdau der verkürzten Plasmide *pJJ14/1x* und *p15 E4x* nach der Ligation. Spur 1 und 8: 1 kb Marker; Spur 2-7: *pJJ14/1x-1*, *pJJ14/1x-2*, *pJJ14/1x-3*, *pJJ14/1x-4*, *pJJ14/1x-5*, *pJJ14/1x-6*; Spur 9-14: *p15 E4x-1*, *p15 E4x-2*, *p15 E4x-3*, *p15 E4x-4*, *p15 E4x-5*, *p15 E4x-6*; die Plasmide *pJJ14/1x-1-4* und die Plasmide *p15 E4x-1-6* zeigen wie gewünscht nur das 7 kb Fragment; *pJJ14/1x-5* und *pJJ14/1x-6* zeigen zusätzlich das 0,4 kb Fragment und sind somit nicht verkürzt.

Klonierung von *pJJ15* und *pJJ16*

Durch Integration des 0,8 kb großen *BglIII/NotI* DNA-Fragments (enthält M142K zwischen *BglIII* und *XbaI*) aus *pJJ14/1* (*pre4-72*) in den mit *BglIII/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *p15 E4x* war das gewünschte Plasmid *pJJ15* (*pre4-142*) mit der Mutation M142K erhalten worden. Durch Integration des 0,8 kb großen *BglIII/NotI* DNA-Fragments aus *p15 E4* (*PRE4*) in den mit *BglIII/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *pJJ14/1x* war das gewünschte Plasmid *pJJ16* (*pre4-60*) mit den Mutation N20L, M52L kloniert worden.

Zur Überprüfung der korrekten Integration der DNA-Fragmente wurden DNA-Proben von *pJJ15* und *pJJ16* jeweils mit *XbaI* verdaut. Die Plasmide *pJJ15/8* und *10*, sowie *pJJ16/2*, *6* und *8* zeigten die erwarteten zwei DNA-Fragmente bei 0,4 kb (432 bp) und 7 kb (siehe Abb.17). Für die weiteren Versuche wurden *pJJ15/8* und *10*, sowie *pJJ16/6* und *8* verwendet.

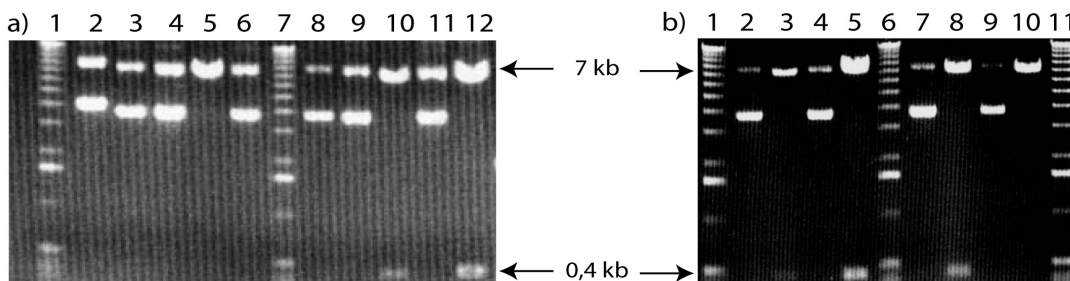


Abbildung 17: Probeverdau der Plasmide *pJJ15* und *pJJ16* mit dem Enzym *XbaI*. (a) Spur 1 und 7: 1kb Marker, Spur 2: *pJJ15/1*, Spur 3: *pJJ15/2*, Spur 4: *pJJ15/3*, Spur 5: *pJJ15/4*, Spur 6: *pJJ15/5*, Spur 8: *pJJ15/6*, Spur 9: *pJJ15/7*, Spur 10: *pJJ15/8*, Spur 11: *pJJ15/9*, Spur 12: *pJJ15/10*; die Plasmide *pJJ15-8* und *pJJ15/10* zeigen die erwarteten Fragmente bei 7 kb für das Backbone und 0,4 kb für das Insert; (b) Spur 1, 6 und 11: 1kb Marker, Spur 2: *pJJ16/1*, Spur 3: *pJJ16/2*, Spur 4: *pJJ16/3*, Spur 5: *pJJ16/6*, Spur 7: *pJJ16/7*, Spur 8: *pJJ16/8*,

Spur 9: *pJJ16/9*, Spur 10: *pJJ16/10*; die Plasmide *pJJ16/2*, *pJJ16/6* und *pJJ16-8* zeigen die erwarteten Fragmente bei 7 kb für das backbone und 0,4 kb für das Insert.

Klonierung von *pJJ17* (10)

Durch Integration des 0,9 kb großen *NdeI/NotI* DNA-Fragments aus *pJJ16* in den mit *NdeI/NotI* geöffneten verkürzten Vektor *p15 E4x* konnte dann das gewünschte Plasmid *pJJ17* (*pre4-52*) mit der Mutation M52L erhalten werden. Zur Überprüfung der korrekten Integration der DNA-Fragmente wurden DNA-Proben von *pJJ17* mit *XbaI* verdaut. Die Plasmide *pJJ17/6-9* sowie *pJJ17/8-5* und *pJJ17/8-9* zeigten die erwarteten zwei DNA-Fragmente bei 0,4 kb (432 bp) und 7 kb.

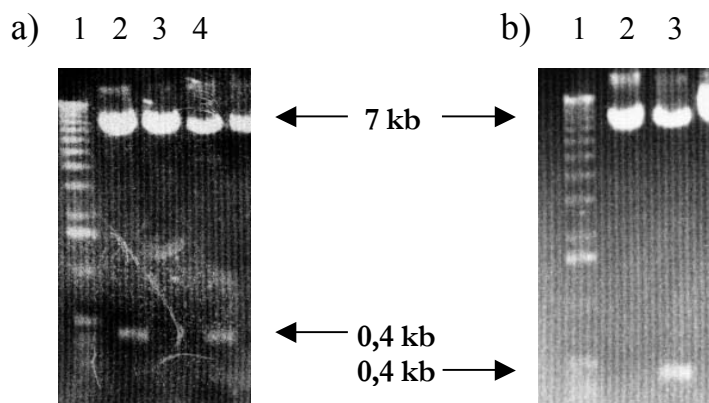


Abbildung 18: Kontrollverdau der Plasmide *pJJ17/6* und *pJJ17/8* mit dem Enzym *XbaI* (a) Spur 1: 1kb Marker, Spur2: *pJJ17/8-5*, Spur3: *pJJ17/8-8*, Spur4: *pJJ17/8-9*; die Plasmide *pJJ17/8-5* und *pJJ17/8-9* zeigen die erwarteten Fragmente bei 7 kb für das backbone und 0,4 kb für das Insert. (b) Spur 1: 1kb Marker, Spur2: *pJJ17/6-8*, Spur3: *pJJ17/6-9*; das Plasmid *pJJ17/6-9* zeigte die erwarteten Fragmente bei 7 kb für das backbone und 0,4 kb für das Insert.

Sequenzanalyse der Plasmide *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17*

Zur Bestätigung der Korrektheit der Plasmide *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Der sequenzierte Bereich umfasste den Teilbereich des offenen Leserahmens des *PRE4* Gens, in dem die vereinzelt Punktmutationen lokalisiert waren. Es wurden dafür die Primer „PRE4-Sequenzierung-1“ und „PRE4-Sequenzierung-2“ verwendet. Das Ergebnis der Sequenzierung bestätigte die erwarteten Sequenzen in den Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* und ist in Tabelle 4 (unten) nochmals zusammengefasst:

Plasmid	Bezeichnung des integrierten <i>pre4</i> -Allels	Basenaustausch <i>PRE4</i> / <i>pre4-72</i>	Position des Basenaustauschs	Punktmutationen <i>Pre4</i> / <i>pre4-72</i>
<i>pJJ15</i>	<i>pre4-142</i>	T - A	548	Met142Lys
<i>pJJ16</i>	<i>pre4-60</i>	A - T	60, 277	Asn20Lys, Met52Leu
<i>pJJ17</i>	<i>pre4-52</i>	A - T	277	Met52Leu

Tabelle 4: Übersicht über die integrierten Punktmutationen in den Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17*. Angegeben sind die ausgetauschten Basen bzw. veränderten Aminosäuren und ihre jeweiligen Positionen im *PRE4* ORF. Die Position der Punktmutation Asn20Lys bezieht sich auf die nicht prozessierte Aminosäuresequenz von Pre4, während sich die Positionen der Punktmutation Met52Lys und Met142Leu auf das prozessierte Pre4 im Proteasom beziehen.

Einzelmutationen von *pre4-72* zeigen keine synthetische Letalität mit *kar3Δ*

Zur Aufklärung der Rolle einzelner Mutationen von *pre4-72* beim Auftreten synthetischer Effekte sollte unter Verwendung der Plasmide *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* der synthetische Effekt in *KAR3* Wildtyp Zellen und in Zellen mit der Deletion von *KAR3* untersucht werden (vergleichbar dem Vorgehen bei 3.1.2). Dies konnte wiederum durch Transformieren der Plasmide in die Stämme YRL3 (mit chromosomal integriertem *KAR3*) und YRL 12 (mit chromosomal deletiertem *KAR3* Gen) erreicht werden, da in den beiden Stämmen wiederum die Möglichkeit bestand, durch Plasmidaustausch über die 5-FOA Methode das *URA3 PRE4* Plasmid durch die *LEU2* Plasmide *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* zu ersetzen.

Die Stämme YRL12 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]*) und YRL3 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4]*) wurden mit dem Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* transformiert und die Transformanten auf leucin- und uracilfreiem CM-Medium selektiert. Die Transformanten mit Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* in YRL3 wurden mit YJJ25 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-142]*), YJJ26 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-60]*) und YJJ27 (*pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-52]*) bezeichnet. Die von YRL 12 abstammenden Transformanten erhielten den Namen YJJ29 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-142]*), YJJ30 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-60]*) und YJJ31 (*kar3Δ::KAN^R pre4Δ::KAN^R [URA3 PRE4][LEU2 pre4-52]*). Ausstreichen der erhaltenen Transformanten YJJ25-YJJ27 bzw. YJJ29-YJJ31 auf 5-FOA Medienplatten ermöglichte dann die Untersuchung der in Abhängigkeit von *KAR3* bzw. *kar3Δ* auftretenden Effekte.

Die Transformanten YJJ25-YJJ27 sollten aufgrund der integrierten *LEU2* Plasmide *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* in der Lage sein, das Plasmid [*URA3 PRE4*] zu verlieren und deshalb auf 5-FOA wachsen. Für den Fall, dass in den YJJ29-YJJ31 Transformanten jeweils von dem *pre4* Allel abhängige synthetische Effekte nach dem Verlust des [*URA3 PRE4*] Plasmids auftraten, waren diese ausschließlich auf das Fehlen von Kar3 zurückführbar.

Alle Stämme mit *KAR3* Deletion YJJ29-YJJ31 waren nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C in der Lage, auf 5-FOA zu wachsen. Im Vergleich zur Positivkontrolle (*pre4Δ::HIS3* [*LEU2 PRE4*]) traten zwar unterschiedlich stark ausgeprägte Wachstumseffekte bei YJJ29, YJJ30 sowie YJJ31 auf. Doch im Vergleich mit den relevanten *KAR3* Wildtyp Kontrollen YJJ25-YJJ27 war kein Wachstumsunterschied feststellbar.

Die aus dem *pre4-72* Allel erhaltenen Mutationen zeigten nach Trennung und Expression von den Plasmiden *pJJ15*, *pJJ16* und *pJJ17* folglich keine synthetische Letalität oder synthetische Wachstumseffekte mit der *KAR3* Deletion.

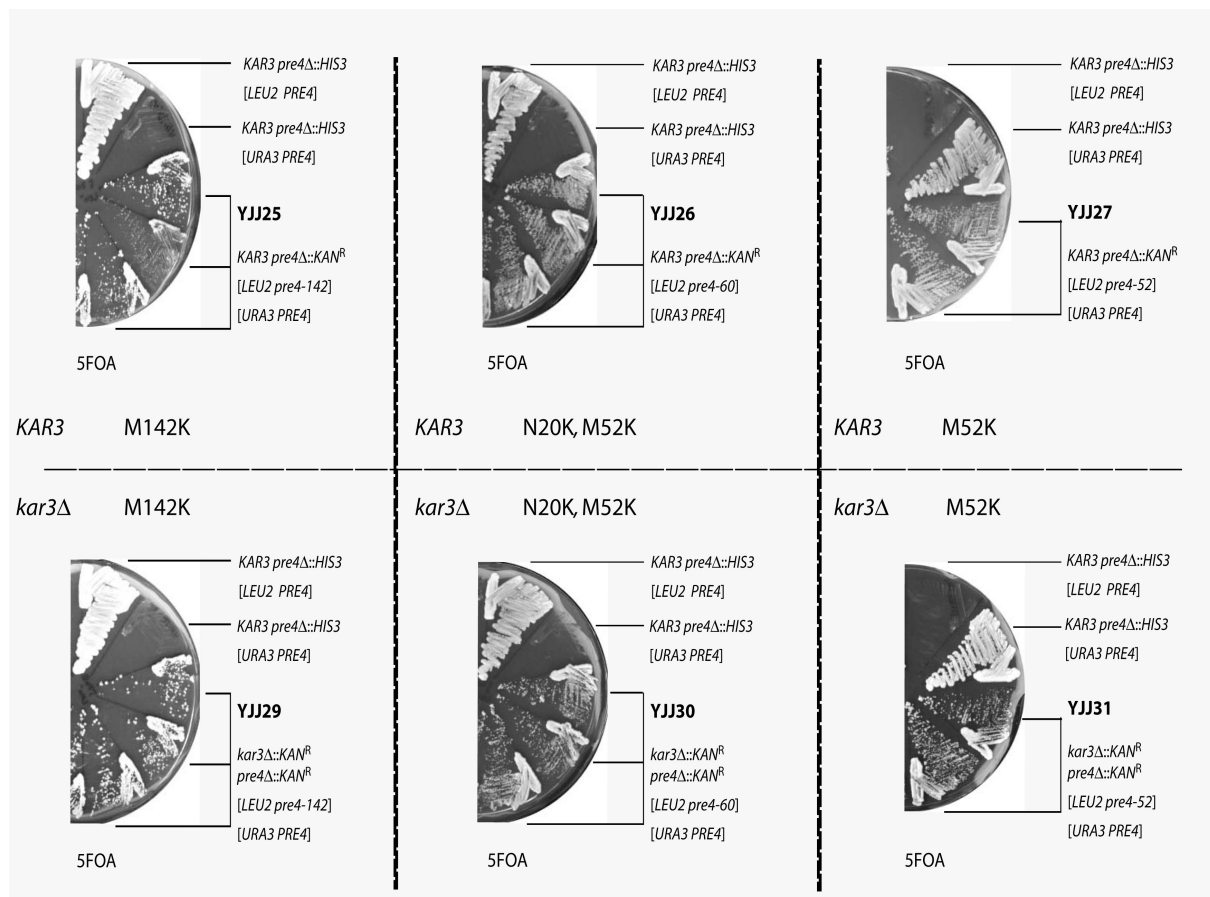


Abbildung 19: Untersuchung der synthetischen Effekte der isolierten *pre4-72* Einzelmutationen. 4 Klone der Stämme YJJ25-27 und YJJ29-31 wurden zusammen mit den Kontrollstämmen yHI38/1/1 (*pre4Δ::HIS3* [*Leu2 PRE4*]) und yHI39/1/2 (*pre4Δ::HIS3* [*URA3 PRE4*]) auf 5-FOA Medium ausgestrichen und 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Für das Auftreten der synthetischen Letalität in *kar3Δ pre4-72* Mutanten war demnach nicht eine einzelne Mutation verantwortlich; es wurden alle im *pre4-72* Allel vorhandene Mutationen für die Ausprägung der synthetischen Letalität benötigt. Da im Proteasomenkomplex nur die prozessierte Form von Pre4 vorkommt, kann die synthetische Letalität letztlich auf die Kombination der zwei Punktmutationen M52L und M142K zurückgeführt werden. In den beiden Klonen YJJ25 und YJJ29, die das Plasmid *pJJ15* [*LEU2 pre4-142*] besaßen, konnte ein ausgeprägtes, unabhängig von *KAR3* bzw. *kar3Δ* auftretendes Wachstumsdefizit festgestellt werden, was allgemein auf eine wichtigere Bedeutung der Punktmutation M142K im Vergleich zu den anderen hinwies. Betrachtete man zusätzlich *pre4-142* Mutanten und in YRL14, die *pre4-72* Mutante mit komplementierendem *KAR3* Plasmid, so konnte in beiden Stämmen einähnlich verlangsamtes Wachstum festgestellt werden. Es ließ sich daher diskutieren, dass das Wachstumsdefizit von *pre4-72* Mutanten gegenüber Wildtypzellen auf Effekten der *pre4-142* Mutation beruhen könnte.

3.1.6 Einfluss von *pre4-72* in Mitose und Meiose

Um zu vergleichen, in wie weit *pre4-72* induzierte Defekte einer vollständigen Deletion von *SLK19* ähneln, wurden Phänotypen von *slk19Δ* Mutanten in den entsprechenden *pre4-72* Mutanten nachvollzogen. Dadurch konnte der Zusammenhang zwischen der Slk19-Pre4 Wechselwirkung und dem Fehlen von Slk19 in diesen Mutanten untersucht werden. Viele der bekannten Slk19 Phänotypen beruhen dabei auf Segregationsfehlern während der Mitose und Meiose, die auf der Destabilisierung der Spindelfasern beruhen. Um zu vermeiden, dass die durch *pre4-72* erzeugten Defekte durch erhöhte *pre4-72* Expression, beruhend auf der Steigerung der Plasmid Kopienzahl, beeinflusst wurden, sollten neben Plasmid-kodierten *pre4-72* Zellen auch chromosomal kodierte *pre4-72* Mutanten untersucht werden. Dazu war die Integration des *pre4-72* Allels am chromosomalen *PRE4*-Lokus nötig.

Chromosomale Integration von *pre4-72* am *PRE4*-Lokus eines mit *KI-URA3* deletierten Hefestamms

Die Integration der *pre4-72* Mutationen am *PRE4*-Lokus sollte über einen gezielten Genaustausch („one step gen replacement“) erfolgen. Dabei sollte über eine Gegenselektionsstrategie ein am *PRE4* lokalisiertes *URA3*-Markergen durch Integration des *pre4-72* Allels wieder ersetzt werden. Da *PRE4*-Deletionen in haploiden Zellen zum Zelltod führen, wurden diploide Wildtypzellen (WCG) verwendet und mit einem *URA3*-Deletionskonstrukt aus *Kluyveromyces lactis* (*KI-URA3*) transformiert. Das 2 kb große *KI-*

URA3-Deletionskonstrukt war vorher durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Plasmid *pL079* als Matrize und den Primern PrJJ11 und PrJJ12 erzeugt worden (siehe Abb.20).

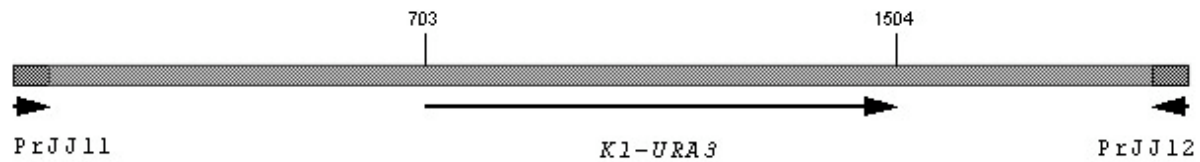


Abbildung 20: Schematische Darstellung des *pre4Δ::KI-URA3* Deletionskonstrukts. Das Deletionskonstrukt wurde durch PCR mit dem Plasmid *pL079* als Matrize und den Primern Pr JJ11 und PrJJ12 erzeugt. PrJJ11 besitzt in 5'-3'Richtung eine homologe Sequenz zu den ersten 40 Basen von *PRE4*, während PrJJ12 die komplementäre Sequenz zu den letzten 40 Basen von *PRE4* vor dem Stopkodon in 5'-3' Richtung des Gegenstrangs besitzt (Pfeilspitzen zeigen jeweils die 5'-3' Leserichtung der Primer und des *KI-URA3* Gens an).

Die Verwendung des *KI-URA3*-Deletionskonstrukts hatte dabei den Vorteil, die nicht erwünschte Integration des Konstrukts in den mutierten *URA3* Locus des Wildtypstamms zu vermeiden. Bei der Verwendung von *S. cerevisiae* eigenen *URA3*-Deletionskonstrukten besteht die Möglichkeit der Reintegration durch homologe Rekombination in die mutierte *URA3*-Sequenz anstatt der Integration am *PRE4*-Lokus. Die erhaltenen Transformanten wurden dann auf uracilfreien Medienplatten auf die Integration der *URA3*-Deletionskonstrukte selektioniert. Eine weitere Kontrolle der erzeugten heterozygot *pre4Δ* diploiden Stämme (*pre4Δ::KI-URA3/PRE4*) erfolgte durch PCR Kontrolle. Dazu wurden außerhalb des Deletionskonstrukts in den *PRE4* flankierenden Regionen liegende Primern PrJJ13/PrJJ15 sowie der im *KIURA3*-Konstrukt bindende Primer PrJJ14 verwendet. PCR mit den Primern PrJJ13 und PrJJ15 mit chromosomaler DNA aus den heterozygot deletierten Diploiden als Matrize sollte dann zwei Fragmente amplifizieren: Zum einen das 1,4 kb große Fragment mit dem nicht deletierten *PRE4* und zum anderen das 2,6 kb große Fragment mit dem integrierten *KI-URA3* Allel. Bei Verwendung der Primerpaare PrJJ13/PrJJ14 und PrJJ14/PrJJ15 wurde für das Deletionsallel ein 1 kb großes Fragment und für die *PRE4* Wildtypsequenz kein PCR Fragment erzeugt. Nach insgesamt 5 Ansätzen konnten 22 Transformanten auf uracilfreiem Medium selektioniert werden von denen dann ein Klon (YJJ22) auch die erforderlichen Eigenschaften der PCR Kontrolle erfüllte (Abb. 21).

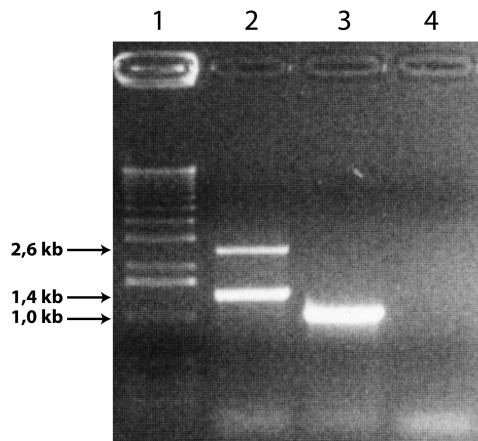
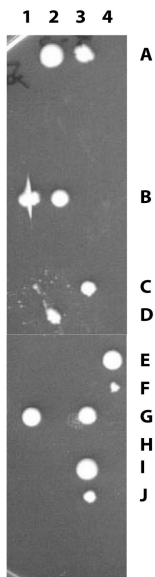


Abbildung 21: Elektrophorese der PCR-Kontrolle von YJJ22. Spur 1: 1kb Marker, Spur2: PCR der chromosomalen DNA von YJJ22 mit den Primern PrJJ13 und PrJJ15, Spur 3: PCR der chromosomalen DNA von YJJ22 mit den Primern PrJJ13 und PrJJ14, Spur 4: PCR der chromosomalen DNA von YJJ22 mit den Primern PrJJ14 und PrJJ15.

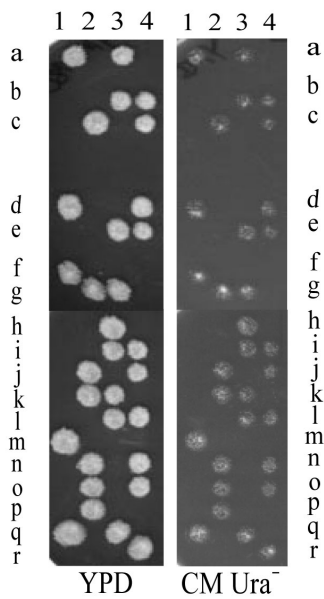


Die anschließende Sporulation und Tetradenanalyse auf YPD-Platten sollte die korrekte Integration des Deletionskonstrukts zusätzlich bestätigen. Das 2:2 Segregationsmuster von letalen und wachsenden Sporen, das durch die bekannte Letalität von *pre4* Nullmutanten erzeugt wird, konnte zwar bestätigt werden, aber bei vielen Tetraden zeigten sich nur eine oder überhaupt keine gewachsenen Sporen. Dies wies auf Sporulationsprobleme des erzeugten diploiden Stammes hin, was sich schon durch lediglich vereinzelt auftretende Tetraden nach zehn Tagen Sporulation in 1% KOAc Medium angedeutet hatte (siehe Abb. 22).

Abbildung 22: Tetradenanalyse von YJJ22. In den Zeilen A-J wurden jeweils die Sporen einer kompletten Tetrade an den Positionen 1-4 abgelegt.

Da sich ebenfalls Sporulationsprobleme bei den Transformanten von YJJ22 mit dem Plasmid *pJJ14/1* (mit *pre4-72* Allel) einstellten, wurde angenommen, dass die *PRE4*-Deletion durch das *KI-URA3* für die Sporulationsprobleme verantwortlich ist und dieser Stamm daher nicht weiter zur chromosomalen Integration von *pre4-72* am *PRE4* Locus verwendet werden kann. Eine andere Möglichkeit, das Auftreten des Sporulationsdefekts zu erklären, bestand in der Annahme einer möglicherweise spontan erfolgten Mutation im *KI-URA3* Deletions-Konstrukt oder einer Mutation in der Matrizen DNA von *pL079*. Die chromosomale Integration von *pre4-72* nach der oben beschriebenen Gegenselektionsstrategie wurde daraufhin in einem anderen Stamm, YMB180 (*pre4Δ::URA3/PRE4*), versucht.

Chromosomale Integration von *pre4-72* am *PRE4*-Lokus in YMB180



Der heterozygot diploide Deletionsstamm YMB180 enthielt schon eine *PRE4*-Deletion mit dem *S. cerevisiae URA3* Markergen. Dieser wurde zunächst durch Sporulation und anschließende Tetraden-Analyse auf die korrekte chromosomale Integration des *URA3* Allels am *PRE4*-Lokus untersucht. Von den vier dissektierten Sporen einer Tetrade waren, wie erwartet, jeweils zwei auf YPD lebensfähig und zwei aufgrund der Deletion von *PRE4* letal (Abb. 23). Die Kontrolle der auf YPD gewachsenen Sporen (*PRE4* Wildtyp) auf uracilfreiem Medium führte durch das Fehlen des *URA3* Markergens bei allen zum Zelltod.

Abbildung 23: Tetradenanalyse von YMB180 auf YPD und CM Ura⁻. In den Zeilen a-r wurden jeweils die Sporen einer Tetrade an Positionen 1-4 abgelegt. Nach 4 Tagen Wachstum bei 30°C auf YPD wurde von den gewachsenen Sporen ein Abdruck auf CM Ura⁻ Medium angefertigt und dieser ebenfalls bei 30°C 3Tage inkubiert.

Eine PCR-Kontrolle des *PRE4*-Lokus von YMB180 Zellen unter Verwenden der Primer PrJJ13 (bindet in der *PRE4* Promotorregion), PrJJ14 (bindet nur im *KI-URA3* Deletionskonstrukt), PrJJ15 (bindet in der Terminatorregion von *PRE4*) und PrJJ21 (bindet im *URA3* Gen von *S. cerevisiae*) bestätigte die Korrektheit des Genotyps von YMB180. Die PCR-Produkte der chromosomalen DNA von YES2 (*PRE4* Wildtyp) und YJJ22 (*pre4Δ::KI-URA3/PRE4*) dienen dabei als Vergleich. Für YMB180 ergaben sich nach der Elektrophorese der amplifizierten PCR Fragmente die erwarteten Banden 1,4 kb (*PRE4*) bzw. 1,6 kb (*pre4Δ::URA3*) durch PCR mit dem Primerpaar PrJJ13/PrJJ15, 1,0 kb (*URA3*) durch PCR mit dem Primerpaar PrJJ15/PrJJ21, und keine weiteren Fragmente durch PCR mit den anderen Primerkombinationen (Abb.24).

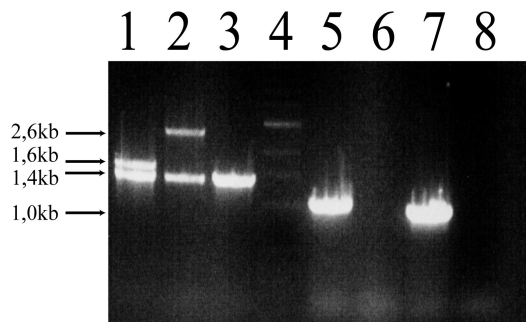


Abbildung 24: Elektrophorese der PCR-Kontrolle von YMB180. Spur 1: PCR mit chromosomaler DNA von YMB180 und Primern PrJJ13/PrJJ15, Spur 2: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ22 und Primern PrJJ13/PrJJ15, Spur 3: PCR mit chromosomaler DNA von YES2 (*PRE4* Wildtyp) und Primern PrJJ13/PrJJ15, Spur 4: 1kb Marker, Spur 5: PCR chromosomaler DNA von YJJ22 und Primern PrJJ13/PrJJ14, Spur 6: PCR mit chromosomaler DNA von YES2 (*PRE4* Wildtyp) und Primern PrJJ13/PrJJ14, Spur 7: PCR mit chromosomaler DNA von YMB180 und Primern PrJJ15/PrJJ21, Spur 8: PCR mit chromosomaler DNA von YES2 (*PRE4* Wildtyp) und Primern PrJJ15/PrJJ21.

Der als korrekt bestätigte Ausgangsstamm YMB180 wurde dann mit dem Plasmid *pJJ14/1* (*pre4-72 LEU2*) transformiert und die Transformanten 4 Tage bei 30°C auf uracil- und leucinfreiem Medium inkubiert. Die erhaltenen uracil- und leucinprototrophen Diploiden mit der Bezeichnung YJJ19 (*pre4Δ::URA3/PRE4 [pre4-72 LEU2]*) wurden anschließend zur Induktion der Meiose auf Sporulationsmedium übertragen und nach acht Tagen entstandene Tetraden auf YPD vereinzelt. Bei der Kontrolle der Tetraden konnten drei auffällige Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Sporen festgestellt werden (siehe Abb. 25). Einerseits traten nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C unvollständige Tetraden auf, bei denen schnell wachsende Sporenkolonien festgestellt werden konnten. Weiterhin traten sowohl in unvollständigen als auch in vollständigen Tetraden mittelgroß gewachsene Sporen und klein gewachsene Mikrokolonien auf. Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei den schnell gewachsenen Kolonien um reine Wildtypen handelt und bei den mittelgroßen Kolonien um *pre4-72* Allel abhängige Kolonien. Kontrolle dieser Tetradensporen durch Ausstreichen auf leucinfreiem Medium konnte dies jedoch nicht bestätigen. Sowohl in groß gewachsenen Sporenkolonien (7a, b) als auch in mittelgroß gewachsenen Sporen (4b, d) mit *PRE4* Allel, konnte durch die Leucinprototrophie die Anwesenheit des *LEU2* Plasmids *pJJ14/1* nachgewiesen werden. Dies Klone wurden mit YJJ48 (*PRE4 [pre4-72 LEU2]*) bezeichnet. Ebenfalls existent war der umgekehrte Fall: Groß gewachsene Sporenkolonien (6c, d) als auch mittelgroß gewachsene Sporen (3a, d) mit *PRE4* Wildtyp Allel ohne die Anwesenheit des

LEU2 Plasmids *pJJ14/1*. Nur in langsam wachsenden Sporen hingegen (z.B. 3b, 3c, 4a, 4c), aber nicht in allen (z.B. 5a, 8a), konnte sowohl die *PRE4*-Deletion als auch die Anwesenheit des *LEU2* Plasmids *pJJ14/1* durch Selektion auf uracil- und leucinfreiem Medium nachgewiesen werden (siehe Abb. 25).

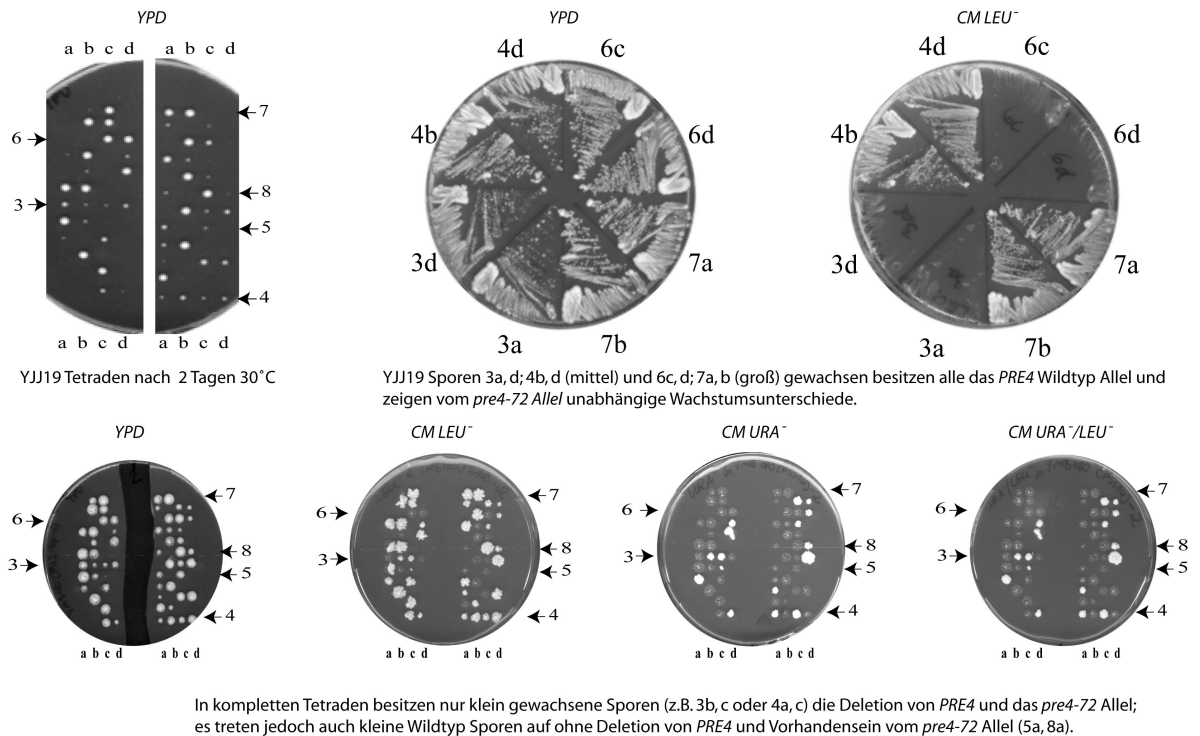


Abbildung 25: Tetradenanalyse von YJJ19 Sporen. Gezeigt sind die Wachstumsunterschiede der Tetradensporen aus YJJ19 (oben) und die Selektion der Sporen nach der Deletion *pre4Δ::URA3* und dem Plasmid *pJJ14/1[pre4-72 LEU2]* auf YPD, CM *Leu*⁻, CM *Ura*⁻ und CM *Ura*⁻/*Leu*⁻ Medium (unten).

Dies wies darauf hin, dass der gefundene Wachstumsdefekt zwischen den großen, mittleren und kleinen Sporenkolonien unabhängig vom Vorhandensein des *pre4-72* Allels in den haploiden Sporen auftritt. Weiter konnte somit der Einfluss des *pre4-72* Allels während der Sporulation von YJJ19 also in den meiotischen Schritten als wahrscheinlicher Grund für diese Wachstumsunterschiede diskutiert werden. Von den durch Selektion erhaltenen Haploiden mit dem Genotyp *pre4Δ::URA3 [pre4-72 LEU2]*, ferner mit YJJ21 bezeichnet, wurde die Plasmid DNA isoliert, *E. coli* damit transformiert und über Nacht bei 37°C amplifiziert, um dadurch das Vorhandensein des Plasmids *pJJ14/1* mit dem *pre4-72* Allel zu kontrollieren. Zur Unterscheidung zwischen *PRE4* und *pre4-72* wurde der Restriktionsverdau mit dem Enzym *NlaIII* verwendet. Während *PRE4* vier Restriktionsschnittstellen dieses Enzyms aufweist, ist im *pre4-72* Allel durch den Basenaustausch in Position 548 (T→A) eine *NlaIII* Schnittstelle weniger vorhanden. Durch PCR mit den Primern PrJJ18 und PrJJ19 sowie der aus *E. coli*

isolierten Plasmid-DNA wurden die entsprechenden 381 bp großen Fragmente amplifiziert und durch Verdau mit *NlaIII* das Auftreten einer Bande bei 351 bp (*pre4-72* Allel) oder zweier Banden bei 201 bp und 150 bp (*PRE4* Allel) kontrolliert (siehe Abb.26).

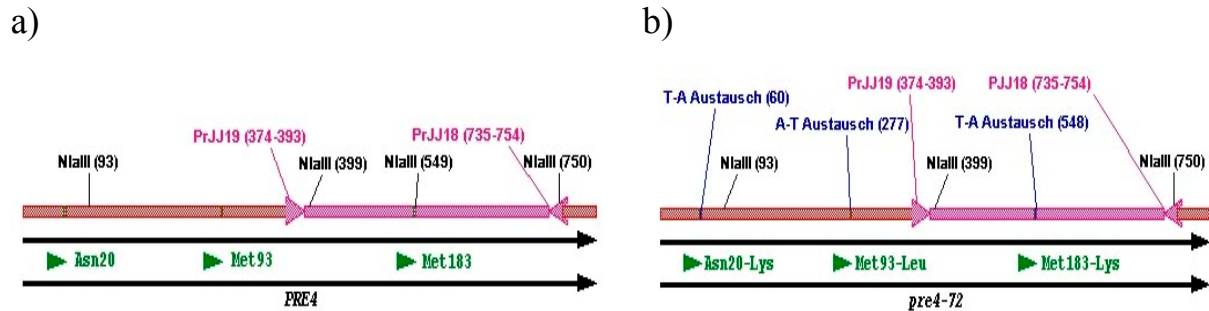


Abbildung 26: Schematische Darstellung der *NlaIII* Schnittstellen im *PRE4* Gen (a) und *pre4-72* Allel (b). Zusätzlich angezeigt sind die Positionen der ausgetauschten Basen im *pre4-72* Allel sowie die resultierenden Punktmutationen (b) und die mit PrJJ18 und PrJJ19 amplifizierten PCR Fragmente, die zur Restriktionskontrolle verwendet wurden (a), (b).

Nach Elektrophorese der *NlaIII* verdauten PCR Fragmente aus den isolierten Plasmiden der YJJ21 Transformanten konnte durch Auftreten nur einer Bande bei 0,35 kb das Vorhandensein des *pre4-72* Allels festgestellt werden.

Zur chromosomalen Integration des *pre4-72* Allels wurden nun diese YJJ21 Zellen auf 5-FOA Medium ausplattiert und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Es konnten dann insgesamt 7 Stämme, die auf 5-FOA gewachsen waren, isoliert werden. Zur Kontrolle der erfolgten Rekombination des *pre4-72* Allels am *PRE4* Locus wurden dann sowohl chromosomale DNA als auch Plasmid-DNA der Zellen isoliert. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Primern PrJJ18 und PrJJ19 sowie Verdau der erhaltenen PCR Fragmente mit dem Enzym *NlaIII*. Gel-Elektrophorese zeigte dann, dass alle homolog rekombinierten Zellen einerseits das Plasmid mit dem *pre4-72* Allel nicht verloren hatten. Andererseits konnten die mit chromosomaler DNA und Plasmid-DNA amplifizierten PCR Fragmente mit *NlaIII* verdaut werden, was für das Vorhandensein des *PRE4* Allels und nicht des *pre4-72* Allels am *PRE4* Locus und ebenfalls im isolierten Plasmid sprach (Abb.27). Ein ähnliches Ergebnis konnte in einer vorangegangenen Diplomarbeit (persönliche Mitteilung: Birgit Wagner) bei Versuchen mit einem *PRE4* deletierten Stamm der zusätzlich noch artifizielle Chromosomen (YACS) besaß, bestätigt werden. Die Integration des *pre4-72* Allels am *PRE4* Locus konnte somit über die oben beschriebene Methode der homologen Rekombination nicht erfolgreich erreicht werden.

Um trotzdem die *pre4-72* Zellen phänotypisch untersuchen zu können wurden anschließend plasmidabhängige Stämme verwendet.

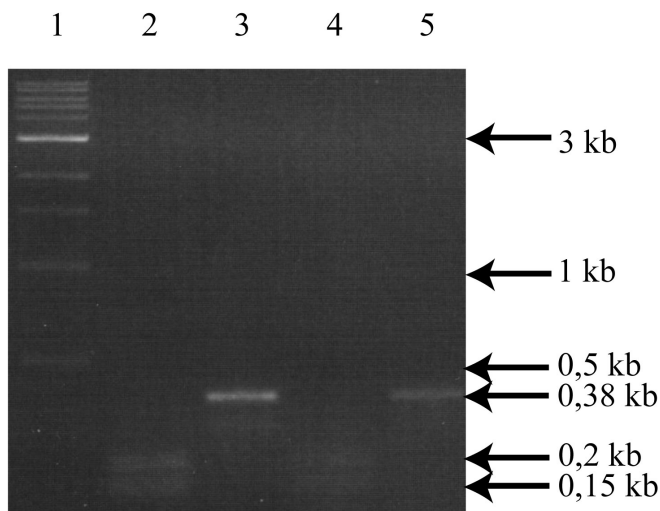


Abbildung 27: Elektrophorese von *NlaIII* Kontrollverdau zur Intergration von *pre4-72*. Spur 1: 1kb Marker, Spur 2: *NlaIII* Verdau von PCR Fragment aus chromosomaler DNA von YJJ21-1c mit Primern PrJJ18/PrJJ19. Diffus erkennbar ist die *PRE4* Doppelbande bei 0,15 kb und 0,2 kb, Spur 3: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ21-1c und Primern PrJJ18 und PrJJ19, Spur 4: *NlaIII* Verdau von PCR Fragment aus isolierter Plasmid-DNA von YJJ21-1c mit Primern PrJJ18/PrJJ19. Diffus erkennbar ist die *PRE4* Doppelbande bei 0,15 kb und 0,2 kb, Spur 5: PCR mit isolierter Plasmid-DNA von YJJ21-1c mit Primern PrJJ18 und PrJJ19.

Erzeugung *pre4-72* abhängiger, homozygot diploider Stämme

Als Ausgangsstamm zur Erzeugung von *pre4-72* abhängigen, homozygot diploiden Stämmen diente der haploide Stamm YJJ12 (*MAT α pre4 Δ ::KAN^R [LEU2 *pre4-72*]*), der bereits die *PRE4* Deletion besaß und plasmidabhängig *pre4-72* exprimierte (vgl. 3.1.3). Da jedoch kein geeigneter Stamm mit entgegengesetztem Geschlechtstyp *MATa* (Matingtyp a) zur Verfügung stand, musste zunächst in YJJ12 Zellen ein Wechsel des Matingtyps von α nach a vorgenommen werden. Dafür wurde der Stamm YJJ12 mit dem Plasmid *Br52* (*HO URA3*) transformiert. Dieses Plasmid kodiert für die Endonuklease Ho unter Kontrolle des natürlichen Promotors. Die Expression von Ho Endonuklease führt zur Geschlechtsinstabilität und damit zur Bildung von Matingtyp a Zellen. Die auf leucin- und uracilfreiem CM-Medium selektierten und mit YJJ49 (*pre4 Δ ::KAN^R [HO URA3][LEU2 *pre4-72*]*) bezeichneten Transformanten wurden zur Ermöglichung des Geschlechtswechsels über Nacht auf YPD Medium bei 30°C inkubiert. Dies ermöglichte zugleich, dass die Zellen das Plasmid *Br52* wieder verlieren konnten. Um auf den Verlust des *URA3* Plasmids zu selektionieren, wurden

die Zellen zusätzlich 3 Tage bei 30°C auf 5-FOA inkubiert. Die erhaltenen lebensfähigen Kolonien wurden dann einem Matingtyp-Test unterzogen und zur weiteren Kontrolle auf leucin- und uracilfreiem ausgestrichen. Ein Klon mit der Bezeichnung YJJ50/7 (*MATa pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]*) mit dem Geschlechtstyp *MATa* wurde dann mit YJJ12 (*MATα pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]*) zur Bildung der *pre4-72* Diploiden gekreuzt. Die nach 6 Stunden auf YPD gewachsenen Zygoten wurden anschließend auf leucinfreiem Medium und Genitcinmedium selektiert. Die erhaltenen Diploiden YJJ51/1, YJJ51/12 (*MATa/MATα pre4Δ::KAN^R / pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]*) waren wie erwartet uracil-auxotroph und leucin-prototroph (Abb. 28).

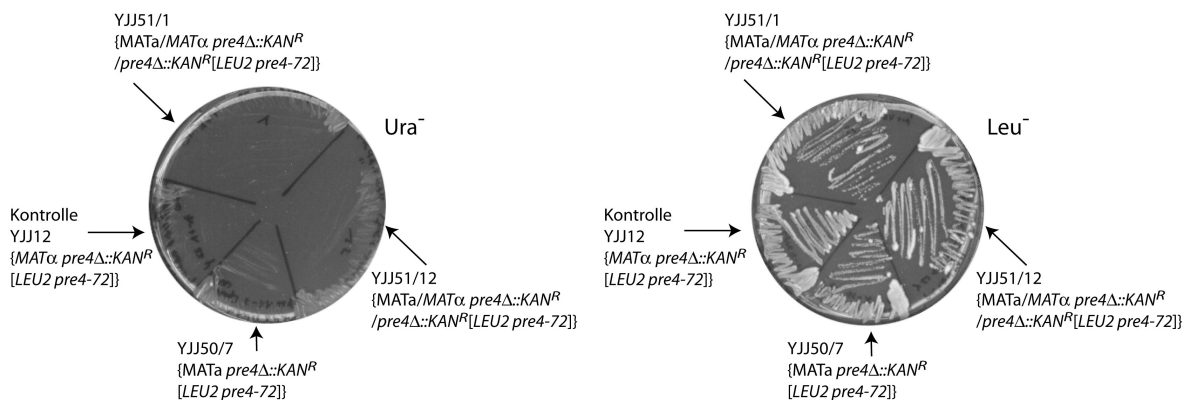


Abbildung 28: Bestätigung des Verlusts des *HO* Plasmids in YJJ50/7 und Kontrolle auf Anwesenheit des Plasmids *pJJ14/1*. Als Kontrolle auf die auxotrophen Marker wurde der Kontrollstamm YJJ12 (*pre4Δ::KAN^R [LEU2 pre4-72]*) mit den zu untersuchenden Stämmen YJJ50/7, YJJ51/1 und YJJ51/12 auf leucinfreiem Medium sowie auf uracilfreiem Medium ausgestrichen und 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Die Integration der *KAN^R*-Deletionskassette am chromosomalen *PRE4*-Lokus in den Stämmen YJJ51/1, YJJ51/12 und YJJ12 wurde jeweils durch eine PCR belegt. Dabei konnten mit der isolierten chromosomalen DNA aus YJJ51/1, YJJ51/12, YJJ12 bzw. YJJ50/7 und den Primern PrJJ25 und PrBW4 (bindet in Terminatorregion von *PRE4*) (bindet im *KAN^R* Deletionskonstrukt) 1,3 kb große PCR Fragmente und mit den Primern PrBW3 und PrBW4 (binden außerhalb von *PRE4* in der Promotor- bzw. Terminatorregion) wie erwartet nur 2,9 kb große PCR Fragmente amplifiziert werden. (siehe Abb. 29).

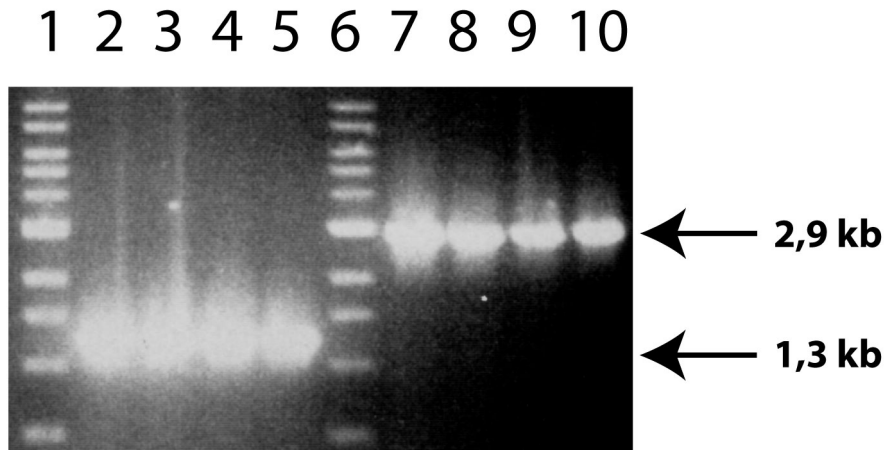


Abbildung 29: Elektrophorese der PCR-Kontrolle von YJJ12, YJJ50/7, YJJ51/1 und YJJ51/12. Spur 1 und Spur 6: 1kb Marker, PCR mit chromosomaler DNA von YMB180 und Primern PrJJ13/PrJJ15, Spur 2: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ51/1 und Primern PrJJ25/PrBW4, Spur 3: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ51/12 und Primern PrJJ25/PrBW4, Spur 4: Spur 5: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ12 und Primern PrJJ25/PrBW4, Spur 5: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ50/7 und Primern PrJJ25/PrBW4, Spur 7: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ51/1 und Primern PrBW3/PrBW4, Spur 8: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ51/12 und Primern PrBW3/PrBW4, Spur 9: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ12 und Primern PrBW3/PrBW4, Spur 10: PCR mit chromosomaler DNA von YJJ50/7 und Primern PrBW3/PrBW4.

Nach der Sporulation der Diploiden YJJ51/1 und YJJ51/12 auf 1% KOAc Medium (8 Tage bei 25°C) konnten außerdem vollständige Tetraden isoliert werden. Selektion der dissektierten Sporen sowohl auf leucinfreiem Medium als auch auf Genitcinmedium zeigte, dass alle Sporen die *PRE4*-Deletion mit dem *KAN^R*-Marker besaßen und zusätzlich die Anwesenheit des Plasmids *pJJ14/1* zum Wachsen notwendig war (siehe Abb. 30).

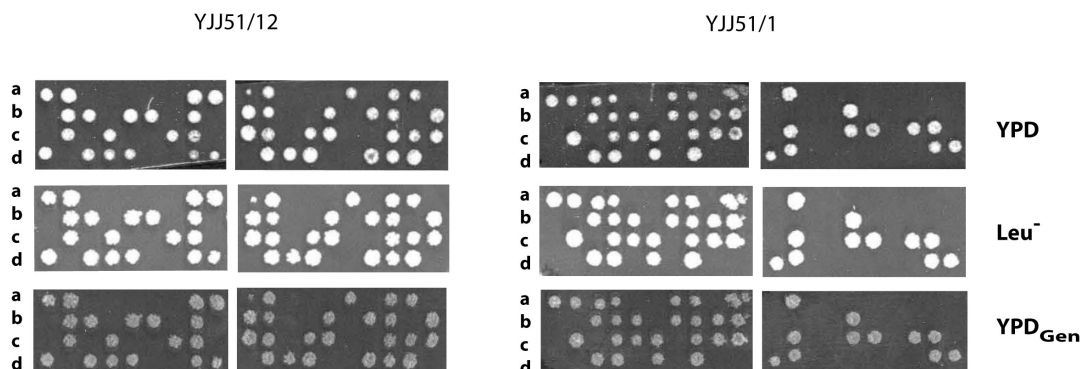


Abbildung 30: Tetradenanalyse von YJJ51/12 und YJJ51/1 auf YPD, CM Leu⁻ und YPD_{Gen} Medium. In den Zeilen a-d wurden jeweils die Sporen einer Tetrade abgelegt. Nach 4 Tagen Wachstum bei 30°C auf YPD wurde von den gewachsenen Sporen ein Abdruck auf CM Leu⁻- und YPD_{Gen}-Medium angefertigt und diese ebenfalls bei 30°C 3Tage inkubiert.

Ein Matingtype-Test bestätigte zudem, dass es sich bei den gebildeten Sporen aus den Stämmen YJJ51/1 und YJJ51/12 um Haploide handelt.

Während der Sporulation von *pre4-72* abhängigen Diploiden mit *KAN^R*-Deletion von *PRE4* tritt keine signifikante Dyadenbildung ein

Von homozygot deletierten *slk19* Nullmutanten war aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass während der Meiose einerseits der signifikante Phänotyp gesteigerter Dyadenbildung auftritt und andererseits die Sporulation verlangsamt ist (Pfiz 1999). Zur Klärung der Frage, ob diese Phänotypen auch durch das *pre4-72* Allel hervorgerufen werden können, wurden die erzeugten vom *pre4-72* Allel abhängigen Diploiden YJJ51/1 und YJJ51/12 zusammen mit einem diploiden Wildtyp (WCG) und einem diploiden *slk19* Nullmutantenstamm YSP25 (*MATa/MAT α slk19 Δ ::KAN^R/ slk19 Δ ::KAN^R*) als Kontrolle untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Selektionsmedium angezogen und anschließend in vergleichbarer Konzentration 7 Tage in 1% KOAc sporuliert. Nach Messung der optischen Dichte der Zellkulturen und Verdünnung auf auswertbare Konzentrationen erfolgte dann die Ermittlung der Gesamtzahl gebildeter Zellen sowie der Tetraden und Diaden unter Verwendung der Neubauer Zählkammer. Die Auswertung der Tetraden bzw. Dyadenbildung lässt sich aus den folgenden Schaubildern ablesen (siehe Abb. 31 und Tab. 5).

	Zellen gesamt	Tetraden	Dyaden
WCG	855	397	23
<i>pre4-72</i>	798	438	45
<i>SLK19</i> -Deletion	747	16	289

Tabelle 5: Angegeben sind jeweils die Anzahl aller gezählter Zellen und die Anzahl der darunter gefundenen Tetraden und Dyaden von WCG, YSP25 und YJJ51.

Im Vergleich zum Wildtyp WCG konnten im *pre4-72* Stamm YJJ51 bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen sogar 9% mehr Tetraden gefunden werden. Die Rate der Dyadenbildung von YSP25 Zellen (*slk19 Δ*) war gegenüber Zellen vom *pre4-72* Stamm YJJ51 um mehr als das 6-fache höher.

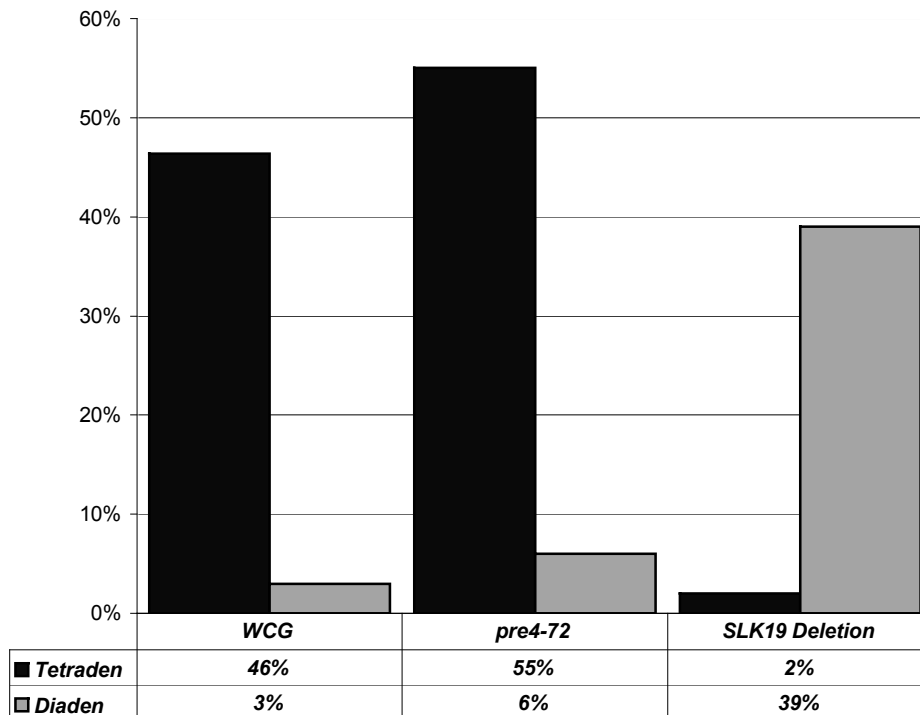


Abbildung 31: Sporulationsanalyse von WCG, YSP25 und YJJ51. Angezeigt ist die prozentuale Verteilung der Tetraden und Dyaden von YSP25 (*SLK19*-Deletion) und YJJ51 (*pre4-72*) im Vergleich zur Gesamtzahl der gezählten Zellen.

Das *pre4-72* Allel führte demnach wenn überhaupt nicht signifikant zum Wachstumsphänotyp vermehrter Dyadenbildung im Gegensatz zum *slk19Δ* Mutantenstamm YSP25.

Stabilität künstlicher Chromosomen in *pre4-72* Mutanten während der mitotischen Teilung

Dieser Arbeit vorausgegangene Untersuchungen zur Segregation künstlicher Chromosomen in *slk19* Nullmutanten hatten einerseits das Auftreten von Fehlern während dem zweiten, mitoseähnlichen Segregationsschritt der Meiose (Miose II) bestätigt. Andererseits zeigte sich bei Untersuchungen zur Stabilität von künstlichen Chromosomen (YACs) in *slk19* Nullmutanten, dass diese Fehlsegregationen auch während der Mitose auftreten. Dazu wurden die Verlustraten der künstlichen Chromosomen während der Mitose verfolgt (Pfiz et al. 2002). Zur Untersuchung, ob sich *pre4-72* in ähnlicher Weise auf die Mitose auswirkt, konnten Plasmid abhängige *pre4-72* Mutanten verwendet werden, die nur noch ein YAC mit *LYS2* und *HIS3* Markergenen besaßen. Diese Stämme waren durch Modifizierung des diploiden Stammes FYS8 erzeugt worden, der zwei unterschiedliche YACs (YAC12-UT bzw. YAC12-LH) integriert hatte. Dabei war zunächst der Verlust des YAC-UT mit dem *TRP1* und *URA3*

Markergen durch Selektion auf 5-FOA induziert worden. Um die Integration von *pre4-72* zu ermöglichen, wurde dann ein *PRE4* Gen in den erhaltenen Transformanten chromosomal durch ein *URA3* Deletionskonstrukt ersetzt und anschließend das Plasmid *pJJ14/1* transformiert. Die erhaltenen heterozygot Diploiden Transformanten wurden nach Selektion auf uracil-, leucin-, lysin- und histidin freiem Medium zur Sporulation 10 Tage in 1% KOAc inkubiert. Die Dissektion der entstandenen Tetraden und Selektion auf uracil-, leucin-, lysin- und histidinfreiem Medium ermöglichte die Isolierung der haploiden Stämme YB016/1 und YB016/23 (*MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ 200 ade2-101 lys2-108/ preΔ::URA3 YAC12 CEN4 LYS2 HIS3 [LEU2 pre4-72]*), mit *PRE4*-Deletion, dem *pre4-72* Allel auf dem Plasmid *pJJ14/1* und dem YAC-LH (Wagner 2002).

Diese beiden Stämme YB016/1 und YB016/23 wurden nach Kontrolle der Selektionsmarker mit dem Kontrollstamm FYS7/1 (*MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ-200 ade2-101 lys2-108 YAC12 CEN4 LYS2 HIS3*) unter Standardbedingungen auf den entsprechenden Selektionsmedien angezogen, bei Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 8) auf YPD Medium übertragen und bei 30°C weiter inkubiert. Während dem Wachstum auf nicht selektivem Medium wurden dann zu unterschiedlichen Zeitabständen Proben entnommen, die Gesamtzahl der Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und definiert verdünnte Zellmengen auf entsprechenden Selektionsmedien in Verdünnungsreihen ausplattiert. Die folgende Abbildung (Abb. 32) zeigt den mitotischen Verlust der YACs in den *pre4-72* Mutantenzellen als Mittelwert aus jeweils zwei Experimenten im Vergleich zu Wildtypzellen unter Berücksichtigung von vier Messungen nach der Überführung vom selektiven Medium in nicht selektives Medium (0h) zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 9, 15 und 23h) nach der Inkubation auf YPD. Aus Abbildung 32 lässt sich entnehmen, dass sich im Vergleich zum Wildtypstamm in *pre4-72* Mutanten ein erhöhter Verlust der künstlichen Chromosomen im Zeitraum zwischen 15 Stunden und 23 Stunden einstellt. Nach 23 Stunden Inkubation auf nichtselektivem Medium beträgt die Differenz 13%.

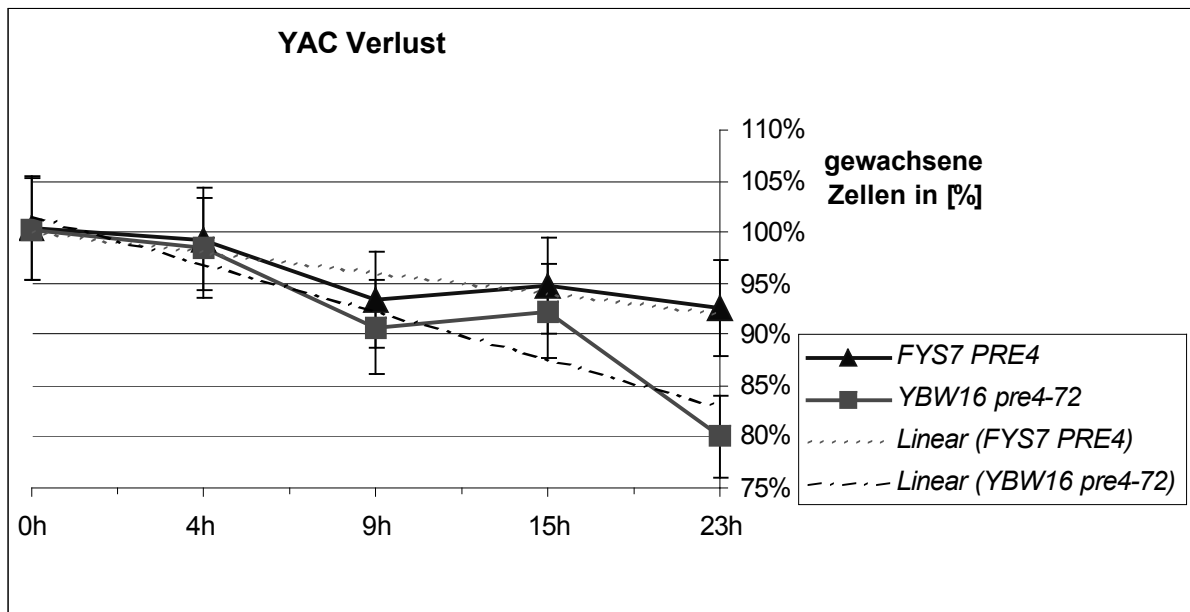


Abbildung 32: Stabilitätsuntersuchungen von artifiziellen Chromosomen (YACs) während der Mitose. Verglichen wurde der Verlust des artifiziellen Chromosoms der beiden das YAC-LH tragenden Stämme FYS7 (*PRE4* Wildtyp) und YBW16 (*pre4-72*) nach 0- 23h Inkubation auf nichtselektivem YPD Medium. Zusätzlich zu den Graphen der Messwerte ist jeweils eine lineare Trendlinie (gestrichelte Linien) für den YAC-Verlust der beiden Stämme angegeben.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Daten, die mit *slk19* Nullmutanten ermittelt wurden und nach 24 Stunden eine Differenz von über 50% zum Wildtypstamm in der mitotischen Stabilität der künstlichen Chromosomen aufwiesen, so scheint sich *pre4-72* zwar weniger stark auf die Chromosomenstabilität als *SLK19* Deletionen auszuwirken. Der Einfluss von *pre4-72* in der Mitose konnte jedoch bestätigt und die Chromosomenstabilität vor allem in Zellen zunehmendem Alters diskutiert werden.

3.1.7 Proteasomale Aktivitäten in Abhängigkeit vom *pre4-72* Allel

Untersuchungen zum Einfluss von Slk19 auf proteasomale Aktivitäten in einer vorangegangenen Arbeit hatten gezeigt, dass die Anwesenheit von Slk19 für das Auftreten des Defekts in der peptidspaltende Aktivität der β -Untereinheit Pre3 (PGPH-Aktivität) von *pre4-1* Mutanten notwendig ist. In *SLK19* Deletionsmutanten konnte dabei der durch die *pre4-1* Mutation hervorgerufene Defekt in der PGPH-Aktivität des Proteasoms wieder repariert werden (Zimmermann 1998). Dieser Befund untermauerte die Annahme, dass Slk19 mit dem Proteasom eine direkt Wechselwirkung eingeht. Die Untersuchungen zur synthetischen Letalität in vorangegangenen Abschnitten (siehe 3.1.1- 3.1.3) hatten einerseits bestätigt, dass in *pre4-72* Mutanten die Wechselwirkung mit Slk19 nicht mehr stattfindet.

Andererseits war bekannt, dass *pre4*-Mutationen wie z.B. *pre4-1* die PGPH Aktivität des Proteasoms beeinflussen (Gerlinger et al. 1997a, Hilt et al. 1993a). Dies veranlasste die Untersuchung der Frage, welchen Einfluss die *pre4-72* Mutationen allgemein auf die proteasomalen Aktivitäten und im speziellen auf die PGPH Aktivität, ausüben.

Die chymotrypsinähnlichen Aktivitäten in *pre4-72* Mutanten zeigen Wildtypcharakter

Zum Test der chymotrypsinähnlichen Aktivität von *pre4-72* Mutanten wurden YJJ12 Klone (*MAT α pre4 Δ ::KAN^R [LEU2 *pre4-72*]*) verwendet, die aus YJJ11 (*pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4] [LEU2 *pre4-72*]*) durch Verlust des *URA3* Plasmids (*URA3 PRE4*) auf 5-FOA Medium erzeugt worden waren. Nach Kontrolle auf 5-FOA-, leucin- und uracilfreiem CM-Medium wurden die YJJ12 Klone zusammen mit den Kontrollstämmen WCG (*PRE4* Wildtyp), yHI29/1 (*pre1-1*), yHI29/4 (*pre4-1*), yHI29/14 (*pre1-1, pre4-1*) und YRG11 (*pre3-1*) auf Selektivmedium unter Standardbedingungen inkubiert und dann in einem Overlay-Test auf ihre chymotrypsinähnliche Aktivität hin untersucht (Verfahrensweise siehe 2.8.9).

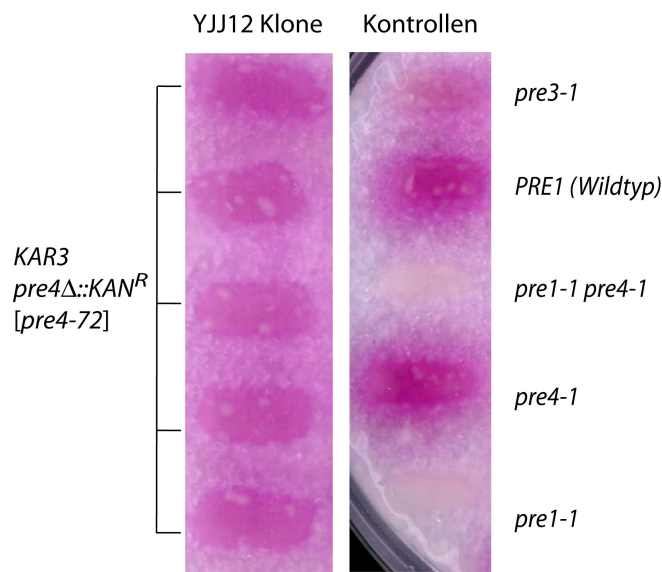


Abbildung 33: Die chymotrypsinähnliche Aktivität des Proteasoms zeigt in *pre4-72*-Mutanten Wildtypcharakter. Klone des Stammes YJJ12 (*pre4-72*)(linke Spalte) wurden zusammen mit den Kontrollen WCG (*PRE4* Wildtyp), yHI29/1 (*pre1-1*), yHI29/4 (*pre4-1*), yHI29/14 (*pre1-1, pre4-1*) und YRG11 (*pre3-1*)(rechte Spalte) untersucht. Dargestellt ist das Ergebnis des Overlay-Tests.

Es zeigte sich, dass in allen YJJ12 Klonen durch das *pre4-72* Allel keine Beeinträchtigung der von der Pre2 Untereinheit vermittelten chymotrypsinähnlichen Aktivität auftrat, wie sie z.B. in den Kontrollen der *pre1-1*-, *pre3-1*-Mutanten oder *pre1-1 pre4-1*-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp erkennbar sind (siehe Abb. 33). Die *pre4-72* Mutanten haben

demnach genauso wie die *pre4-1*-Mutanten alleine keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Pre2.

Die PGPH Aktivitäten in *pre4-72* Mutanten zeigen Wildtypcharakter

Wie sich die *pre4-72* Mutationen auf die enzymatische Aktivität der direkt benachbarten Pre3 Untereinheit auswirken, wurde durch einen *in situ* Test der PGPH Aktivität untersucht. Dazu wurden YJJ12 Klone (*MAT α pre4 Δ ::KAN^R [LEU2 *pre4-72*]*) verwendet, die aus YJJ11 (*pre4 Δ ::KAN^R [URA3 PRE4] [LEU2 *pre4-72*]*) durch Verlust des *URA3 PRE4* auf 5-FOA Medium erzeugt worden waren. Nach Kontrolle auf 5-FOA-, leucin- und uracilfreiem CM-Medium wurden die YJJ12 Klone zusammen mit den Kontrollstämmen WCG (Wildtyp), yHI29/1 (*pre1-1*), yHI29/4 (*pre4-1*), yHI29/14 (*pre1-1, pre4-1*) und YRG11 (*pre3-1*) auf Selektivmedium unter Standardbedingungen inkubiert und dann in einem Overlay-Test auf ihre PGPH-Aktivität hin untersucht (Verfahrensweise siehe 2.8.8).

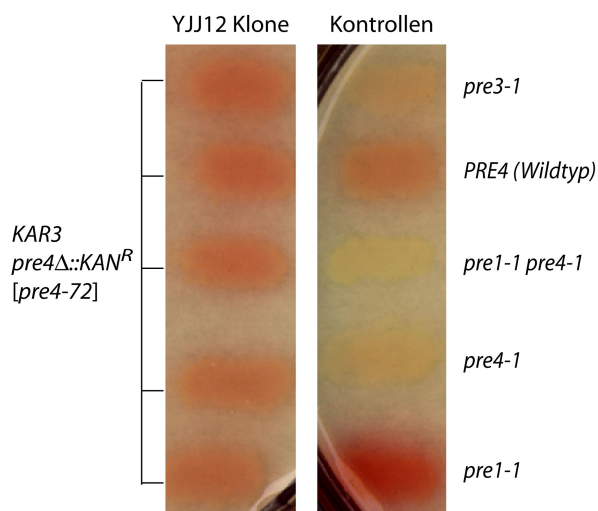


Abbildung 34: Die PGPH-Aktivität des Proteasoms zeigt in *pre4-72*-Mutanten Wildtypcharakter. Klone des Stammes YJJ12 (*pre4-72*)(linke Spalte) wurden zusammen mit den Kontrollen WCG (*PRE4* Wildtyp), yHI29/1 (*pre1-1*), yHI29/4 (*pre4-1*), yHI29/14 (*pre1-1, pre4-1*) und YRG11 (*pre3-1*)(rechte Spalte) untersucht. Dargestellt ist das Ergebnis des Overlay-Tests.

Im Vergleich zu Wildtypzellen konnte auch in den Klonen der *pre4-72* Mutanten YJJ12 keine Änderung der petidyl-glutamyl-peptid hydrolysierenden Aktivität von Pre3 festgestellt werden, wie sie z.B. in den Kontrollen der *pre1-1*-, *pre3-1*-, *pre4-1* Mutanten oder der *pre1-1 pre4-1*-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp erkennbar sind (siehe Abb. 34). Zusammen mit dem Ergebnis aus dem Experiment zur chymotrypsinähnlichen Aktivität konnte somit veranschaulicht werden, dass Proteasomen mit *pre4-72* normale proteolytische

Aktivität aufweisen. Des weiteren lässt sich diskutieren, dass im Falle einer Beeinflussung der proteolytischen Aktivität durch die Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 in *pre4-72* Mutanten die Regulierung der PGPH-Aktivität durch Slk19 nicht mehr erfolgen kann. Zur weiteren Klärung, ob in *pre4-72* Mutanten tatsächlich keine direkte Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 mehr möglich ist, sollte ein „Two-Hybrid“ Experiment beitragen.

3.2 „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19

Das „Two-Hybrid“-System ermöglicht den Nachweis einer direkten Wechselwirkung zwischen zwei bekannten Proteinen oder zwischen einem bekannten Protein und Proteinen aus einer Genbank (Phizicky and Fields 1995). Das System basiert auf der funktionellen Wiederherstellung des Transkriptionsaktivators Gal4 von *S. cerevisiae*, der die Transkription eines durch UAS_{Gal4}-Sequenzen (Upstream activation site von Gal1) kontrollierten Gens vermittelt.

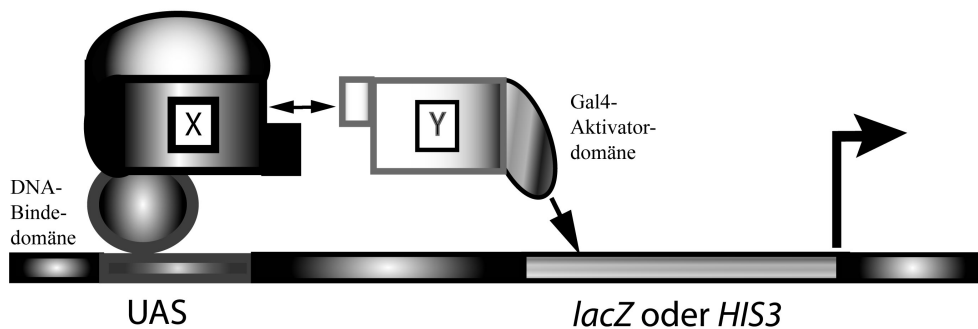


Abbildung 35: Schematische Darstellung des „Two-Hybrid“-Systems. Das Hybridprotein aus DNA-Bindedomäne und dem Protein X ermöglicht die Bindung an die DNA (UAS-Sequenz), eine Wechselwirkung zwischen Protein X und Protein Y, das im 2. Hybridprotein an die Transkriptionsaktivator-domäne fusioniert ist, vermittelt die Transkription des Reportergens (*lacZ* oder *HIS3*) über die Transkriptionsaktivator-domäne.

Die beiden im „Two-Hybrid“-System auf zwei Plasmiden getrennt exprimierten funktionellen Domänen, die Gal4 DNA-Bindedomäne (N-terminale Domäne, die an DNA-spezifische UAS_{Gal4}-Sequenzen bindet) und die Gal4 Transkriptionsaktivator-domäne (C-terminale Domäne mit überwiegend sauren Aminosäuren) können die Transkription eines Reportergens (*lacZ* oder *HIS3*) nur dann ausführen, wenn sie räumlich miteinander verbunden sind. Fusionen von zwei verschiedenen Proteinen (X und Y) an die beiden getrennten Domänen des Gal4 Transkriptionsaktivators führen demnach nur dann zur Expression des Reportergens

(*lacZ* oder *HIS3*), wenn die beiden Proteine X und Y miteinander interagieren und dadurch die räumliche Nähe der beiden Gal4-Domänen wiederhergestellt wird (siehe Abb. 35).

Bei der Suche nach Proteinen, die *in vivo* mit der Pre4- und der Prs2 Untereinheit des 20S Proteasoms der Hefe *S. cerevisiae* interagieren, fanden in einer vorausgegangenen Arbeit von Zimmermann (Zimmermann 1998) zwei weiterentwickelte „Two-Hybrid“-Systeme von M. Christman und S. Elledge Verwendung: Beim System von M. Christman ist die Gal4 DNA-Bindedomäne gegen die DNA-Bindedomäne von LexA ersetzt. LexA, das aus *E. coli* stammt, sorgt für die Reparatur defekter Genomabschnitte. Zur Suche nach Proteinen die mit Pre4 oder Prs2 interagieren wurden Fusionen der LexA DNA-Bindedomäne mit den Proteinen Pre4 oder Prs2 verwendet, die an UAS_{LexA} -Sequenzen des Testerstamms CY630 binden. Der Testerstamm CY630 ermöglicht dann die Expression des Reportergens *lacZ* (aus *E. coli*).

Mit dem System von S. Elledge können im Testerstamm Y190 die Reportergene *lacZ* und *HIS3* (aus *S. cerevisiae*) unter Kontrolle der UAS_{Gal4} -Sequenzen exprimiert werden (Durfee et al. 1993). Die Suche nach mit Pre4 oder Prs2 interagierenden Proteinen erfolgte dabei mit Fusionen der Proteine Pre4 oder Prs2 an die Gal4 DNA-Bindedomäne.

Nach einer Genbanksuche mit diesen Systemen und weiterführenden Experimenten konnte einerseits gezeigt werden, dass das Protein Slk19 spezifisch mit der Pre4 Untereinheit des Proteasoms interagiert und andererseits die C-terminalen Bereiche sowohl von Pre4 als auch von Slk19 für die Wechselwirkung notwendig sind (Zimmermann 1998).

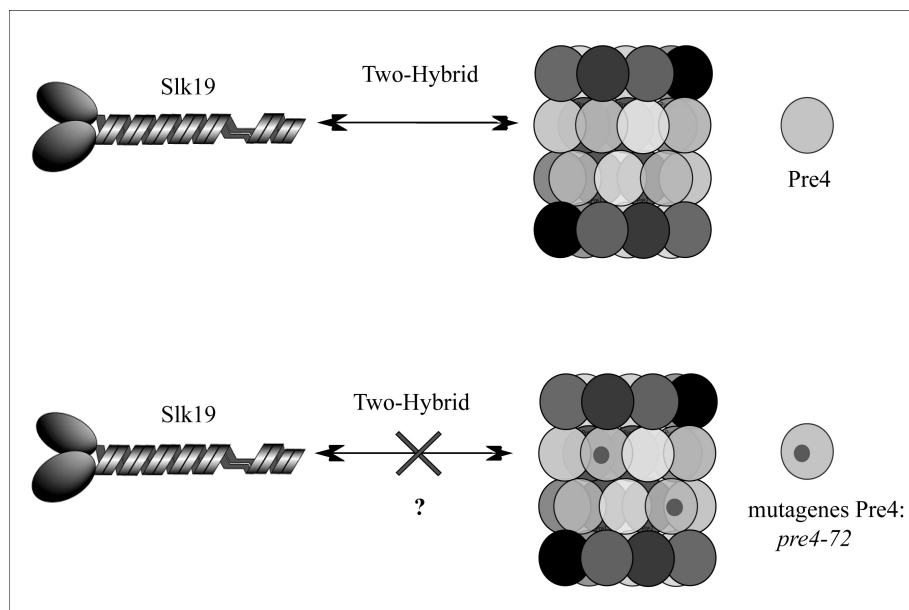


Abbildung 36: Interaktion von Pre4 und Slk19 sowie *pre4-72* und Slk19. In „Two-Hybrid“-Experimenten sollte der Einfluss von *pre4-72* auf die Interaktion von Slk19 und Pre4 untersucht werden.

Zur Kontrolle wie sich nun die *pre4-72* Mutationen auf die Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 auswirkt, sollten einerseits Pre4-72 Hybridproteine bestehend aus Konstrukten mit *pre4-72* und der DNA-Bindedomäne von LexA- bzw. Gal4 für eine 2-Hybridanalyse verwendet werden. Zur Expression des Reportergens *lacZ* in den „Two-Hybrid“-Experimenten wurden andererseits Fusionen von N-terminal verkürztem Slk19 sowie komplettem Slk19 an die Gal4 Transkriptionsaktivator-domänen in den Teststämmen CY630 und Y190 eingesetzt.

3.2.1 Konstruktion von Vektoren mit Fusionen von *pre4-72* und DNA-Bindedomänen

Durch einen Genbankscreen mit dem „Two-Hybrid“-System konnte gezeigt werden, dass Slk19 spezifisch mit der 20S Untereinheit Pre4 des Proteasoms interagiert. Zur Klärung ob die Wechselwirkung zwischen Pre4 und Slk19 in *pre4-72* Mutanten nicht mehr stattfinden kann, wurde das „Two-Hybrid“-System mit der LexA DNA-Bindedomäne verwendet. Im Vektor *CB362* wurde die DNA Sequenz von *pre4-72 in frame* mit der für die DNA-Bindedomäne von LexA kodierenden Sequenz fusioniert. Der Vergleich der *lacZ* Expression zwischen den erzeugten Pre4-72 Hybriden und Fusionsproteinen von Pre4 mit der DNA-Bindedomäne von LexA sollte nachweisen, ob die Expression des Reportergens *lacZ* im „Two-Hybrid“-Testerstamm CY630 durch *pre4-72*-Hybridproteine beeinträchtigt wird. Um zu zeigen, dass die Ergebnisse unabhängig vom verwendeten „Two-Hybrid“-System sind, wurden in den Vektoren *pAS1* und *pAS2* ebenfalls Konstrukte aus *pre4-72* und kodierenden Sequenzen der DNA-Bindedomäne von Gal4 erzeugt. Der Vergleich der *lacZ* Expression zwischen diesen erzeugten Pre4-72 Hybriden mit Hybriden bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 und Pre4 sollte dann den Einfluss von *pre4-72* auf die Expression des Reportergens *lacZ* im „Two-Hybrid“-Testerstamm Y190 bestätigen.

3.2.2 Klonierung des *pre4-72* Allels an die Sequenzen der DNA-Bindedomänen in den Vektoren *CB362*, *pAS1* und *pAS2*

Klonierung der Vektoren *CB362* (LexA-BD), *pAS1* und *pAS2*(Gal4-BD), die kodierende Sequenzen für die DNA-Bindedomäne von LexA und Gal4 besitzen, mit der kompletten oder verkürzten Sequenz des *pre4-72* Allels erfolgte mittels zweier unterschiedlicher Verfahren.

Erzeugung vom *EcoRI/BamHI-pre4-72* Fragment

Zum einen wurde durch PCR mit den Primern Pr-Nat-fw und Pr-Nat-rev sowie dem Plasmid *pJJ14/1* (*pre4-72*) als Matrize ein 820 bp großes PCR Fragment des *pre4-72* Allels erzeugt, bei dem am 5'-Ende das Startkodon durch eine *EcoRI*-Schnittstelle ersetzt ist und sich am 3'

Ende eine *BamHI*-Schnittstelle an das Stopkodon anschließt. Die PCR Reaktion wurde zur Vermeidung von ungewollten Basenaustauschen mit der Vent-Polymerase durchgeführt. Das PCR Fragment wurde zur weiteren Kontrolle auf die Anwesenheit der *pre4-72* Mutationen getestet. Dazu wurde die unter 3.1.6 beschriebene Methode über den Verdau mit dem Enzym *NlaIII* eingesetzt. Das nach Verdau mit *BamHI* und *EcoRI* isolierte DNA Fragment mit dem gesamten *pre4-72* Allel außer dem Startkodon wurde zur Klonierung der beiden Vektoren *CB362* und *pAS1* verwendet.

Erzeugung eines *NcoI/BamHI-pre4-72* Fragments

Durch Verdau des Plasmids *pJJ14/1 (pre4-72)* mit den Enzymen *NcoI* (schneidet im *pre4-72* Allel) und *BamHI* wurde ein 1 kb großes DNA-Fragment erzeugt. Das Fragment enthält in 5'-3' Richtung die *pre4-72* Sequenz, der die Sequenz vom Startkodon bis zur *NcoI*-Schnittstelle fehlt und die somit für ein um 30 Aminosäuren N-terminal verkürztes Pre4-72 Protein kodiert. Die durch *pre4-72* erzeugten Punktmutationen M52-L und M142-K im gereiften Pre4 Protein bleiben jedoch unverändert. Nach Isolierung des *pre4-72*-Fragments und der Kontrolle der vorhandenen *pre4-72* Mutationen durch Verdau mit dem Enzym *NlaIII* nach der schon beschriebenen Methode (siehe 3.1.6) wurde dieses verkürzte *pre4-72*-Allel zur Klonierung des Vektors *pAS2* verwendet.

Klonierung des Vektors *CB362 pre4-72*

Zur Klonierung des Vektors *CB362 pre4-72* wurde das 0,8 kb große *EcoRI/BamHI-pre4-72* Fragment verwendet. Der 5,5 kb große Vektor *CB362*, der die LexA DNA-Bindedomäne enthält, wurde mit den Enzymen *EcoRI/BamHI* verdaut. Nach der Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung und Reinigung mit dem Gel Extraktions Kit wurde der linearisierte Vektor mit dem *EcoRI/BamHI-pre4-72* Fragment ligiert. Durch das Ersetzen des Startkodons mit der *EcoRI* Schnittstelle im *pre4-72*-Fragment wurde vermieden, dass das Startkodon als alternativer Transkriptionsstart wirkt. Nach Transformieren und Amplifizieren in *E. coli* wurden die entstandenen Plasmide durch Verdau mit *EcoRI/BamHI* (Fragmente bei 0,8 kb und 5,5 kb) bzw. *NcoI* (schneidet nur in der *pre4-72*-Sequenz Fragment bei 6,3 kb) auf die korrekte Insertion des *pre4-72* Fragments kontrolliert. Die Kontrolle, dass der *pre4-72* kodierende Bereich durch die Insertion „in frame“ carboxyterminal an die lexA Bindedomäne fusioniert, wurde mit dem Programm Gene Construction Kit vorgenommen. Die Plasmidkarte des klonierten Plasmids *CB362 pre4-72* ist in Abb. 37 dargestellt.

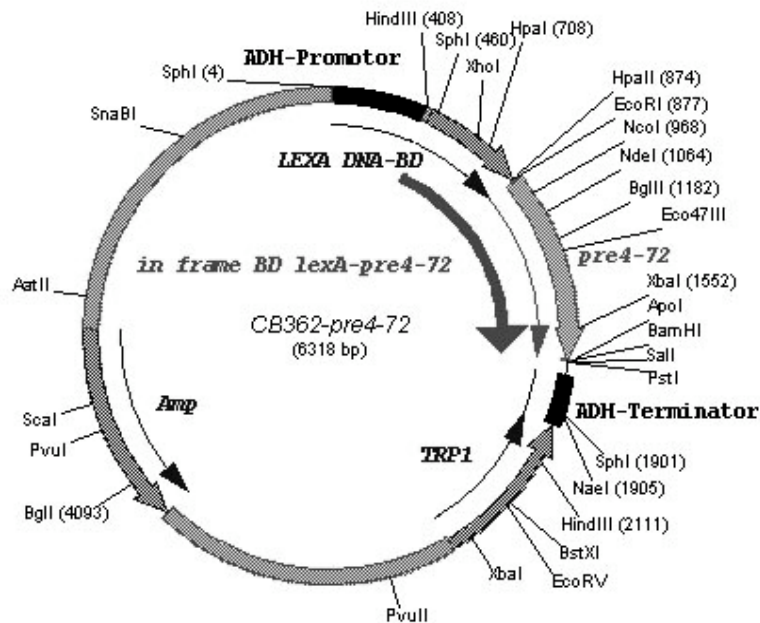


Abbildung 37: CB362 *pre4-72*. Das Plasmid *CB362 pre4-72* dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von LexA mit dem gesamten *pre4-72* ohne die erste Aminosäure (Methionin) unter der Kontrolle des ADH-Promotors. Das Hybridprotein wurde im „Two-Hybrid“-System zur Kontrolle der Interaktion zwischen *pre4-72* und Slk19 eingesetzt.

Klonierung von *pAS1 pre4-72*

Zur Klonierung des Vektors *pAS1 pre4-72* wurde ebenfalls das 0,8 kb große *EcoRI/BamHI-pre4-72* Fragment verwendet. Der 7,1 kb große Vektor *pAS1*, der die Gal4 DNA-Bindedomäne enthält, wurde mit den Enzymen *EcoRI/BamHI* verdaut. Nach der Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung und Reinigung mit dem Gel Extraktions Kit wurde der linearisierte Vektor mit dem *EcoRI/BamHI-pre4-72* Fragment ligiert. Durch das Ersetzen des Startkodons mit der *EcoRI* Erkennungssequenz im *pre4-72* Fragment wurde vermieden, dass das Startkodon als alternativer Transkriptionsstart wirkt. Nach Transformieren und Amplifizieren in *E. coli* wurden die entstandenen Plasmide durch Verdau mit *PstI/NcoI* (Doppelbande bei 0,73 kb und 0,83 kb sowie 7,1 kb und 7,2 kb) bzw. *NdeI* (schneidet in der *pre4-72* Sequenz sowie im *pAS1*) auf die korrekte Insertion des *pre4-72* Fragments kontrolliert. Die Kontrolle, dass der *pre4-72* kodierende Bereich durch die Insertion „in frame“ C-terminal an die Gal4 Bindedomäne fusioniert, wurde mit dem Programm Gene Construction Kit vorgenommen. Die Plasmidkarte des klonierten Plasmids *pAS1 pre4-72* ist in Abb. 38 dargestellt.

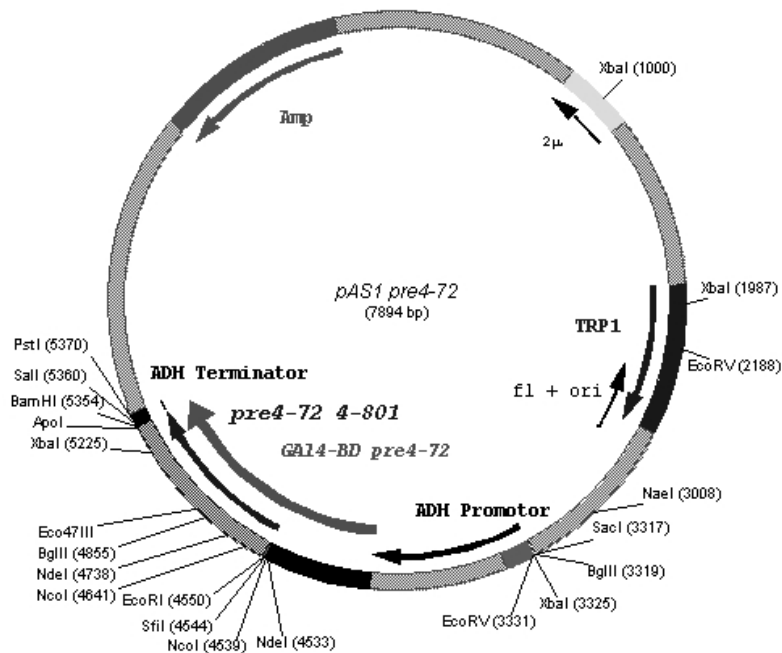


Abbildung 38: *pAS1 pre4-72*. Das Plasmid *pAS1 pre4-72* dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 (Aminosäuren 1-147), einer nukleären Lokalisierungssequenz, einem HA-Epitop zur Detektion des Hybridproteins mit Antikörpern und allen Aminosäuren von *pre4-72* außer der ersten Aminosäure (Methionin) unter der Kontrolle des ADH-Promotors. Das Hybridprotein wurde im „Two-Hybrid“-System zur Kontrolle der Interaktion zwischen *pre4-72* und Slk19 eingesetzt.

Klonierung von *pAS2 pre4-72*

Zur Klonierung des Vektors *pAS2 pre4-72* wurde das 1 kb große *NcoI/BamHI-pre4-72* Fragment verwendet. Der 8,5 kb große Vektor *pAS2*, der die kodierende Sequenz für die Gal4 DNA-Bindedomäne enthält, wurde mit den Enzymen *NcoI/BamHI* verdaut. Nach der Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung und Reinigung mit dem Gel Extraktions Kit wurde der linearisierte Vektor mit dem *NcoI/BamHI-pre4-72* Fragment ligiert. Durch das Fehlen der Sequenz vom Startkodon bis zur *NcoI* Schnittstelle im *pre4-72* Fragment wurde vermieden, dass das Startkodon als alternativer Transkriptionsstart wirkt. Nach Transformieren und Amplifizieren in *E. coli* wurden die entstandenen Plasmide durch Verdau mit *PstI/NcoI* (Doppelbande 1 kb und 0,83 kb sowie 7,1 kb und 7,2 kb) bzw. *BglIII* (2 Fragmente bei 2,2 Kb und 7,3 kb) auf die korrekte Insertion des *pre4-72* Fragments kontrolliert. Die Kontrolle, dass der *pre4-72* kodierende Bereich durch die Insertion „in frame“ C-terminal an die Gal4 Bindedomäne fusioniert, wurde mit dem Programm Gene

Construction Kit vorgenommen. Die Plasmidkarte des klonierten Plasmids *pAS2 pre4-72* ist in Abb. 39 dargestellt.

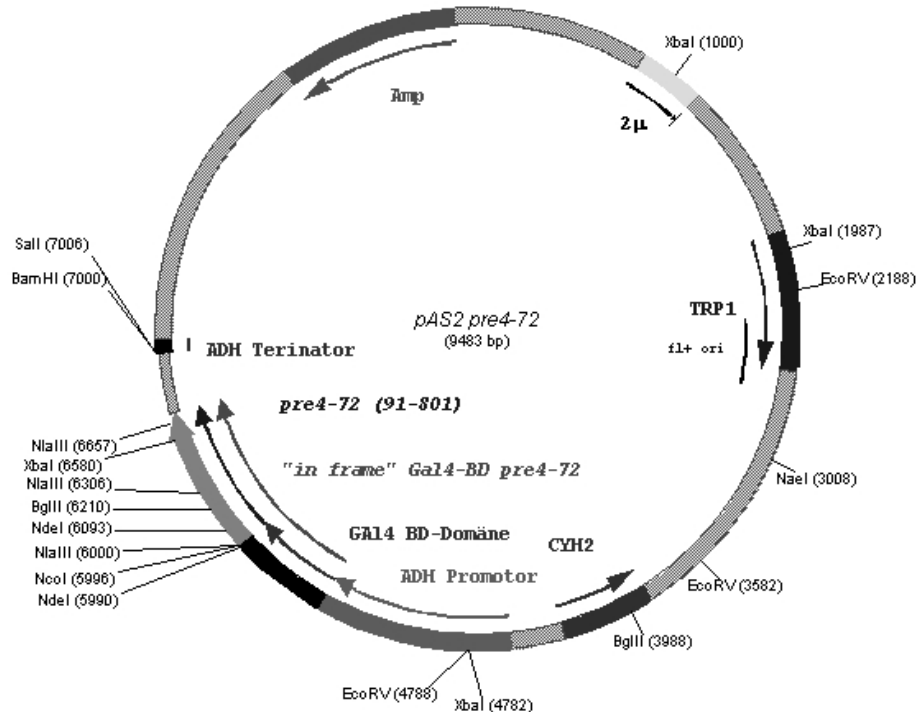


Abbildung 39: *pAS2 pre4-72*. Das Plasmid *pAS pre4-72* dient zur Expression eines Hybridproteins bestehend aus der DNA-Bindedomäne von Gal4 (Aminosäuren 1-147), einer nukleären Lokalisierungssequenz, einem HA-Epitop zur Detektion des Hybridproteins mit Antikörpern und einem N-terminal um 30 Aminosäuren verkürzten Fragments von *pre4-72* unter der Kontrolle des ADH-Promotors. Das Hybridprotein besitzt immer noch die beiden Punktmutationen M52-L und M142-K des prozessierten Pre4.

Kontrolle der „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4-72 Proteinen im Testerstamm CY630

Um mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems die Wechselwirkung zwischen Slk19 und *pre4-72* zu testen wurde der Hefestamm CY630 zunächst mit den Plasmiden *pJZ46* (Fusion von Gal4-Aktivator-domäne mit C-terminalen Aminosäuren 322 bis 821 von Slk19) und *pJZ47* (Fusion von Gal4-Aktivator-domäne mit Aminosäuren 2 bis 821 von Slk19) transformiert, die für Fusionen von unterschiedlich großen C-terminalen Slk19 Fragmenten mit der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne kodieren (siehe 2.5.14 und 2.5.15). Dies erlaubte die Kontrolle, wie sich die unterschiedlich großen C-terminalen Fragmente von Slk19 auf die Wechselwirkung mit Pre4 und *pre4-72* auswirken. Die auf leucin- und uracilfreien Selektionsplatten gewachsenen Transformanten wurden anschließend mit dem Plasmid *Cb362*

pre4-72 und als Kontrolle mit den Plasmiden *CB362* (LexA-BD alleine), *pJZ1* (LexA-BD Pre4), *pJZ6* (LexA-BD Prs2) sowie *CB440* (LexA-BD LaminC) transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden als Kontrolle auf leucin-, tryptophan- und uracilfreien Selektionsplatten ausplattiert und anschließend für den „Two-Hybrid“-Test über die Expression von β -Galaktosidase 3-5 Tage auf CM/ Trp⁻, Leu⁻, 0,05 mM Histidin Medienplatten bei 30°C inkubiert. Nach Übertragen der Zellen auf einen Rundfilter, der auf der Agarschicht von Medienplatten der gleichen Zusammensetzung (CM/ Trp⁻, Leu⁻, 0,05 mM Histidin) lag und 2 Tage Inkubation bei 30°C wurden die auf dem Rundfilter gewachsenen Zellen auf die Expression der β -Galaktosidase durch Blaufärbung kontrolliert (Methode siehe 2.8.7). Für die Klone von CY630, die durch das Plasmid *pJZ47* ein Hybridprotein mit der Gal4-Aktivatordomäne und dem kompletten Slk19 (bis auf die erste Aminosäure Methionin) exprimierten, konnte im „Two-Hybrid“-Versuch der Einfluss des *pre4-72* Konstrukts auf die Expression der β -Galaktosidase untersucht werden. Im Vergleich zu Zellen mit Pre4-Hybridproteinen war in Zellen mit Pre4-72 Hybridproteinen nach 24 Stunden die β -Galaktosidase Expression durch die Wechselwirkung mit Slk19 Hybriden stark beeinträchtigt. In Zellen mit den weiteren Kontrollplasmiden *CB362* (lexA-BD alleine), *pJZ6* (lexA-BD Prs2) sowie *CB440* (lexA-BD LaminC) konnte wie erwartet keine Transkriptionsaktivierung festgestellt werden (siehe Abb. 40).

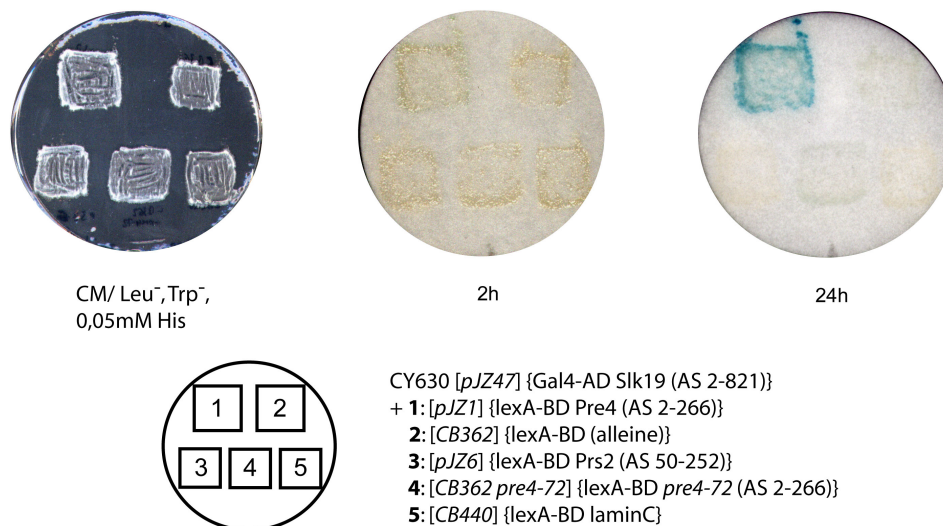


Abbildung 40: β -Galaktosidase- Filtertest: Test mit Kontrollplasmiden. In Transformanten mit *pJZ1* und *pJZ47* tritt wie erwartet Expression von β -Galaktosidase auf (1), In Transformanten mit *pJZ47* und jeweils den Kontrollplasmiden, die für die Expression der LexA DNA-Bindedomäne (BD) alleine (2), BD Prs2 (3), oder BD laminC (5) kodierte, wurde β -Galaktosidase nicht exprimiert. Die Transformation von *pJZ47* und *CB362 pre4-72* führte auch zu Zellen, in denen die β -Galaktosidase Expression stark beeinträchtigt war (4).

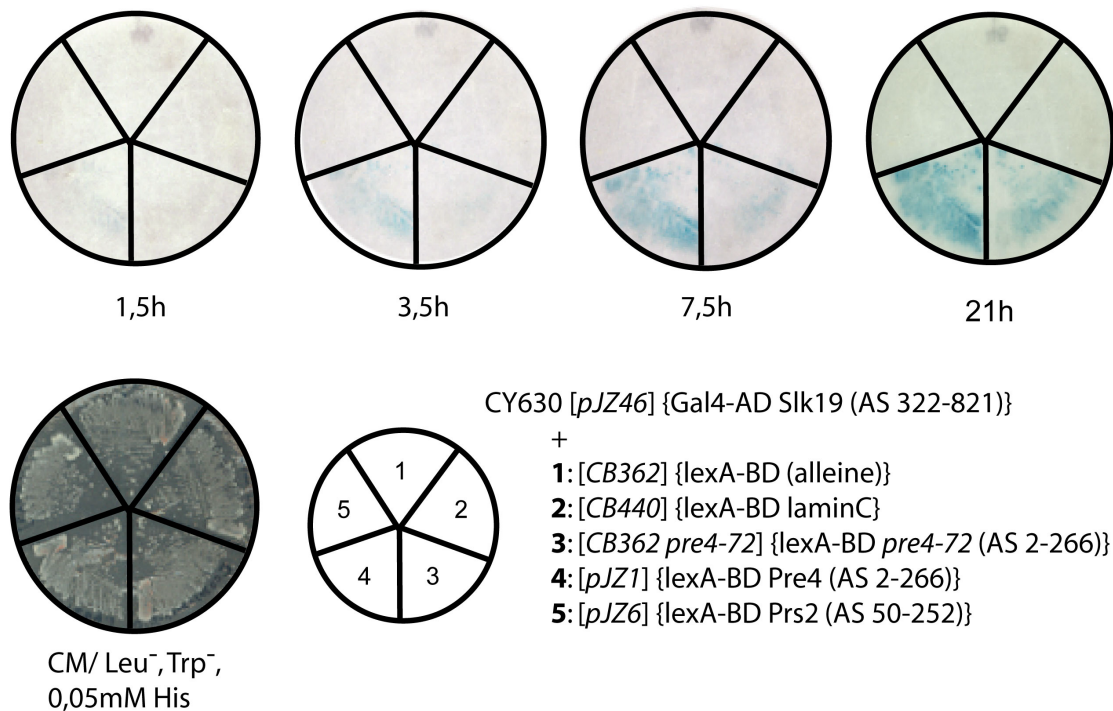


Abbildung 41: β-Galaktosidase- Filtertest: Test mit Kontrollplasmiden. In Transformanten mit *pJZ1* und *pJZ46* tritt schon nach 1,5 Stunden eine Expression von β-Galaktosidase auf (4), In Transformanten mit mit *pJZ46* und jeweils den Kontrollplasmiden, die nur eine LexA DNA-Bindedomäne enthielten (Negativkontrolle) (1), oder für BD-Prs2 (5), oder BD-laminC (2) kodierten, wurde β-Galaktosidase auch nach 21 Stunden nicht exprimiert. Die Kotransformation von *pJZ46* und *CB362 pre4-72* führte zu Zellen, in denen die β-Galaktosidase Expression im Vergleich zu Pre4 zwar beeinträchtigt aber nicht vollständig blockiert war (3).

Bei der Untersuchung von CY630 Transformanten, die durch das Plasmid *pJZ46* ein Hybridprotein mit der Gal4-Aktivator-domäne und lediglich einem C-terminalen Fragment von Slk19 (Aminosäuren 322-821) exprimierten, konnte im „Two-Hybrid“-Versuch die Beeinträchtigung der β-Galaktosidase Expression in Zellen mit Pre4-72 Hybridproteinen bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch dabei, dass die β-Galaktosidase Expression in Zellen die LexA-BD Pre4-72 und AD-Slk19 322-821 exprimieren nicht vollständig blockiert ist. Nach 3,5 Stunden bis 7,5 Stunden war in Klonen mit BD-Pre4 die Blaufärbung deutlich zu erkennen, während sich in Klonen mit LexA-BD Pre4-72 nur eine schwache Blaufärbung andeutete. Diese schwache *lacZ* Expression bestätigte sich dann nach 21 Stunden Inkubation. In den anderen Kontrollstämmen hingegen mit *CB362* (LexA-BD alleine), *pJZ6* (LexA-BD Prs2) sowie *CB440* (lexA-BD LaminC) war auch nach 21 h Inkubation keine Blaufärbung zu erkennen (siehe Abb. 41).

Kontrolle der „Two-Hybrid“-Wechselwirkung zwischen Pre4-72 Proteinen und Slk19 im Testerstamm Y190

Zur weiteren Bestätigung der vorangegangenen „Two-Hybrid“-Experimente wurde die Wechselwirkung zwischen Slk19 und *pre4-72* im System mit dem Testerstamm Y190 wiederholt. Dieser Stamm wurde zunächst mit den Plasmiden *pJZ46* (Fusion von Gal4-Aktivator-domäne mit C-terminalen Aminosäuren 322 bis 821 von Slk19) und *pJZ47* (Fusion von Gal4-Aktivator-domäne mit Aminosäuren 2 bis 821 von Slk19) transformiert, die für Fusionen von unterschiedlich großen C-terminalen Slk19 Fragmenten mit der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne kodieren (siehe 2.5.14 und 2.5.15). Dies erlaubte die Kontrolle, wie sich die unterschiedlich großen C-terminalen Fragmente von Slk19 auf die Wechselwirkung mit Pre4 und *pre4-72* auswirken. Die auf leucin-, lysin- und uracilfreien Selektionsplatten gewachsenen Transformanten wurden anschließend mit den Plasmiden *pAS1 pre4-72* (Gal4-BD Pre4-72 (*AS* 2-266)), *pAS2 pre4-72* (Gal4-BD Pre4-72 (*AS* 31-266)) und als Kontrollen mit den leeren Vektoren *pAS1* sowie *pAS2* (Gal4-BD alleine) als auch mit *pJZ3* (Gal4-BD Pre4) transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden als Kontrolle auf leucin-, tryptophan-, lysin und uracilfreien Selektionsplatten ausplattiert und anschließend für den „Two-Hybrid“-Test basierend auf der Expression von β -Galaktosidase 3-5 Tage auf CM/ Trp⁻, Leu⁻, 0,05 mM Histidin Medienplatten bei 30°C inkubiert. Nach Ausstreichen der Zellen auf einen Rundfilter, der auf der Agarschicht von Medienplatten der gleichen Zusammensetzung (CM/ Trp⁻, Leu⁻, 0,05 mM Histidin) lag und 2 Tage Inkubation bei 30°C wurden die auf dem Rundfilter gewachsenen Zellen auf die Expression der β -Galaktosidase durch Blaufärbung kontrolliert (Methode siehe 2.8.7). Für die Transformantenzellen von Y190, die durch die Plasmide *pJZ46*, *pJZ47* Hybridproteine mit der Gal4-Aktivator-domäne und dem C-terminalen Teil (Aminosäuren 322-821), bzw. dem kompletten Slk19 (bis auf die erste Aminosäure Methionin) exprimierten, konnte auch in diesem „Two-Hybrid“-Test eine starke Beeinträchtigung der Slk19-Pre4 Interaktion bei Anwesenheit der *pre4-72* Mutation anhand des Ausfalls der β -Galaktosidase Expression bestätigt werden. Im Vergleich zu Zellen mit Pre4 Hybridproteinen war in Zellen mit den Pre4-72 Hybridproteinen nach 24 Stunden keine β -Galaktosidase Expression festzustellen. In Zellen mit den weiteren Kontrollplasmiden *pAS1* (Gal4-BD alleine) sowie *pAS2* (Gal4-BD alleine) konnte ebenfalls, wie erwartet, keine Transkriptionsaktivierung des β -Galaktosidase Reportgens festgestellt werden (siehe Abb. 42).

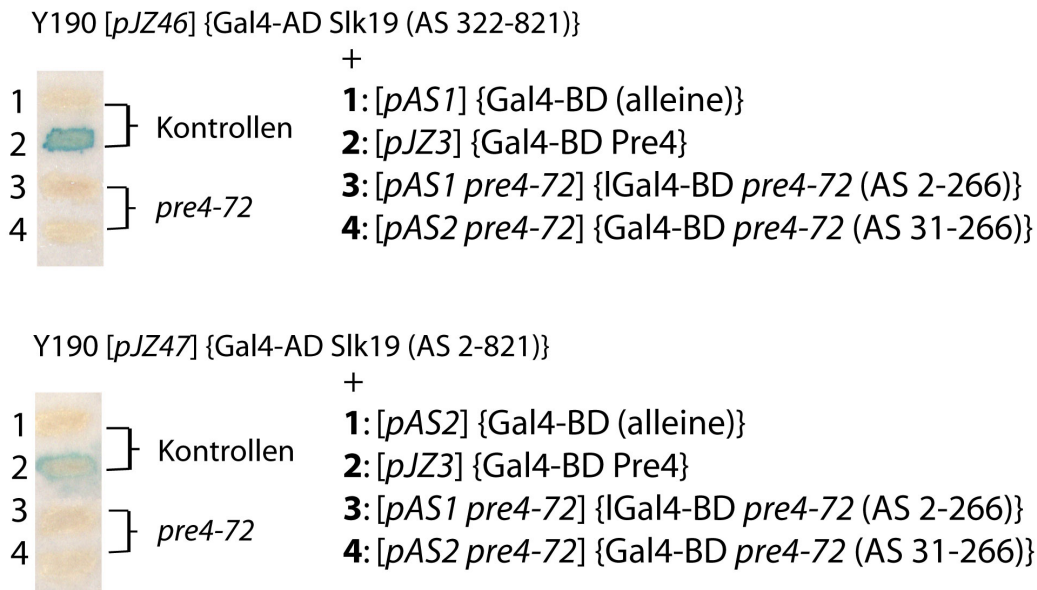


Abbildung 42: β -Galaktosidase- Filtertest: Test mit zwei verschiedenen Kontrollplasmiden, die unterschiedlich grosse *pre4-72*- Hybridproteine exprimieren. In Transformanten mit *pJZ3* und *pJZ46* bzw. *pJZ47* tritt, wie erwartet, die Expression von β -Galaktosidase auf (2), in Transformanten mit *pJZ46* und jeweils den Kontrollplasmiden *pAS1* bzw. *pAS2*, die für die Expression von der Gal4 DNA-Bindedomäne alleine (1) kodierten, wurde β -Galaktosidase auch nach 21 Stunden nicht exprimiert. Die Kotransformation von *pJZ46* und *pJZ47* mit *pAS1 pre4-72* (3) bzw. *pAS2 pre4-72* (4) führte zu Zellen, in denen keine β -Galaktosidase Expression durch Blaufärbung der Zellen festgestellt werden konnte (3, 4).

Die Ergebnisse aus den “Two-Hybrid“-Versuchen bestätigten einerseits, den von Zimmermann gefundenen Sachverhalt, dass die C-Termini von Slk19 und Pre4 für die Interaktion zwischen den beiden Proteinen verantwortlich sind und dass die Expression des Reportegens unabhängig von den verwendeten Vektoren auftritt (Zimmermann 1998). Andererseits konnte gezeigt werden, dass durch die *pre4-72* Mutationen M52L und M142K tatsächlich die Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 verhindert oder zumindest eine signifikante Hemmung der Wechselwirkung mit dem C-terminalen Fragment aus Aminosäuren 322-821 von Slk19 auftritt. Dieser Befund untermauerte die Ergebnisse der *in vitro* Experimente von Zimmermann, dass in Pulldown-Versuchen mit radioaktiv markiertem Pre4 Gst-Fusionsproteine mit komplettem Slk19 im Gegensatz zu Versionen mit C-terminal verkürztem Slk19 (Aminosäuren 322-821) keine Interaktion mit Pre4 nachwies (Zimmermann 1998). Weitere Aufklärung über die Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 sowie dem ganzen Proteasomenkomplex sollten deshalb Experimente über Co-Immunopräzipitationen liefern.

3.3 Immunopräzipitationsexperimente

Zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit bisher dargestellten Daten (unter 3.1 und 3.2) konnten affinitätschromatographische Experimente in der Arbeit von Zimmermann (Zimmermann 1998) die Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 *in vitro* nachweisen. Synthetische Effekte in *slk19Δ pre1-1* und in *slk19Δ pre4-1* Mutanten wiesen ebenfalls auf eine Interaktion des Proteasoms mit dem Slk19 Protein hin. Deshalb waren in anschließenden Arbeiten von Pfiz (Pfiz 1999) und Lisy (Lisy 2000) Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt worden, um weitere Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Slk19 und dem proteasomalen Komplex zu gewinnen. Dabei konnten in nativen anti-HA Immunopräzipitaten von YSP27 (*Slk19::HA₃*) tatsächlich Cim5, Pre6 und das 20S Proteasom gefunden werden. Versuche, die gefundenen Interaktionen zu reproduzieren, blieben jedoch erfolglos. Um die direkte Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom *in vivo* biochemisch zu beweisen, wurden in dieser Arbeit zusätzliche Immunopräzipitationsexperimente mit dem Stamm YSP27 (*Slk19::HA₃*) durchgeführt und mit Antikörpern gegen die proteasomalen Untereinheiten Cim5/Rpt1, Pre6 sowie gegen das 20S Proteasom im Präzipitat nach Interaktionspartnern von Slk19 gesucht.

3.3.1 Co-Immunopräzipitationen von Slk19(HA)₃ zeigen keine Interaktion zwischen Slk19 und den proteasomalen Untereinheiten Cim5, Pre6 und dem Gesamtproteasom (20S Proteasom)

Zur Erzeugung von Stamm YSP27 war im Wildtypstamm WCG das *SLK19* Stopkodon (TAA) durch das HA-Tridem und das *HIS5*-Markergen aus *S. pombe*, (entspricht dem *HIS3*-Gen aus *S. cerevisiae*) chromosomal ersetzt und die Funktionalität des *SLK19::HA₃::HIS5* Allels nachgewiesen worden (Pfiz 1999). Dies erlaubte die Selektion von YSP27 Zellen auf histidinfreiem Medium.

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Slk19 und dem Proteasomenkomplex wurde dann mit den Stämmen WCG4a und YSP27 (*SLK19::HA₃::HIS5*) einerseits eine denaturierende alkalische Lyse durchgeführt. Andererseits wurde Slk19(HA)₃ mit anti-HA Antikörper konjugierter Protein-A Sepharose unter nativen Bedingungen (Triton-X 100 Endkonzentration von 0,2 bis 1,0 %) sowie unter denaturierenden Bedingungen (2 % SDS, Triton-X Endkonzentration von 0,6 %) immunopräzipitiert. Im Präzipitat wurde dann nach Interaktionspartnern von Slk19 gesucht, indem die isolierten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen die proteasomalen Untereinheiten Cim5/Rpt1, Pre6 sowie gegen das 20S Proteasom unterzogen

wurden (Heinemeyer et al. 1997). In nativen anti-HA Immunopräzipitaten von ySP27 (*SLK19::HA₃*) konnten jedoch weder Cim5, Pre6 noch das Gesamtproteasom gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Als mögliche Ursache dafür wurde diskutiert, dass die Interaktion von Slk19 mit dem Proteasom nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus erfolgt. Darüber sollten Experimente mit synchronisierten Slk19(HA)₃ Klonen Klarheit verschaffen.

3.3.2 Co-Immunopräzipitationen mit synchronisierten Zellen

Für die Aufklärung der Interaktion zwischen Slk19 und dem Proteasom wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt: Einerseits wurde wie unter 3.3.1 in nativen anti-HA Immunopräzipitaten synchronisierter Slk19(HA)₃-Zellen mit Antikörpern nach proteasomalen Untereinheiten gesucht. Andererseits wurde in nativen anti-ProtA Immunopräzipitaten synchronisierter Pre6-ProtA Slk19(HA)₃-Zellen mit dem HA-Antikörper nach Slk19(HA)₃ gesucht. Um Proteasomen präzipitieren zu können wurde der Stamm WCG-ProtA (C. Enenkel) verwendet, der mit dem ProteinA-Epitop versehene Pre6-Untereinheiten des Proteasoms exprimiert und über sein *HIS3* Markergen die Selektion ermöglicht. Um temperaturabhängig synchronisierbare Stämme zu erzeugen wurden die zwei Mutantenstämme y859 (*cdc5-1*) bzw. y2596 (*cdc15-2*) (A. Amon) verwendet, die bei restriktiver Temperatur (37°C) einen Arrest der Zellen in der Anaphase bewirken und beim Wechsel auf permissive Temperatur (25°C) den weiteren Fortlauf im Zellzyklus ermöglichen.

Erzeugung von *SLK19::HA₃ cdc5-1*-Doppelmутanten

Durch Kreuzung von Stamm ySP26 (*MAT α SLK::HA₃*) gegen y859 (*cdc5-1*) konnte ein heterozygot diploider Stamm YJJ52 (*MAT α /MAT α cdc5-1/CDC5 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19*) erzeugt werden. Nach der Sporulation von YJJ52 konnten die entstandenen Tetraden auf YPD-Platten dissektiert werden. Sämtliche Tetradensporen wurden auf YPD- und histidinfreies Medium replikaplatziert und bei 25°C sowie 37°C inkubiert, um sie auf die Präsenz des *SLK19::HA₃::HIS5* Allels sowie die Temperatursensitivität der *cdc5-1* Mutante zu testen. Die selektierten Doppelmутanten aus der Sporulation von YJJ52 wurden mit YJJ53 (*MAT α cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) und YJJ54 (*MAT α cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) bezeichnet und für die weiteren Experimente verwendet.

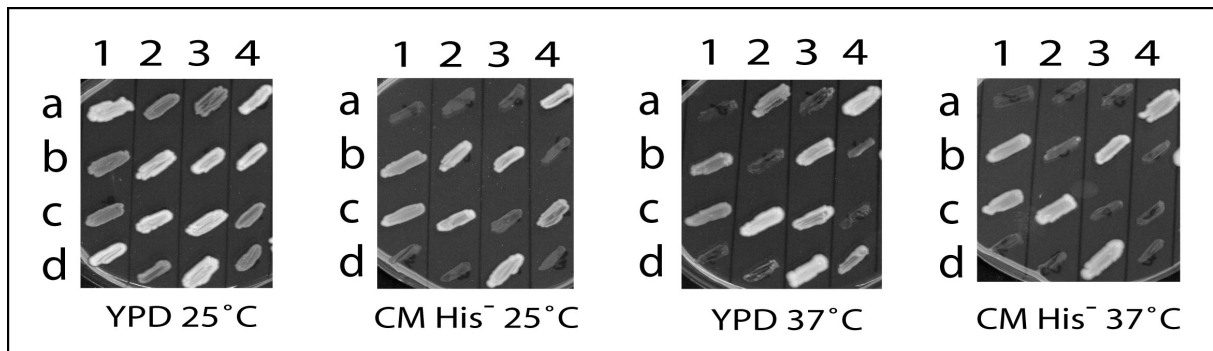


Abbildung 43: Tetradenanalyse von Sporen aus YJJ52. In jeder Spalte (1-4) wurden Zellen einer kompletten Tetrade (Zeile a-d) auf YPD- sowie histidinfreiem Agaroseplatten ausgestrichen und bei 25°C sowie 37°C inkubiert.

Erzeugung von *SLK19::HA₃ cdc15-2*-Doppelmутanten

Durch Kreuzung von Stamm ySP26 (*Mat α SLK::HA₃*) gegen y2596 (*Mat α cdc15-2*) konnte der heterozygot diploide Stamm YJJ55 (*MAT α /MAT α cdc15-2/CDC15 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19*) erzeugt werden. Nach Sporulation von YJJ55 konnten die entstandenen Tetraden auf YPD-Platten vereinzelt werden. Sämtliche Tetradensporen wurden auf YPD- und histidinfreies Medium ausgestrichen und bei 25°C sowie 37°C inkubiert, um sie auf die Präsenz des *SLK19::HA₃::HIS5* Allels sowie die Temperatursensitivität der *cdc15-2* Mutante zu testen. Die selektierten Doppelmутanten aus der Sporulation von YJJ55 wurden nach der Kontrolle des Geschlechtstyps mit YJJ56 (*MAT α cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) und YJJ57 (*MAT α cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) bezeichnet und für die weiteren Experimente verwendet.

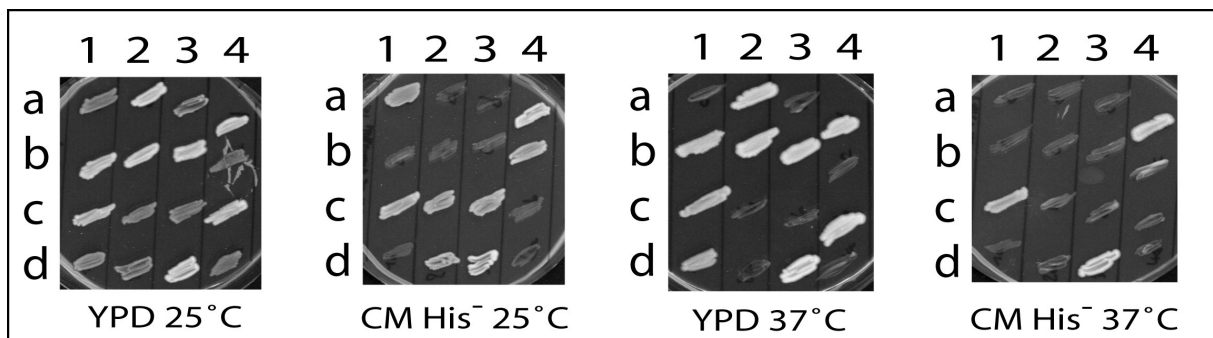


Abbildung 44: Tetradenanalyse von Sporen aus YJJ55. In jeder Spalte (1-4) wurden Zellen einer kompletten Tetrade (Zeile a-d) auf YPD- sowie histidinfreiem Agaroseplatten ausgestrichen und bei 25°C sowie 37°C 3 Tage inkubiert.

Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1*-Mutanten

Nach Kreuzung von Stamm YJJ54 (*MAT α cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) gegen WCG-ProtA (*Mata PRE6::PROTA::HIS3*) konnte ein heterozygot diploider Stamm YJJ60 (*MAT α /MAT α cdc5-1/CDC5 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19 PRE6::PROTA::HIS3/PRE6*) erzeugt werden. Nach Sporulation von YJJ60 konnten die entstandenen Tetraden auf YPD-Platten dissektiert werden. Sämtliche Tetraden wurden auf YPD- und histidinfreies Medium replikaplatziert und bei 25°C sowie 37°C inkubiert, um sie auf die Präsenz des *SLK19::HA₃::HIS5* Allels, des *PRE6::PROTA::HIS3* Allels sowie die Temperatursensitivität der *cdc5-1* Mutante zu testen. Anhand des Segregationsmusters der 2:2 Verteilung von gewachsenen und nicht gewachsenen Sporen auf histidinfreiem Medium, das histidinprototrophe nicht parentale Dityp-Tetraden anzeigt, wurden Sporenklone mit *Slk19(HA)₃* und *Pre6ProtA* Konstrukt. Die Expression von *Slk19(HA)₃* und *Pre6ProtA* wurde anschließend durch Immunoblotanalyse kontrolliert. Dazu wurden durch alkalische Lyse (Gesamtzellmenge: 3 OD; siehe Abschnitt 2.8.1) Proteine aus den Zellen von kompletten Tetraden extrahiert, in Lämmli-puffer gelöst und durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde *Slk19(HA)₃* mit Antikörpern (anti-HA Maus-Primärantikörper, Verdünnung 1:5000; anti-Maus Peroxidase-konjugierter Ziege-Sekundärantikörper, Verdünnung 1:5000) identifiziert. *Pre6-ProtA* und *Pre6* wurden mit Antikörpern (anti-*Pre6* Kaninchen-Primärantikörper, Verdünnung 1:3000; anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Ziege-Sekundärantikörper, Verdünnung: 1:5000) identifiziert (siehe Abb.45). Die selektierten Sporen 2d bzw. 8b aus YJJ60 (siehe Abb.45) wurden nach Kontrolle des Geschlechtstyps als YJJ58 (*Mata cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bzw. YJJ59 (*Mata cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bezeichnet. Die Spore 8d aus YJJ60 erhielt nach Kontrolle des Geschlechtstyps die Bezeichnung YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*). Auffällig war bei der Entwicklung mit HA-Antikörpern das Auftreten von starken Kreuzreaktionen, die die *Slk19(HA)₃* Signale überlagern und deren Detektion erschweren.

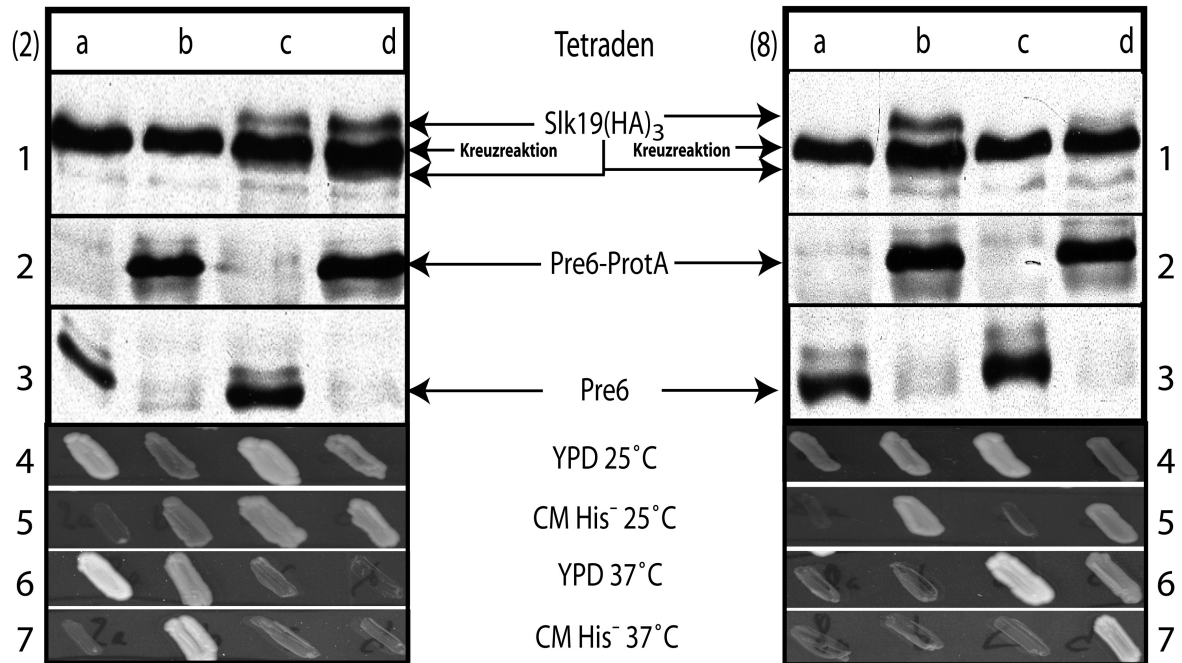


Abbildung 45: Kontrolle von 2 kompletten Tetraden aus YJJ60 (2a-d bzw. 8a-d). Linke Spalte (2a-d): In Zeilen 1-3 ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der Tetradensporen von YJJ60-(2) (Spalten a-d) dargestellt: Kontrolle der Expression von Slk19(HA)₃ (Zeile 1), Pre6 ProtA (Zeile 2) und Pre6 (Zeile 3). In den Zeilen 4-7 wurden jeweils die Sporen der kompletten Tetrade YJJ60-(2) (Spalten a-d) auf YPD- sowie histidinfreiem Agaroseplatten ausgestrichen und bei 25°C sowie 37°C 3 Tage inkubiert. Rechte Spalte (8a-d): In Zeilen 1-3 ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der Tetradensporen von YJJ60-(8) (Spalten a-d) dargestellt: Kontrolle der Expression von Slk19(HA)₃ (Zeile 1), Pre6 ProtA (Zeile 2) und Pre6 (Zeile 3). In den Zeilen 4-7 wurden jeweils die Sporen der kompletten Tetrade YJJ60-(8) (Spalten a-d) auf YPD- sowie histidinfreiem Agaroseplatten ausgestrichen und 3 Tage bei 25°C sowie 37°C inkubiert.

Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-2*-Mutanten

Nach Kreuzung von Stamm YJJ57 (*MAT α cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) gegen WCG-ProtA (*Mata PRE6::PROTA::HIS3*) konnte ein heterozygot diploider Stamm YJJ61 (*MAT α /MAT α cdc15-2/ CDC15 SLK19::HA₃::HIS5/SLK19 PRE6::PROTA::HIS3/PRE6*) erzeugt werden. Nach Sporulation von YJJ61 konnten die entstandenen Tetraden auf YPD-Platten dissektiert werden. Sämtliche Tetraden wurden auf YPD- und histidinfreies Medium replikaplatziert und bei 25°C sowie 37°C inkubiert, um sie auf das *SLK19::HA₃::HIS5* Allel, das *PRE6::PROTA::HIS3* Allel sowie die Temperatursensitivität der *cdc15-2* Mutante zu testen. Das Segregationsmuster der 2:2 Verteilung von gewachsenen und nicht gewachsenen Sporen auf histidinfreiem Medium, das histidinprototrophe nicht parentale Dityp-Tetraden anzeigt, erlaubte die Identifizierung der Sporen mit Slk19(HA)₃ und Pre6ProtA Konstrukt. Die Expression von Slk19(HA)₃ und Pre6 ProtA wurde anschließend durch Immunoblotanalyse

kontrolliert. Dazu wurden durch alkalische Lyse (Gesamtzellmenge: 3 OD; siehe Abschnitt 2.8.1) Proteine aus den Zellen von kompletten Tetraden extrahiert, in Lämmli-Puffer gelöst und durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

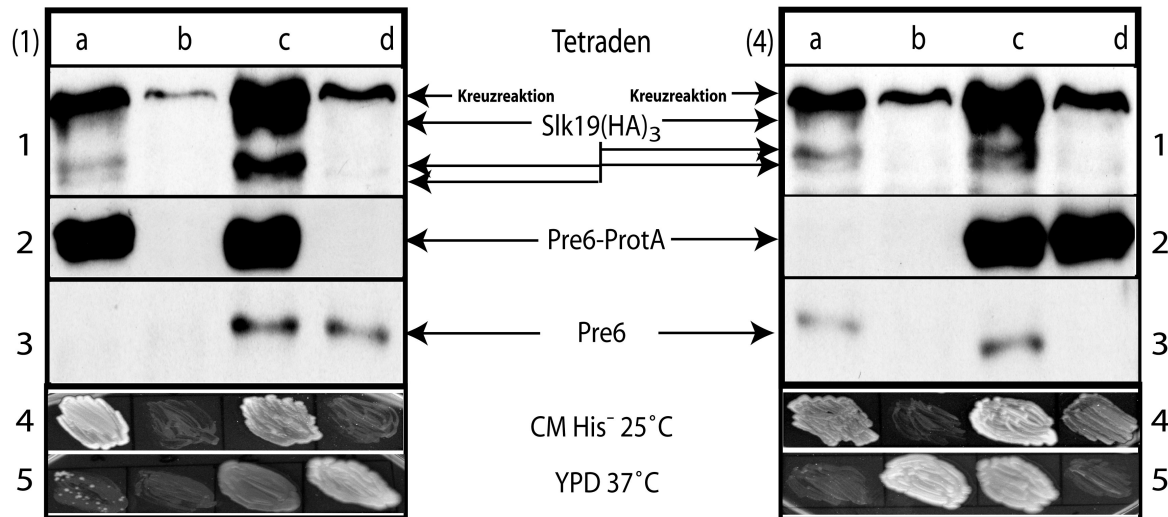


Abbildung 46: Kontrolle von 2 kompletten Tetraden aus YJJ61 (1a-d bzw. 4a-d). Linke Spalte (1a-d): In Zeilen 1-3 ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der Tetradensporen von YJJ61-(1) (Spalten a-d) dargestellt: Kontrolle der Expression von Slk19(HA)₃ (Zeile 1), Pre6 ProtA (Zeile 2) und Pre6 (Zeile 3). In den Zeilen 4 und 5 wurden jeweils die Sporen der kompletten Tetrade YJJ61-(1) (Spalten a-d) auf histidinfreiem Agaroseplatten bei 25°C sowie auf YPD-Medium bei 37°C 3 Tage inkubiert. Rechte Spalte (4a-d): In Zeilen 1-3 ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der Tetradensporen von YJJ61-(4) (Spalten a-d) dargestellt: Kontrolle der Expression von Slk19(HA)₃ (Zeile 1), Pre6 ProtA (Zeile 2) und Pre6 (Zeile 3). In den Zeilen 4 und 5 wurden jeweils die Sporen der kompletten Tetrade YJJ61-(4) (Spalten a-d) auf histidinfreiem Agaroseplatten bei 25°C sowie auf YPD-Medium bei 37°C 3 Tage inkubiert.

Nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde Slk19(HA)₃ mit Antikörpern (anti-HA Maus-Primärantikörper, Verdünnung 1:5000; anti-Maus Peroxidase-konjugierter Ziege-Sekundärantikörper, Verdünnung 1:5000) identifiziert. Pre6-ProtA und Pre6 wurden mit Antikörpern (anti-Pre6 Kaninchen-Primärantikörper, Verdünnung 1:3000; anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Ziege-Sekundärantikörper, Verdünnung: 1:5000) identifiziert. Die selektierten Mutanten aus den Tetradensporen von YJJ61 wurden nach Kontrolle des Geschlechtstyps mit YJJ62 (*Mata cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bzw. YJJ63 (*Mata cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*), YJJ66 (*MATα cdc15-2 PRE6::PROTA::HIS3*) sowie YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bezeichnet und für die weiteren Experimente verwendet. Auch hier traten bei der Entwicklung mit HA-

Antikörper starke Kreuzreaktionen auf, die durch Überlagerung der Slk19(HA)₃ Signale deren Detektion erschweren.

Co-Immunopräzipitationen mit Slk19(HA)₃ von synchronisierten Zellen können Interaktion zwischen Slk19 und dem Proteasom nicht bestätigen

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Slk19 und dem Proteasomenkomplex mit synchronisierten Zellen wurden zur Expressionskontrolle nach dem Arrest bei 37°C zunächst eine denaturierende alkalische Lyse durchgeführt. Dazu wurden die Stämme y859 (*cdc5-1*)(als Kontrolle) und YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) bzw. y2596 (*cdc15-2*)(als Kontrolle) und YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) in entsprechendem Selektionsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD 1,5) bei permissiver Temperatur (25°C) und dann zur Synchronisation der Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme von einer Probe (3 OD Zellen) wurden die restlichen Zellen in Selektionsmedium mit permissiver Temperatur (25°C) überführt und 4 Stunden weiter inkubiert. Danach erfolgte die Probennahme (3 OD Zellen) in Abständen von 30 Minuten. Nach Isolierung und Auftrennung der Proteine von YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) über SDS-Gelelektrophorese, konnte durch Immunoblotanalyse mit HA-Antikörper das Auftreten von 4 Signalbanden, die verschiedenen Formen von Slk19(HA)₃ zugeordnet wurden, identifiziert werden: Eine schwächere Bande bei ca. 130 kDa (posttranslational durch Phosphorylierung modifiziertes Slk19(HA)₃), eine klare Doppelbande bei ca. 120 kDa (prozessiertes, phosphoryliertes und prozessiertes dephosphoryliertes Slk19(HA)₃) sowie eine deutliche Bande bei ca. 98 kDa (nicht modifiziertes, neu synthetisiertes oder weiter degradiertes Slk19(HA)₃) (Abb. 47). Nach 4 Stunden Arrest bei 37°C konnte das Fehlen des prozessierten dephosphorylierten Slk19(HA)₃-Signals festgestellt werden, das nach 30 Minuten Inkubation bei permissiver Temperatur wieder erscheint. Im Verlauf der 4 Stunden ist zu erkennen, dass die Signale aller Modifikationen von Slk19(HA)₃ einem Zellzyklus bedingten Wechsel durch Konzentrationsänderungen der Slk19(HA)₃-Modifikationen unterliegen. Das 130 kDa Signal des posttranslational durch Phosphorylierung modifizierten Slk19(HA)₃ verschwindet sogar nach 240 Minuten.

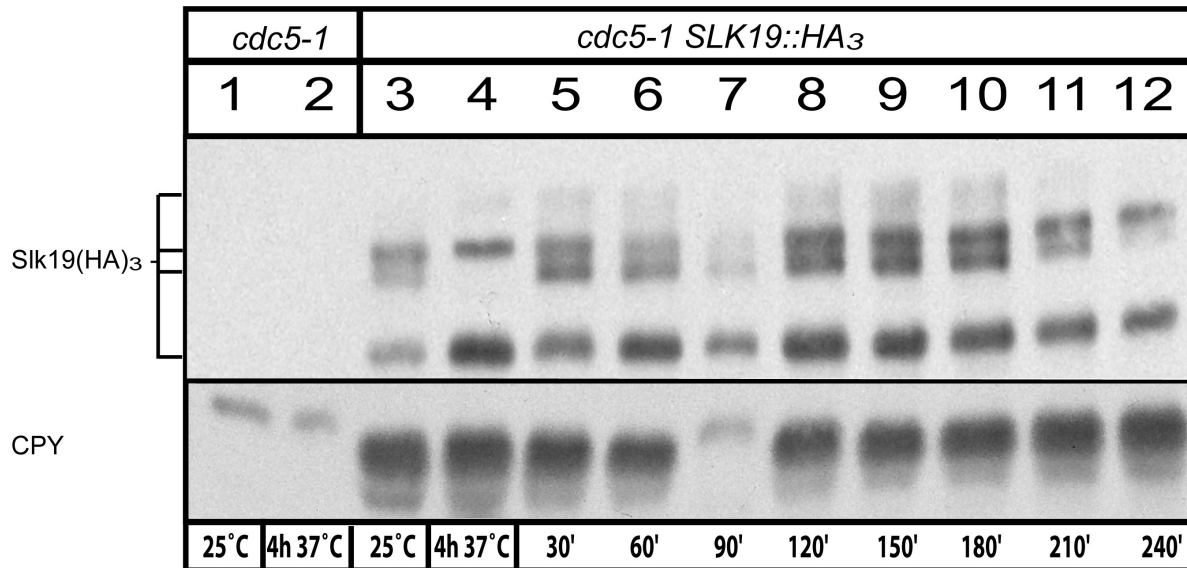


Abbildung 47: anti-HA Immunoblotanalyse mit synchronisierten YJJ53 Zellen. Aufgetragen wurden die aus der alkalischen Lyse erhaltenen Proteine. Spur1: Nicht synchronisierte Kontrolle y859 (*cdc5-1*) bei 25°C, Spur2: Kontrolle y859 (*cdc5-1*) nach 2h Synchronisation bei 37°C, Spur3: Nicht synchronisierte Kontrolle YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) bei 25°C, Spur4: YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C, Spur5-12: YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C und weiterer Inkubation bei permissiver Temperatur (25°C) für 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 Minuten.

Für synchronisierte Zellen des Stamms YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) konnte ähnliches Verhalten für das Auftreten der Slk19(HA)₃-Modifikationen während einer Zeitspanne von 4 Stunden festgestellt werden: Man findet eine schwächere Bande bei ca. 130 kDa (posttranslational durch Phosphorylierung modifiziertes Slk19(HA)₃), eine klare Doppelbande bei ca. 120 kDa (prozessiertes, phosphoryliertes und prozessiertes dephosphoryliertes Slk19(HA)₃) sowie eine deutliche Bande bei ca. 98 kDa (nicht modifiziertes, neu synthetisiertes oder weiter degradiertes Slk19(HA)₃) (siehe Abb. 48). Nach 4 Stunden Arrest bei 37°C konnte ebenso das Fehlen des prozessierten dephosphorylierten Slk19(HA)₃-Signals festgestellt werden, das nach 30 Minuten Inkubation bei permissiver Temperatur wieder erscheint und zwischen 210 und 240 Minuten erneut verschwindet. Im Verlauf der 4 Stunden nach der Synchronisation und Wachsen bei permissiver Temperatur ist zwischen 30 und 60 Minuten ebenfalls die Abnahme sowie zwischen 210 und 240 Minuten das Auftauchen des Slk19(HA)₃-Signals mit dem höchsten Molekulargewicht (130 kDa) für das posttranslational durch Phosphorylierung modifizierte Slk19(HA)₃ zu erkennen. Das Zellzyklus abhängige Auftreten aller Modifikationen von Slk19(HA)₃ konnte auch hiermit weiter bestätigt werden.

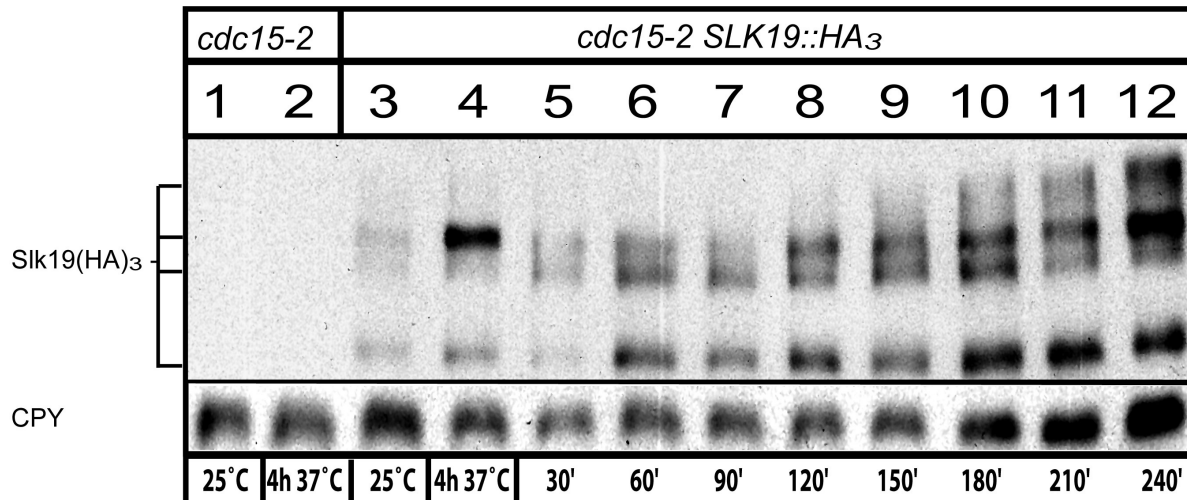


Abbildung 48: anti-HA Immunoblotanalyse mit synchronisierten YJJ56 Zellen. Aufgetragen wurden die aus der alkalischen Lyse erhaltenen Proteine. Spur1: Nicht synchronisierte Kontrolle y2596 (*cdc15-2*) bei 25°C, Spur2: Kontrolle y2596 (*cdc15-2*) nach 2h Synchronisation bei 37°C, Spur3: Nicht synchronisierte Kontrolle YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) bei 25°C, Spur4: YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C, Spur5-12: YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C und weiterer Inkubation bei permissiver Temperatur (25°C) für 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 Minuten.

Für die Co-Immunopräzipitationsexperimente wurden dann wiederum y859 (*cdc5-1*) (als Kontrolle) und YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) bzw. y2596 (*cdc15-2*) (als Kontrolle) und YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) in entsprechendem Selektionsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD 1,5) bei permissiver Temperatur (25°C) und dann zur Synchronisation der Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Vor und nach dem Transfer der Zellen auf 25°C-Medium wurde Slk19(HA)₃ mit anti-HA Antikörper konjugierter Protein-A Sepharose unter nativen Bedingungen (Triton-X 100 Endkonzentration von 0,2 bis 1,0 %) sowie unter denaturierenden Bedingungen (2 % SDS, Triton-X Endkonzentration von 0,6 %) immunopräzipitiert. Im Präzipitat wurde dann nach Interaktionspartnern von Slk19 gesucht, indem die isolierten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen die proteasomalen Untereinheiten Cim5, Pre6 sowie gegen den Gesamtproteasomkomplex (20S Proteasom) unterzogen wurden. In nativen anti-HA Immunopräzipitaten von YJJ53 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5*) und YJJ56 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5*) konnten jedoch weder Cim5, Pre6 noch das 20S Proteasom gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Co-Immunopräzipitationen mit Pre6-ProtA von synchronisierten Zellen zeigen Interaktion zwischen dem Proteasom und Slk19

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Slk19 und dem Proteasomenkomplex mit synchronisierten Zellen wurden zur Expressionskontrolle nach der Synchronisation bei 37°C zunächst eine denaturierende alkalische Lyse durchgeführt. Dazu wurden die Stämme YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) und YJJ62 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) mit dem nichtsynchronisierbaren (*CDC5* bzw. *CDC15* Wildtyp) Kontrollstamm YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) in entsprechendem Selektionsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD 1,5) bei permissiver Temperatur (25°C) und dann zur Synchronisation der Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme von einer Probe (3 OD Zellen) wurden die restlichen Zellen in Selektionsmedium bei permissiver Temperatur (25°C) überführt und 4 Stunden weiter inkubiert. Danach erfolgte die Probennahme (3 OD Zellen) in Abständen von 30 Minuten. Nach Isolierung und Auftrennung der Proteine von YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) über SDS-Gelelektrophorese, konnte durch Immunoblotanalyse mit HA-Antikörper wieder das Auftreten von 4 Signalbanden, die dem Slk19(HA)₃ zugeordnet wurden, identifiziert werden. Eine schwächere Bande bei ca. 130 kDa (posttranslational durch Phosphorylierung modifiziertes Slk19(HA)₃), eine klare Doppelbande bei ca. 120 kDa (prozessiertes, phosphoryliertes und prozessiertes dephosphoryliertes Slk19(HA)₃), eine deutliche Bande bei ca. 98 kDa (nicht modifiziertes, neu synthetisiertes oder weiter degradiertes Slk19(HA)₃) wie in Abb. 49 (unten) dargestellt.

Nach 4 Stunden Arrest bei 37°C konnte wieder das Fehlen des prozessierten dephosphorylierten Slk19(HA)₃-Signals festgestellt werden, das hier nach 30 Minuten Inkubation bei permissiver Temperatur wieder erscheint und nach 90 Minuten verschwindet. Das 130 kDa Signal des posttranslational durch Phosphorylierung modifizierten Slk19(HA)₃ verschwindet bei 210 Minuten. Zusätzlich war hier die Zunahme des 130 kDa Signals zwischen 60-120 Minuten und danach seine Abnahme zu sehen. Im Verlauf der 4 Stunden ist also wieder zu erkennen, dass die Signale aller Modifikationen von Slk19(HA)₃ einem Zellzyklus bedingten Wechsel durch Konzentrationsänderungen der Slk19(HA)₃-Modifikationen unterliegen (siehe Abb.49).

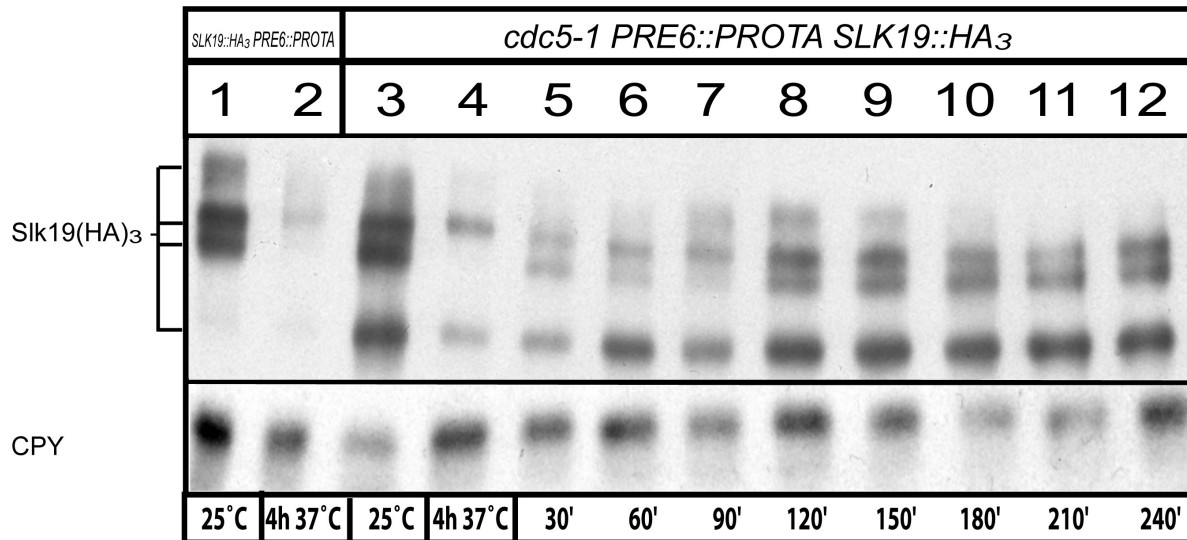


Abbildung 49: anti-HA Immunoblotanalyse mit synchronisierten YJJ58 Zellen. Aufgetragen wurden die aus der alkalischen Lyse erhaltenen Proteine. Spur1: Kontrolle YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bei 25°C, Spur2: Kontrolle YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) nach 2h bei 37°C, Spur3: Nicht synchronisierte Kontrolle YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bei 25°C, Spur4: YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C, Spur5-12: YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) nach 4 Stunden Synchronisation bei 37°C und weiterer Inkubation bei permissiver Temperatur (25°C) für 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 Minuten.

Für synchronisierte Zellen des Stamms YJJ62 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) konnte wieder vergleichbares Verhalten für das Auftreten der Slk19(HA)₃-Modifikationen während einer Zeitspanne von 4 Stunden festgestellt werden (Daten nicht gezeigt, vergleichbar mit Abb. 48).

Für die Co-Immunopräzipitationsexperimente wurden jeweils die Sporen der kompletten Tetrade YJJ60-(8a-d) sowie YJJ61-(1a-d) aus denen YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) bzw. YJJ62 (*cdc15-2 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) selektiert worden waren (siehe 3.3.2: Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1*-Mutanten bzw. Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-2*-Mutanten) in entsprechendem Selektionsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD 1,5) bei permissiver Temperatur (25°C) und dann zur Synchronisation der Zellen für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Vor und nach dem Transfer der Zellen auf 25°C-Medium wurden dann entsprechende Zellmengen (50-200 OD) entnommen und Proteasomen über Pre6-ProtA mit IgG-Sepharose (IgG aus Kaninchen konjugiert an Sepharose: IgG_{Kaninchen} bindet stark an Protein A) unter nativen Bedingungen (Triton-X 100 Endkonzentration von 0,2 bis 1,0 %) immunopräzipitiert. Im Präzipitat wurde dann nach den Interaktionspartnern der isolierten

Proteasomen, speziell nach Slk19(HA)₃, gesucht, indem die isolierten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen das HA-Epitop bzw. gegen Pre6, Pre2 oder Pre4 als Kontrolle unterzogen wurden.

Dabei konnte in einem synchronisierten Klon YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) nach Arrest bei 37°C ein sehr schwer erkennbares (Daten nicht gezeigt) und bei einem nicht synchronisierten Klon YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) ein Slk19(HA)₃-Signal identifiziert werden.

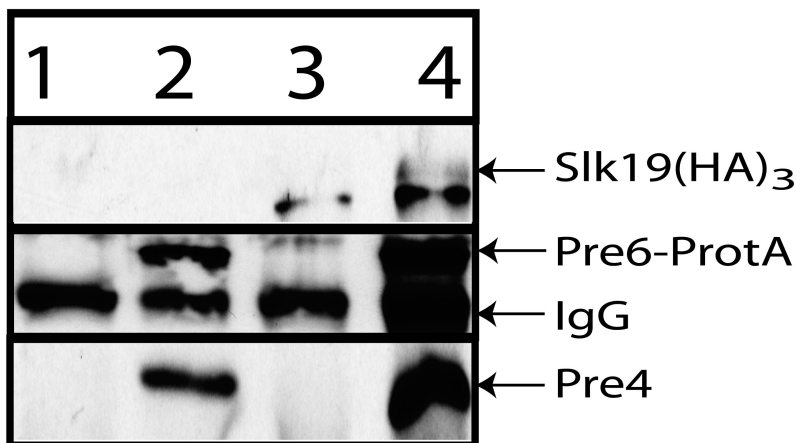


Abbildung 50: Native Immunopräzipitation. Aufgetragen wurden die Immunopräzipitate (mit IgG-Sepharose) aus Sporen der kompletten Tetrade von YJJ60 (Tetradensporen 8a-d; (siehe Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1* Mutanten)). Spur 1: Spore 8a (*cdc5-1*) synchronisiert, Spur 2: Spore 8b (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1*) synchronisiert, Spur 3: Spore 8c Wildtyp, Spur 4: Spore 8d (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃*)

Beim Vergleich der Spur 4 mit den Spuren 1-3 zeigte sich jedoch ein großer Ladungsunterschied. Dies deutete darauf hin, dass sehr viele Proteasomen präzipitiert werden müssen, um eine Interaktion mit Slk19 nachweisen zu können. Im Vergleich dazu konnte in Spur 2, wo die IP des synchronisierten Klons YJJ58 (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) aufgetragen wurde, kein Slk19(HA)₃-Signal gefunden werden. Im synchronisierten Klon mit selbem Genotyp (*cdc5-1 SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) aus einer anderen YJJ60 Tetrade (2a-d, siehe Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc5-1* Mutanten) konnte jedoch wie schon beschrieben ein sehr schwaches, kaum erkennbares Slk19(HA)₃-Signal gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Zellen des Stamms YJJ67 (*SLK19::HA₃::HIS5 PRE6::PROTA::HIS3*) aus der Tetrade YJJ61-1 (1a-d, siehe Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-1* Mutanten), war es nach 4h Inkubation bei 37°C wiederum möglich, ein Slk19(HA)₃-Signal nach der

Immunpräzipitation zu finden. Die Detektion wurde jedoch stark durch Kreuzreaktionen des HA-Antikörpers behindert, wie schon bei den Kontrollen der erzeugten *cdc15-2*-Tetradensporen gezeigt (vergleiche Abb. 46). Durch das Auftreten von starken Kreuzreaktionen (siehe Abb.51 a, b), war es deshalb auch schwierig die Signale genauer einer bestimmten Modifikation von Slk19(HA)₃ zuzuordnen. Die Verwendung großer Zellmengen (200 OD) war wieder notwendig, um wie in bei der Spore YJJ60-8d (Abb. 50) ein Slk19(HA)₃-Signal zu detektieren.

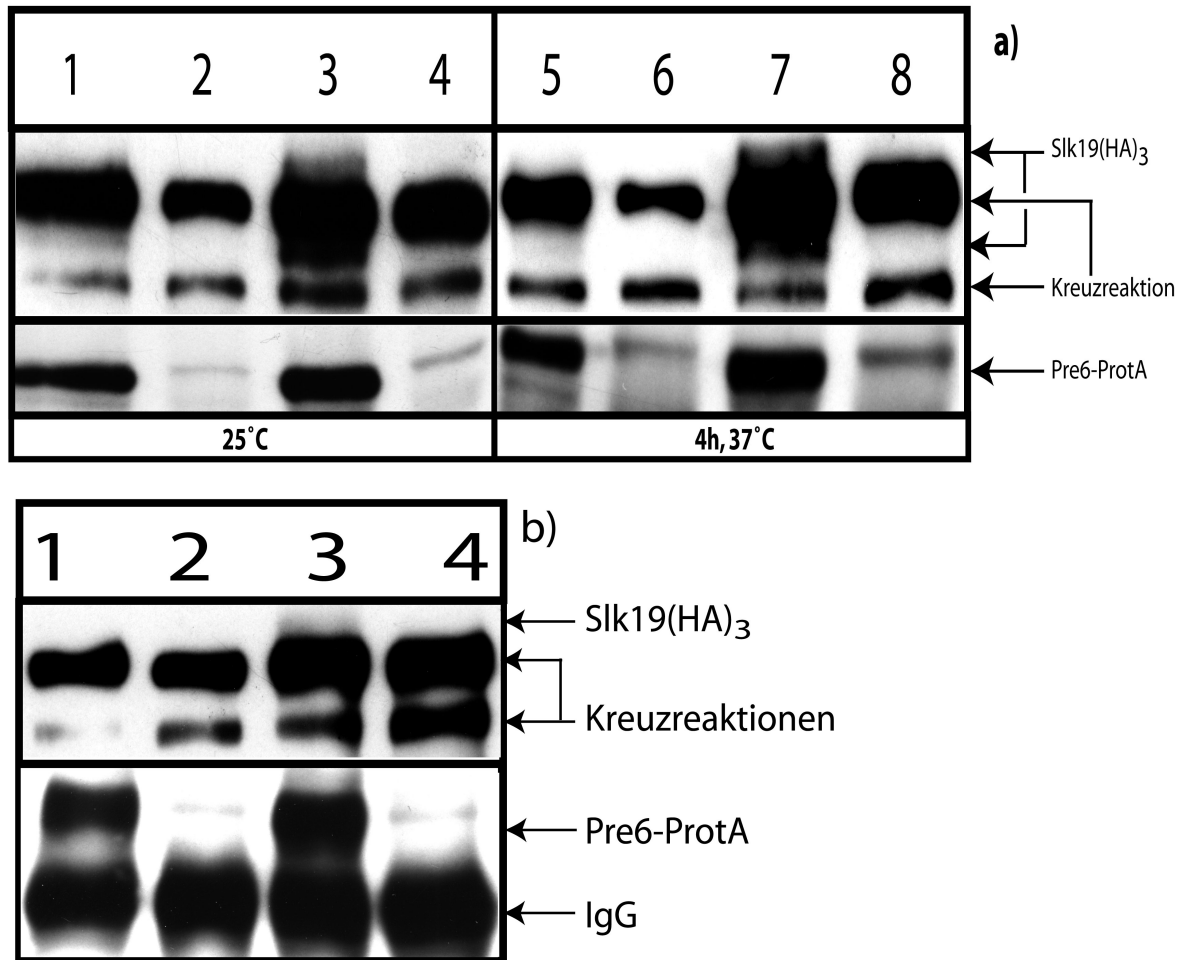


Abbildung 51: Alkalische Lyse und native Immunopräzipitation von YJJ61-1 Sporen. (a) Auftgetragen wurden die alkalischen Lysate aus den bei 25°C inkubierten Sporen der kompletten Tetrade YJJ61-1 (Tetradensporen 1a-d; (siehe 3.3.2: Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-2* Mutanten)). Spur 1: Spore 1a (*cdc15-2 PRE6::ProtA SLK19::HA₃*), Spur 2: Spore 1b (*cdc15-2*), Spur 3: Spore 1c (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃*), Spur 4: Spore 1d, Wildtyp; Spur 5-8: Alkalische Lysate der Tetradensporen von YJJ61-1 (1a-d) nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C; Spur 5: Spore 1a (*cdc15-2 PRE6::ProtA SLK19::HA₃*), Spur 6: Spore 1b (*cdc15-2*), Spur 7: Spore 1c (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃*), Spur 8: Spore 1d, Wildtyp; (b) Auftgetragen wurden die Immunopräzipitate (mit IgG-Sepharose) aus Sporen der kompletten Tetrade YJJ61-1 (Tetradensporen 1a-d; (siehe 3.3.2: Erzeugung von *PRE6::ProtA SLK19::HA₃ cdc15-2* Mutanten)). Spur 1: Spore 1a (*cdc15-2 PRE6::ProtA SLK19::HA₃*) synchronisiert, Spur 2: Spore 1b (*cdc15-2*) synchronisiert, Spur 3: Spore 1c (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃*), Spur 4: Spore 1d, Wildtyp.

Die Slk19(HA)₃-Signale der Immunoblots aus nicht synchronisierten alkalischen Lysen wiesen in Spur 1 und Spur 3 auf jeweils zwei Slk19-Modifikationen eine über und eine unter der Kreuzreaktion hin, die in den beiden Sporen 1a und 1c jedoch in unterschiedlicher Konzentration vorhanden waren (siehe Abb. 51a). In Spur 5 mit der synchronisierten Spore 1a (YJJ62 (*cdc15-2 PRE6::ProtA SLK19::HA₃*)) konnte wie erwartet das Verschwinden des unteren Slk19(HA)₃-Signals beobachtet werden, während in Spur 7 beide Modifikationen sichtbar blieben (siehe Abb. 51a). Im Vergleich mit den alkalischen Lysen konnte nur in Spur 3 mit der Spore 1c (YJJ67 (*PRE6::ProtA SLK19::HA₃*)) der Immunpräzipitation das Slk19(HA)₃-Signal über der Kreuzreaktion gefunden werden. Dies wies darauf hin, dass möglicherweise nur die posttranslational modifizierten, also phosphorylierten, Modifikationen von Slk19 für die Interaktion mit dem Proteasom verantwortlich sein könnten. Um weiter zu kontrollieren, zu welchem Zeitpunkt nach der Synchronisation von YJJ62 Zellen (*cdc15-2 PRE6::ProtA SLK19::HA₃*) die Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom stattfindet, wurden weitere Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden synchronisierte YJJ62 Zellen (4h 37°C) für 4 Stunden bei 25°C inkubiert und in Abständen von 30 Minuten jeweils eine Probe (200 OD Zellen) entnommen.

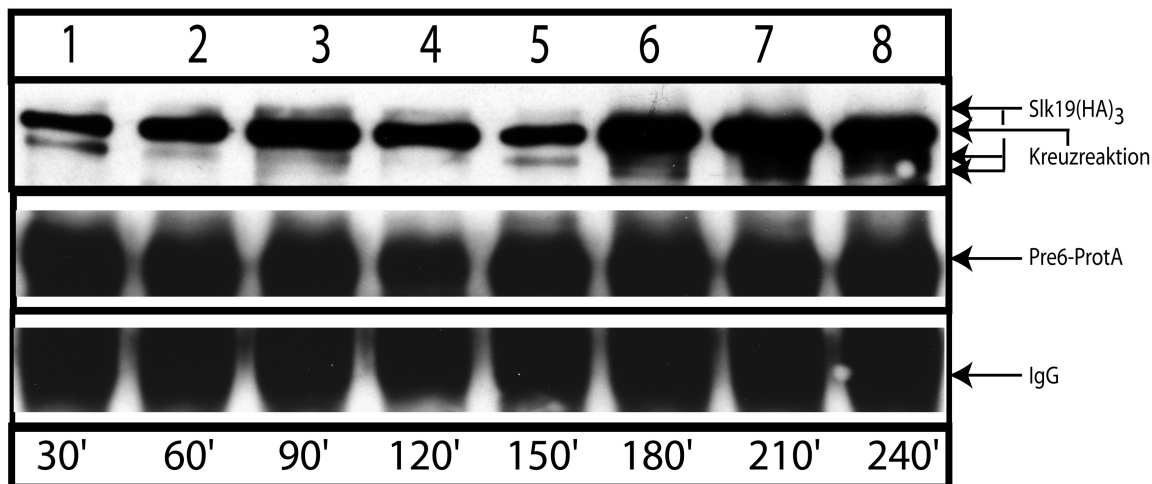


Abbildung 52: native Immunopräzipitation von synchronisierten YJJ62 Zellen. Auftgetragen wurden die Immunopräzipitate (mit IgG-Sepharose) aus Zellen von YJJ62 nach 4h Synchronisation auf 37°C und 4 Stunden Inkubation bei 25°C. Probenahme erfolgte jeweils in Schritten von 30 Minuten nach Transfer der Zellen von 37°C auf 25°C. Spur 1-8: nach 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 Minuten.

Nach Entwicklung der Immunoblots mit HA-Antikörper konnten verschiedene Slk19(HA)₃ Signale identifiziert werden. Die Identifizierung wurde wiederum durch das Auftreten von Kreuzreaktionen bei ähnlichem Molekulargewicht wie die Slk19(HA)₃ Signale erschwert.

Zwischen 30 bis 90 Minuten konnte die Zunahme von einem Slk19(HA)₃ Signal über der Kreuzreaktion und nach 90 Minuten wieder seine Abnahme festgestellt werden. Ein zweites Signal unter dem der Kreuzreaktion nimmt zwischen 30 und 120 Minuten ab und erscheint nach 150 Minuten wieder. Bei 90 Minuten konnte noch ein zweites Signal unter der Kreuzreaktion gefunden werden, welches dann bei 120 und 150 Minuten wieder fehlte. Das Auftreten der drei Slk19(HA)₃ Signale bei den Proben zwischen 180 und 240 Minuten konnte diskutiert werden. Die Identifizierung war jedoch durch die Kreuzreaktion nur bedingt möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass tatsächlich drei verschiedene Slk19(HA)₃ bei der Immunpräzipitation von Proteasomen mit präzipitiert worden waren. Dies widerlegte somit die Vermutung, dass nur phosphorylierte Modifikationen von Slk19 für die Interaktion mit dem Proteasom verantwortlich sind.

Versuche, die Slk19(HA)₃ Signale durch Behandeln der isolierten Proteine mit Phosphatase genauer zu identifizieren, lieferten jedoch bislang keine auswertbaren Daten.

4 Diskussion

Auf der Suche nach Proteinen, die mit der Proteasomenuntereinheit Pre4 interagieren, wurde mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems von Fields (Fields and Sternglanz 1994) das Kinetochorprotein Slk19 gefunden (Zimmermann 1998). Slk19 ist in die Gruppe der „coiled-coil“-Proteine einzuordnen (Lupas et al. 1991) und besitzt eine theoretische molekulare Masse von 95 kDa. Das in dieser Arbeit exprimierte, epitopmarkierte Slk19(HA)₃ wird in SDS-Gelen in unterschiedlich modifizierten Formen mit deutlich höherem Molekulargewicht gefunden. So treten drei Banden zwischen 120 und 150 kDa, sowie ein Signal beim erwarteten Molekulargewicht von 98 kDa auf, die einerseits durch posttranslationale Phosphorylierung und andererseits durch Prozessierung mit während dem Zellzyklus entstehen, wie in den Arbeiten von Pfiz und Sullivan gezeigt (Pfiz 1999, Sullivan et al. 2001). In vorangegangenen Arbeiten konnte die Lokalisierung von Slk19 am Spindelpolkörper gezeigt werden. Weiterhin ist bekannt, dass die Deletion von *SLK19* synthetische Letalität in Nullmutanten des Kinesin-Motorproteins Kar3 erzeugt (Zeng et al. 1999).

Basierend auf der Kenntnis der Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 aus dem „Two-Hybrid“-Screen und den Affinitätschromatographieexperimenten von Zimmermann (Zimmermann 1998) wurde in dieser Arbeit versucht, die Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 durch biochemische und genetische Experimente zu untermauern und die Bedeutung dieser Wechselwirkung näher zu untersuchen.

Ausgehend von YHi39/1/2 α sollten mutierte *pre4* Allele erzeugt werden, die in Kombination mit der Deletion des *KAR3* Gens synthetische Letalität aufweisen. Doppelmutanten mit *KAR3* und *PRE4* Deletion, die ein komplementierendes *PRE4* Wildtyp Plasmid mit *URA3* Marker enthielten, wurden mit *pre4* Mutantallelern, die durch PCR unter mutagenen Bedingungen erzeugt worden waren, zusammen mit einem linearisierten Plasmidfragment transformiert. Durch homologe Rekombination der *pre4* Allele mit dem linearisierten Plasmidfragment, das einen *LEU2* Marker enthielt, wurden 607 Transformanten erhalten, die *LEU2* Plasmide mit willkürlich mutierten *pre4* Allelen enthielten. Darunter befanden sich 73 Klone, die nicht in der Lage waren, das Plasmid mit dem *PRE4* Wildtypgen zu verlieren und somit ein *pre4* Mutantallel enthielten, das im *kar3* Δ Hintergrund Letalität erzeugte. Diese 73 Stämme wurden daraufhin auf einen Zusammenhang zwischen der durch das jeweils vorhandene *pre4* Mutantallel erzeugten Letalität und dem Fehlen des *KAR3* Gens kontrolliert. Dazu wurden die Klone mit einem das *KAR3* Wildtypgen tragenden Plasmid transformiert. Unter den Transformanten konnte dabei der Stamm YRL13 gefunden werden, der nach der

Transformation mit dem *KAR3* Wildtyp Plasmid in der Lage war, das Plasmid mit dem *PRE4* Wildtypgen auf 5-FOA Medium zu verlieren bzw. auf 5-FOA Medium zu wachsen.

Dieses Ergebnis legte nahe, dass YRL14 Zellen höchstwahrscheinlich ein *pre4* Mutantenallel enthielten, das in Kombination mit einer *KAR3* Deletion synthetische Letalität erzeugt. Die anderen 72 Klone enthielten wahrscheinlich *pre4* Mutationen, die allgemein und damit unabhängig von der *KAR3* Deletion Letalität erzeugten.

Die Ursache für das Auftreten von falsch positiven Klonen - d. h. das Auftreten von Zellen mit einem *pre4* Allel, das im *kar3Δ* Hintergrund nur Letalität vortäuscht - konnte eigentlich im verwendeten Plasmidaustauschsystem aufgrund folgender Überlegung ausgeschlossen werden. Normalerweise beruht die Letalität solch falsch positiver Klone auf einer zufällig aufgetretenen chromosomalen Integration des *URA3* Wildtypgens und damit einer Unfähigkeit durch Plasmidverlust Uracil-auxotroph zu werden. Solche Zellen mit chromosomaler Integration von *URA3* und dadurch erzeugter Letalität auf 5-FOA können jedoch nicht durch Transformation mit einem *KAR3* Wildtyp Plasmid kuriert werden, wie es für YRL14 Zellen gezeigt wurde. Ein weiterer Aspekt der Wiederherstellung des Wachstums von YRL14 Zellen auf 5-FOA Medium nach Transformation mit einem *KAR3* Plasmid konnte in einer spontan aufgetretenen Mutation im *URA3* Markergen des komplementierenden *PRE4* Wildtyp Plasmids diskutiert werden. Da es sich dabei um ein sehr selten auftretendes Mutationsereignis handelt und die Wiederherstellung des Wachstums von YRL12 auf 5-FOA in unterschiedlichen untersuchten Transformanten auftrat, konnte auch dieses Phänomen ausgeschlossen werden.

Zum endgültigen Beweis der Annahme, dass YRL14 Zellen ein mit *KAR3* Deletion synthetisch letales *pre4* Allel enthielten, wurden weitere Kontrolleexperimente durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid *pJJ14/1* (*pre4-72 LEU2*) isoliert und Stämme mit chromosomalem *KAR3* Wildtypgen (YRL3) und chromosomaler Deletion von *KAR3* (YRL12) damit direkt transformiert. In mehreren Klonen dieser Transformanten, YJJ11 (*KAR3*) und YJJ13 (*kar3Δ*), konnte durch Inkubation auf 5-FOA Medium gezeigt werden, dass nur YJJ11 Zellen mit *KAR3* Wildtyp Hintergrund in der Lage sind, nach Verlust des komplementierenden *PRE4* Plasmids und damit in Abhängigkeit von *pre4-72* zu wachsen. In YJJ13 Zellen dagegen erzeugte die Kombination von *kar3Δ* und *pre4-72* unwillkürlich synthetische Letalität; die Zellen waren nach Verlust des komplementierenden *PRE4* Plasmids nicht mehr lebensfähig. Interessanterweise war es auch bei unterschiedlicher Vorgehensweise unmöglich, auch in Zellen mit Wildtyp Hintergrund, das *pre4-72* am *PRE4*-Lokus chromosomal zu integrieren und so chromosomal kodierte *pre4-72* Mutanten zu erzeugen. Der Nachweis der

synthetischen Letalität, durch ein klassisches Rückkreuzungsexperiment mit *kar3Δ* Zellen die Letalität von *pre4-72 kar3Δ* Doppelmutantensporen nachzuweisen, konnte somit nicht erbracht werden. Jedoch wiesen gerade die bei den Integrationsversuchen aufgetretenen Effekte wie z.B. Sporulationsprobleme von *pre4-72* abhängigen Diploiden, auf den Einfluss von *pre4-72* auf die Meiose hin.

Auch der unerwartete Effekt des Wiederherstellung der *PRE4* Wildtypsequenz bei der Integration von *pre4-72* am *PRE4* Locus in Deletionen mit *URA3* Markergenen deuten darauf hin, dass chromosomal integriertes *pre4-72* während des Durchlaufens des Zellzyklus drastische Nachteile für die Zelle hervorruft und es deshalb durch zelluläre Kontrollmechanismen z.B. während der Replikation der DNA zur Reparatur der *pre4-72* Mutationen kommt. Dieses Phänomen und der Befund, dass plasmidabhängige *pre4-72* Mutanten langsames Zellwachstum zeigen, als weiterer Hinweis für den Einfluss von *pre4-72* mitotisches Wachstum angesehen werden.

Die hier aufgezeigte synthetische Letalität zwischen dem *pre4-72* Allel und der *KAR3* Deletion konnte weiter als starkes Indiz dafür bewertet werden, dass die Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 tatsächlich für die funktionelle Notwendigkeit bei Abwesenheit von Kar3 übernimmt. Dieser Befund ist somit ein weiterer wichtiger Beleg für die Interaktion zwischen Slk19 und Pre4 sowie der wahrscheinlichen Bedeutung dieser Wechselwirkung für die Kontrolle mitotischer und meiotischer Prozesse.

Zur Untermauerung dieses Modells wurde das *pre4-72* Allel zunächst sequenziert. Dann konnten anhand der Röntgenstruktur des Proteasoms Aussagen über die Lokalisation der gefundenen Mutationen innerhalb des Pre4 Proteins getroffen werden. Von den drei mutierten Pre4-72 Protein Punktmutationen verbleiben die zwei Punktmutationen M52L bzw. M142K nach der Prozessierung von Pre4 im Proteasomenkomplex.

Es konnte gezeigt werden, dass einerseits die Kombination beider Punktmutationen M52L und M142K für die Induktion der synthetischen Letalität mit *kar3Δ* gebraucht werden, andererseits beide Punktmutationen an für die Interaktion von Proteinen von außerhalb zugänglichen Positionen in Furchen bzw. Taschen an der Oberfläche des Proteasoms lokalisiert sind. Dieses Ergebnis ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom über das Pre4 erfolgt.

Zum Nachweis, dass die Punktmutationen von Pre4-72 Protein die Wechselwirkung zwischen Slk19 und Pre4 verhindern, wurden „Two-Hybrid“-Experimente durchgeführt. In den Kontrollen wurde wie schon bei der Arbeit von Zimmermann im „Two-Hybrid“-Test das

stärkste Interaktionssignal mit Konstrukten gefunden, die nur den C-terminalen Bereich von Slk19 umfassen (Zimmermann 1998). Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte mit den C-terminalen Slk19 Konstrukten konnte auch für Pre4-72 Hybride eine schwache Restinteraktion gemessen werden; diese war aber im Vergleich zu entsprechenden PRE4 Wildtyp Konstrukten stark abgeschwächt. Damit konnte klar belegt werden, dass *pre4-72* die Slk19-Pre4 Interaktion fast vollständig blockiert.

Experimente zur mitotischen und meiotischen Chromosomensegregation in *pre4-72* Mutanten sollten weiteren Aufschluss darüber bringen, ob die Pre4-Slk19 Interaktion tatsächlich notwendig ist, damit die Zelle diese Prozesse mit der notwendigen Präzision durchführen kann.

Die in *slk19* Nullmutanten auftretende Bildung von Dyaden in der Meiose konnte in Tetradenanalysen von Plasmid abhängigen *pre4-72* Mutanten jedoch nicht beobachtet werden.

In *pre4-72* Zellen tritt zwar eine Verdopplung der Dyadenrate gegenüber Wildtypzellen auf, doch der prozentuale Anteil der Dyaden erreicht bei weitem nicht den Wert der *slk19* Mutante (13-facher Wert im Vergleich zum Wildtyp). Zieht man einen Vergleich zwischen dem Verhältnis von Tetraden und Dyaden in *pre4-72* Zellen und *slk19Δ* Zellen, so ist wenn überhaupt kein signifikanter Effekt der Dyadenbildung festzustellen. Die Aufhebung der Interaktion zwischen Pre4 und Slk19 führt in *pre4-72* Mutanten demnach nicht zur Ausprägung des Phänotyps der Dyadenbildung wie bei Fehlen von Slk19.

Folglich wird in *pre4-72* Zellen zwar synthetische Letalität bei Abwesenheit von Kar3 verursacht, aber in *pre4-72* Zellen vorhandenes Slk19 kann trotz oder auch bei Ausfall der Bindung an das Proteasom wichtige Restfunktionen erfüllen und so einen fast normalen Ablauf der Meiose unterstützen.

Untersuchungen in *pre4-72* Mutanten zur Stabilität künstlicher Chromosomen in der Mitose zeigten einen im Vergleich zu *slk19* Nullmutanten schwachen, aber signifikanten Effekt. Die Slk19-Pre4 Interaktion trägt folglich zur Chromosomensegregation bei. Doch Slk19 übt an sich noch zusätzliche Funktionen aus, deren Ausfall in *slk19* Nullmutanten viel stärkere Auswirkungen zeigen.

Experimente zur proteolytischen Aktivität von Proteasomen in *pre4-72* Mutanten zeigten, dass die PGPH Aktivität und chymotrypsinähnliche Aktivität der Proteasomen in *pre4-72*

Mutanten nicht beeinträchtigt wird. Im Vergleich zu *pre4-1* Mutanten, die bei Anwesenheit von Slk19 einen deutlichen Verlust der PGPH Aktivität zeigen, bei Fehlen von Slk19 jedoch eine Wiederherstellung der von Pre3 vermittelten proteolytischen Aktivität aufweisen, besaßen *pre4-72* Mutanten Wildtypaktivität.

Dem Slk19 könnte zwar unter dem Gesichtspunkt der Phänomene bei *pre4-1* Mutanten über die Interaktion mit Pre4 eine regulierende Funktion der proteolytischen PGPH-Aktivität mit nicht korrekt aufgebauten Proteasomen zugesprochen werden. Da in Wildtypzellen jedoch die Aktivität nicht beeinträchtigt ist, obwohl wie angenommen Slk19 mit Pre4 interagiert, kann man nicht davon ausgehen, dass Slk19 generell einen negativen Einfluss auf die PGPH-Aktivität hat. Geht man von einem negativen Einfluss der Slk19 Interaktion mit Pre4 auf die PGPH-Aktivität aus, so kann Slk19 im Fall von *pre4-72* keinen negativen Einfluss mehr auf die PGPH-Aktivität des Proteasoms haben. Folglich sind *pre4-72* Mutanten proteolytisch voll aktiv.

Ein Modell unter Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse nimmt an, dass Slk19 am Spindelapparat lokalisiert ist und dort unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Für die perfekte Funktion von Slk19 ist dabei die Interaktion mit dem Proteasomenkomplex über Pre4 notwendig. Da das Slk19 Protein am Spindelpolkkörper und an den Spindelfasern lokalisiert ist, könnte das Proteasom mit Hilfe der Wechselwirkung zu Slk19 dort zielgerichtet proteolytische Aufgaben erfüllen. Wenn sich z.B. Spindelfasern an den Chromosomen falsch anordnen, müssen dort möglicherweise Proteine abgebaut werden, um die Verbindung zu lösen und so Missegregationen zu vermeiden. Um nach der Chromosomensegregation den Austritt aus der Mitose und die Abspaltung von Mutter und Tochterzelle zu ermöglichen, müssen auch die nukleären Spindelfasern zwischen den aufgeteilten Chromosomen abgebaut werden. Dies könnte ebenfalls durch Prozessieren von Slk19 und dadurch aktivierten Abbau von Proteinen, die an Spindelfasern lokalisieren, erfolgen. Für eine solche Funktion wäre das Proteasom mit der spezifischen, durch Ubiquitin vermittelten Substraterkennung ebenso geeignet, wie für die Degradation möglicher Regulatoren der Spindelfunktion.

Eine Lokalisierung des Proteasoms an seinem Wirkort über die Interaktion von Slk19 mit der Untereinheit Pre4 für eine termingerechte oder effektive Regulation durch Abbau bestimmter Zielproteine wäre somit eine sinnvolle Annahme. Dieses hypothetische Modell setzt aber voraus, dass Slk19 nicht nur mit freiem Pre4 Protein interagiert, sondern auch mit der im Proteasom integrierten Pre4 Untereinheit eine direkte Wechselwirkung eingeht; eine Assoziation mit dem gesamten Proteasomenkomplex sollte demnach nachweisbar sein. Für

eine solche Interaktion zwischen Pre4 und dem 20S Komplex konnten bisher nur genetische Nachweise erbracht werden.

Biochemisch waren für die Interaktion zwischen Slk19 und dem Proteasom über Co-Immunopräzipitationen nur erste Indizien erhalten worden; deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die bereits erhaltenen Ergebnisse aus Co-Immunopräzipitationsexperimenten zu verifizieren und weiterführend eine genauere Analyse zum Auftreten der Wechselwirkung zwischen dem Proteasomenkomplex und Slk19 durchzuführen. In Western-Blot Analysen aus Immunopräzipitationsexperimenten, bei denen Slk19(HA)₃ aus nicht synchronisierten Zellen isoliert wurde, konnten jedoch weder mit Antiseren gegen das Gesamtproteasom, noch mit speziellen Antiseren gegen Pre6 und Cim5 Signale erhalten werden. In Immunopräzipitationsversuchen, bei denen Slk19(HA)₃ aus synchronisierten Zellen isoliert wurde, konnten ebenfalls weder mit Antiseren gegen das Gesamtproteasom, noch mit speziellen Antiseren gegen proteasomale Untereinheiten (Pre6, Pre2, Cim5) Signale erhalten werden. Dies könnte einerseits auf einer sehr kurzfristig erfolgenden Interaktion zwischen Slk19 und dem Proteasom beruhen. Andererseits könnte das Ergebnis aber auch in einer schwachen Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom begründet sein. Auch das Auftreten von Kreuzreaktionen durch Expression von Hefeproteinen, die mit den unterschiedlichen eingesetzten HA-Antikörpern assoziieren, wie in verschiedenen Western-Blot Analysen von Proteinextrakten aus alkalischen Lysen gezeigt, könnte die notwendige Wechselwirkung zwischen dem Proteasom und Slk19(HA)₃ während der Immunpräzipitation und damit den Nachweis der Wechselwirkung beeinflussen. Des Weiteren könnte diskutiert werden, dass Slk19 unabhängig voneinander ablaufende Funktionen erfüllt, wobei nur ein geringer Anteil für die Wechselwirkung mit Proteasomen verantwortlich ist.

In Immunopräzipitationsexperimenten, in denen versucht wurde, diese Probleme zu umgehen, wurden aus synchronisierten und nicht synchronisierten Zellen über Protein-A Epitop-markierte proteasomale Pre6 Untereinheiten (Pre6-ProtA) und damit also Proteasomen isoliert. In Immunoblotanalysen der gelösten nativen Präzipitate war es dann tatsächlich möglich, schwache Slk19(HA)₃ Signale nachzuweisen. Die eingesetzten HA-Antikörper zeigten jedoch auch hier Kreuzreaktionen, die eine Detektion und genaue Zuordnung der verschiedenen modifizierten Slk19(HA)₃ Formen erschwerten. Verfolgung der Slk19(HA)₃ Signale aus alkalischen Lysen von in der Anaphase synchronisierten Zellen zeigten in Immunoblots das zellzyklusabhängige Auftreten von vier Slk19(HA)₃ Modifikationen. Durch Vergleich mit den Signalen aus den IP-Experimenten lies sich vermuten, dass einerseits die posttranslational phosphorylierte und nicht von Esp1 prozessierte Slk19(HA)₃ Form (höchstes

Molekulargewicht zwischen 130-150 kDa), mit dem Proteasom interagiert. Andererseits lassen aber auch Signale der prozessierten Formen von Slk19(HA)₃ sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert finden. Genauere Untersuchungen, ob die Phosphorylierung von Slk19(HA)₃ für die Interaktion mit dem Proteasom notwendig ist, konnten bisher keine weiteren Erkenntnisse liefern.

Für weitere Immunoprecipitationsversuche sollte Slk19 funktionell mit speziellen Epitopen kreuzreaktionsarmer Antikörper oder mit mehr als drei HA-Epitopen funktionell markiert werden, um die Spezifität der Antikörper zu erhöhen und damit die Detektion von Slk19 zu erleichtern. Damit könnte auch die Frage geklärt werden, wie sich die Phosphorylierung von Slk19 auf die Interaktion mit Pre4 und dem Proteasom auswirkt.

Eine weitere interessante Fragestellung wäre zudem, ob die verschiedenen Slk19 Modifikationen durch ihre Wechselwirkung mit dem Proteasom unterschiedliche, voneinander unabhängige Funktionen erfüllen. Dies könnte dann auch Informationen über die Funktion der Wechselwirkung zwischen Slk19 und dem Proteasom im FEAR Netzwerk liefern. Es ist bekannt, dass die Prozessierung von Slk19 durch Esp1 keinen Einfluss auf die Abläufe im FEAR-Netzwerk ausübt. Möglicherweise könnte aber eine Prozessierung über Dephosphorylierung von Slk19 durch das in FEAR aktivierte Cdc14 die Assoziation mit dem Proteasom beeinflussen. Genauso denkbar wäre die Prozessierung von Slk19 durch die POLO-Kinase Cdc5, die ebenfalls eine Komponente im FEAR Netzwerk darstellt.

5 Literaturverzeichnis

- Adames, N. R., J. R. Oberle, and J. A. Cooper. 2001. The surveillance mechanism of the spindle position checkpoint in yeast. *J Cell Biol* 153: 159-68.
- Alexandru, G., W. Zachariae, A. Schleiffer, and K. Nasmyth. 1999. Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* 18: 2707-2721.
- Amon, A., M. Tyers, B. Futcher, and K. Nasmyth. 1993. Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* 74: 993-1007.
- Arendt, C. S., and M. Hochstrasser. 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7156-7161.
- Arrigo, A. P., K. Tanaka, A. L. Goldberg, and W. J. Welch. 1988. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331: 192-194.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1989-1997. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186.
- Bardin, A. J., R. Visintin, and A. Amon. 2000. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* 102: 21-31.
- Bascom-Slack, C. A., and D. S. Dawson. 1997. The yeast motor protein, Kar3p, is essential for meiosis I. *J Cell Biol* 139: 459-67.
- Baumeister, W., B. Dahlmann, R. Hegerl, F. Kopp, L. Kuehn, and G. Pfeifer. 1988. Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett* 241: 239-45.
- Baumer, M., G. H. Braus, and S. Irniger. 2000. Two different modes of cyclin clb2 proteolysis during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 468: 142-8.
- Betting, J., and W. Seufert. 1996. A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome-dependent pathway. *J Biol Chem* 271: 25790-6.

-
- Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576-581.
- Buonomo, S. B., R. K. Clyne, J. Fuchs, J. Loidl, F. Uhlmann, and K. Nasmyth. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103: 387-98.
- Buonomo, S. B., K. P. Rabitsch, J. Fuchs, S. Gruber, M. Sullivan, F. Uhlmann, M. Petronczki, A. Toth, and K. Nasmyth. 2003. Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19. *Dev Cell* 4: 727-39.
- Burgess, S. M. 2002. Homologous chromosome associations and nuclear order in meiotic and mitotically dividing cells of budding yeast. *Adv Genet* 46: 49-90.
- Cha, R. S., B. M. Weiner, S. Keeney, J. Dekker, and N. Kleckner. 2000. Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes Dev* 14: 493-503.
- Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243: 1576-1583.
- Chen, P., P. Johnson, T. Sommer, S. Jentsch, and M. Hochstrasser. 1993. Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* 74: 357-369.
- Chiang, H. L., and R. Schekman. 1991. Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole [see comments]. *Nature* 350: 313-8.
- Christman, M.
- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of action and cellular physiology. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 565-81.
- Cohen-Fix, O., J. M. Peters, M. W. Kirschner, and D. Koshland. 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 10: 3081-3093.
- Colomina, N., E. Gari, C. Gallego, E. Herrero, and M. Aldea. 1999. G1 cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast. *Embo J* 18: 320-9.
- Cottingham, F. R., L. Gheber, D. L. Miller, and M. A. Hoyt. 1999. Novel roles for *saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle motors. *J Cell Biol* 147: 335-50.

-
- Coux, O., K. Tanaka, and A. L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847.
- Dahmann, C., J. F. Diffley, and K. A. Nasmyth. 1995. S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5: 1257-1269.
- D'Amours, D., and A. Amon. 2004. At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* 18: 2581-95.
- Deshaies, R. J. 1997. Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 7-16.
- Dirick, L., T. Bohm, and K. Nasmyth. 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4803-4813.
- Dirick, L., L. Goetsch, G. Ammerer, and B. Byers. 1998. Regulation of meiotic S phase by Ime2 and a Clb5,6-associated kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 281: 1854-7.
- Djaballah, H., A. Rowe, S. Harding, and A. Rivett. 1993. The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity. *Biochem J.* Jun 15;292: (Pt 3):857-62.
- Durfee, T., K. Becherer, P. L. Chen, S. H. Yeh, Y. Yang, A. E. Kilburn, W. H. Lee, and S. J. Elledge. 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7: 555-569.
- Elledge, S.
- Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672.
- Enenkel, C., A. Lehmann, and P. M. Klotzel. 1998. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J* 17: 6144-6154.
- . 1999. GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol. Biol. Rep.* 26: 131-135.
- Epstein, C. B., and F. R. Cross. 1992. CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev* 6: 1695-706.

-
- Falkenburg, P. E., C. Haass, P. M. Kloetzel, B. Niedel, F. Kopp, L. Kuehn, and B. Dahlmann. 1988. Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase. *Nature* 331: 190-2.
- Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner. 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12: 1871-1883.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies. 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91: 221-230.
- Fields, S., and R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10: 286-292.
- Finley, D., and V. Chau. 1991. Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* 7: 25-69.
- Fromant, M., S. Blanquet, and P. Plateau. 1995. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 224: 347-53.
- Galbraith, A. M., S. A. Bullard, K. Jiao, J. J. Nau, and R. E. Malone. 1997. Recombination and the progression of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 146: 481-9.
- Gerlinger, U. M., R. Gückel, M. Hoffmann, D. H. Wolf, and W. Hilt. 1997a. Yeast Cycloheximide-resistant *crl* Mutants Are Proteasome Mutants Defective in Protein Degradation. *Mol Biol Cell* 8: 2487-99.
- Gerlinger, U.-M., R. Gückel, M. Hoffmann, D. H. Wolf, and W. Hilt. 1997b. Yeast cycloheximide resistant *crl* mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell* 8: 2487-2499.
- Gersten, D. M., and J. J. Marchalonis. 1978. A rapid, novel method for the solid-phase derivatization of IgG antibodies for immune-affinity chromatography. *J Immunol Methods* 24: 305-9.
- Ghislain, M., A. Udvardy, and C. Mann. 1993. *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* 366: 358-362.
- Ghoda, L., T. van Daalen Wetters, M. Macrae, D. Ascherman, and P. Coffino. 1989. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* 243: 1493-5.
- Gibbs. 1991. Polymerase chain reaktion techniques. *Curr Opin Biotechnol* 2: 69-75.
- Gibbs, R. A. 1990. DNA amplification by polymerase chain reaction. *Anal Chem* 62: 1202-14.

-
- Gietz, R. D., and R. H. Schiestl. 1991. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* 7: 253-63.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems, and R. A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-60.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried, and D. Finley. 1998a. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94: 615-623.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, V. A. Fried, and D. Finley. 1998b. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3149-3162.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, H. Fu, C. N. Larsen, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, R. Vierstra, W. Baumeister, V. Fried, and D. Finley. 1999. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26: 21-8.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, C. N. Larsen, and D. Finley. 2000. The regulatory particle of the yeast proteasome. Pages in press in W. Hilt and D. H. Wolf, eds. *Proteasomes: The world of regulatory proteolysis*. R.G. Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA.
- Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7.
- Goldberg, A. L., and K. L. Rock. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357: 375-9.
- Goodger, N. M., J. Gannon, T. Hunt, and P. R. Morgan. 1997. Cell cycle regulatory proteins-- an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 33: 61-73.
- Gordon, C., G. McGurk, P. Dillon, C. Rosen, and N. D. Hastie. 1993. Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. *Nature* 366: 355-357.
- Grandin, N., and S. I. Reed. 1993. Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 13: 2113-25.

-
- Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, and D. Finley. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7: 1062-7.
- Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, and R. Huber. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution [see comments]. *Nature* 386: 463-71.
- Groll, M., W. Heinemeyer, S. Jäger, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf, and R. Huber. 1999a. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10976-83.
- Groll, M., W. Heinemeyer, S. Jäger, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf, and R. Huber. 1999b. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10976-10983.
- Gueldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, and J. H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24: 2519-24.
- Guthrie, C., and G. R. Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 194.
- Haas, A., P. M. Reback, G. Pratt, and M. Rechsteiner. 1990. Ubiquitin-mediated degradation of histone H3 does not require the substrate-binding ubiquitin protein ligase, E3, or attachment of polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 265: 21664-9.
- Harper, J. W. 2002. A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control. *Trends Cell Biol* 12: 104-7.
- Harris, J. R. 1971. Further studies on the proteins released from haemoglobin-free erythrocyte ghosts at low ionic strength. *Biochim Biophys Acta* 229: 761-70.
- Heinemeyer, W., M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon, and D. H. Wolf. 1997. The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272: 25200-25209.
- Heinemeyer, W., A. Gruhler, V. Mohrle, Y. Mahe, and D. H. Wolf. 1993. *PRE2*, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 5115-5120.
- Heinemeyer, W., J. A. Kleinschmidt, J. Saidowsky, C. Escher, and D. H. Wolf. 1991. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase:

-
- mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 10: 555-562.
- Hershko, A., and A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61: 761-807.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52: 536-553.
- Hieter, P., D. E. Bassett, Jr., and D. Valle. 1996. The yeast genome--a common currency [news]. *Nat Genet* 13: 253-5.
- Hiller, M. M., A. Finger, M. Schweiger, and D. H. Wolf. 1996. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273: 1725-8.
- Hilt, W., C. Enenkel, A. Gruhler, T. Singer, and D. H. Wolf. 1993a. The *PRE4* gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity - Mutations link the proteasome to stress-dependent and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 268: 3479-3486.
- . 1993b. The *PRE4* gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 268: 3479-86.
- Hilt, W., and D. H. Wolf. 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol Microbiol* 6: 2437-42.
- . 1996. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 21: 96-102.
- . 1999. Protein degradation and proteinases in yeast. Pages 263-302. *In: Post Translational Processing: A Practical Approach.* (S.J.Higgins and B.D.Hames, eds.) Oxford University Press, Oxford, UK, Oxford.
- Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 1929-33.
- Hoagland, M. B. 1958. Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *FASEB* 75: 79-86.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-7.
- Hough, R., G. Pratt, and M. Rechsteiner. 1986. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 261: 2400-8.

-
- Hough, R., and M. Rechsteiner. 1986. Ubiquitin-lysosome conjugates. Purification and susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 261: 2391-9.
- Hoyt, M. A. 1997. Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* 91: 149-151.
- Jentsch, S. 1992. The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26: 179-207.
- Jentsch, S., W. Seufert, and H. P. Hauser. 1991. Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* 1089: 127-139.
- Juang, Y. L., J. Huang, J. M. Peters, M. E. McLaughlin, C. Y. Tai, and D. Pellman. 1997. APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science* 275: 1311-1314.
- Kamieniecki, R. J., R. M. Shanks, and D. S. Dawson. 2000. Slk19p is necessary to prevent separation of sister chromatids in meiosis I. *Curr Biol* 10: 1182-90.
- Kleckner, N. 1995. Interactions between and along chromosomes during meiosis. *Harvey Lect* 91: 21-45.
- Knop, M., H. H. Schiffer, S. Rupp, and D. H. Wolf. 1993. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 990-996.
- Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644.
- Kornitzer, D., and A. Ciechanover. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 182: 1-11.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lee, B. H., A. Amon, and S. Prinz. 2002. Spo13 regulates cohesin cleavage. *Genes Dev* 16: 1672-81.
- Lew, D. J., and S. I. Reed. 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol.* 120: 1305-20.
- Lisy, M.-R. 2000. Studien zur Funktion des mit dem Proteasom interagierenden Proteins Cic2/Slk19. *Institut für Biochemie*. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Loetscher, P., G. Pratt, and M. Rechsteiner. 1991. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis. *J Biol Chem* 266: 11213-20.

-
- Löwe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwick, W. Baumeister, and R. Huber. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at a 3.4Å resolution. *Science* 268: 533-539.
- Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162-4.
- Mah, A. S., J. Jang, and R. J. Deshaies. 2001. Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7325-30.
- Marston, A. L., B. H. Lee, and A. Amon. 2003. The Cdc14 phosphatase and the FEAR network control meiotic spindle disassembly and chromosome segregation. *Dev Cell* 4: 711-26.
- 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: 1191-243.
- Mercenier, A., and B. M. Chassy. 1988. Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* 70: 503-17.
- Michel, R. H., P. E. McGovern, and V. R. Badler. 1992. Chemical evidence for ancient beer. *Nature* 360: 24.
- Molk, J. N., S. C. Schuyler, J. Y. Liu, J. G. Evans, E. D. Salmon, D. Pellman, and K. Bloom. 2004. The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Mol Biol Cell* 15: 1519-32.
- Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-91.
- Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka, and A. Ichihara. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360: 597-9.
- Neale, M. J., M. Ramachandran, E. Trelles-Sticken, H. Scherthan, and A. S. Goldman. 2002. Wild-type levels of Spo11-induced DSBs are required for normal single-strand resection during meiosis. *Mol Cell* 9: 835-46.
- Nirenberg, M. W., and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407.
- Pacifici, R. E., D. C. Salo, and K. J. Davies. 1989. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells

-
- [published erratum appears in *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):211-2]. *Free Radic Biol Med* 7: 521-36.
- Park, H. D., A. E. Beeser, M. J. Clancy, and T. G. Cooper. 1996. The *S. cerevisiae* nitrogen starvation-induced Yvh1p and Ptp2p phosphatases play a role in control of sporulation. *Yeast* 12: 1135-51.
- Patchell, V. B., C. E. Gallon, J. S. Evans, Y. Gao, S. V. Perry, and B. A. Levine. 2005. The regulatory effects of tropomyosin and troponin-1 on the interaction of myosin loop regions with F-actin. *J. Biol. Chem.*: M414202200.
- Pereira, G., T. Hofken, J. Grindlay, C. Manson, and E. Schiebel. 2000. The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell* 6: 1-10.
- Pereira, G., M. Knop, and E. Schiebel. 1998. Spc98p directs the yeast gamma-tubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body. *Mol Biol Cell* 9: 775-93.
- Pereira, G., C. Manson, J. Grindlay, and E. Schiebel. 2002. Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol* 157: 367-79.
- Peters, J. M., Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt, and W. Baumeister. 1993. Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 234: 932-937.
- Peters, J. M., R. W. King, and R. J. Deshaies. 1998. Cell cycle control by ubiquitin-dependent proteolysis. Pages 345-387. *In: Ubiquitin and the biology of the cell.* (J.M. Peters, J.R. Harris and D. Finley) Plenum Press, New York.
- Petronczki, M., M. F. Siomos, and K. Nasmyth. 2003. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-40.
- Pfiz, S. 1999. Das Bic1 Protein: Studien an einem neuen, mit dem Proteasom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* interagierenden Protein. *Institut für Biochemie.* Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Pfiz, S., J. Zimmermann, and W. Hilt. 2002. The yeast kinetochore protein Slk19 is required to prevent aberrant chromosome segregation in meiosis and mitosis. *Genes Cells* 7: 1033-1042.
- Phillips, G. N., Jr., J. P. Fillers, and C. Cohen. 1986. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J Mol Biol* 192: 111-31.
- Phizicky, E. M., and S. Fields. 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59: 94-123.

-
- Plemper, R. K., R. Egner, K. Kuchler, and D. H. Wolf. 1998. Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* 273: 32848-56.
- Plemper, R. K., and D. H. Wolf. 1999. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep* 26: 125-30.
- Qoronfleh, M. W., L. Ren, D. Emery, M. Perr, and B. Kaboord. 2003. Use of Immunomatrix Methods to Improve Protein-Protein Interaction Detection. *J Biomed Biotechnol* 2003: 291-298.
- Rao, H., F. Uhlmann, K. Nasmyth, and A. Varshavsky. 2001. Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 410: 955-9.
- Rechsteiner, M., L. Hoffman, and W. Dubiel. 1993. The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol Chem* 268: 6065-8.
- Rechsteiner, M., and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71.
- Reits, E. A. J., A. M. Benham, B. Plougastel, J. Neefjes, and J. Trowsdale. 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo J* 16: 6087-94.
- Ren, L., D. Emery, B. Kaboord, E. Chang, and M. W. Qoronfleh. 2003. Improved immunomatrix methods to detect protein:protein interactions. *J Biochem Biophys Methods* 57: 143-57.
- Rendueles, P. S., and D. H. Wolf. 1988. Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryote cell. *FEMS Microbiol Rev* 4: 17-45.
- Richter-Ruoff, B., and D. H. Wolf. 1993. Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *FEBS Lett* 336: 34-6.
- Richter-Ruoff, B., D. H. Wolf, and M. Hochstrasser. 1994. Degradation of the yeast MAT alpha 2 transcriptional regulator is mediated by the proteasome [published erratum appears in FEBS Lett 1995 Jan 16;358(1):104]. *FEBS Lett* 354: 50-2.
- Rivett, A. J. 1985. The effect of mixed-function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase. *Arch Biochem Biophys* 243: 624-32.
- . 1993. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J* 291: 1-10.
- Rose, A. H., and R. S. Harrison. 1991. *The Yeasts*. Academic Press, London.

-
- Rose, M. D. 1987. Isolation of genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.* 152: 481-504.
- Rubin, D. M., M. H. Glickman, C. N. Larsen, S. Dhruvakumar, and D. Finley. 1998. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J* 17: 4909-19.
- Sacchetta, P., P. Battista, S. Santarone, and D. Di Cola. 1990. Purification of human erythrocyte proteolytic enzyme responsible for degradation of oxidant-damaged hemoglobin. Evidence for identifying as a member of the multicatalytic proteinase family. *Biochim Biophys Acta* 1037: 337-43.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Schiestl, R. H., and R. D. Gietz. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16: 339-46.
- Schmid, H. P., O. Akhayat, C. Martins De Sa, F. Puvion, K. Koehler, and K. Scherrer. 1984. The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle associated with repressed mRNPs and containing specific ScRNA and a characteristic set of proteins. *EMBO J.* 3: 29-34.
- Schmid, H. P., M. N. Pouch, F. Petit, M. H. Dadet, S. Badaoui, G. Boissonnet, J. Buri, V. Norris, and Y. Briand. 1995. Relationships between proteasomes and RNA. *Mol Biol Rep* 21: 43-7.
- Schnall, R., G. Mannhaupt, R. Stucka, R. Tauer, S. Ehnle, C. Schwarzlose, I. Vetter, and H. Feldmann. 1994. Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast* 10: 1141-1155.
- Schork, S. M., M. Thumm, and D. H. Wolf. 1995. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J Biol Chem* 270: 26446-50.
- Seemuller, E., A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber, and W. Baumeister. 1995a. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease [see comments]. *Science* 268: 579-82.
- Seemuller, E., A. Lupas, F. Zuhl, P. Zwickl, and W. Baumeister. 1995b. The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett* 359: 173-8.

-
- Seufert, W., B. Futcher, and S. Jentsch. 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373: 78-81.
- Shonn, M. A., R. McCarroll, and A. W. Murray. 2000. Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science* 289: 300-3.
- Sikorski, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.
- Simanis, V., and D. P. Lane. 1985. An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen. *Virology* 144: 88-100.
- Sohrmann, M., S. Schmidt, I. Hagan, and V. Simanis. 1998. Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes Dev* 12: 84-94.
- Solomon, V., and A. L. Goldberg. 1996. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271: 26690-7.
- Stegmeier, F., R. Visintin, and A. Amon. 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108: 207-20.
- Storlazzi, A., L. Xu, A. Schwacha, and N. Kleckner. 1996. Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9043-8.
- Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-7.
- Sullivan, M., N. C. Hornig, T. Porstmann, and F. Uhlmann. 2004. Studies on substrate recognition by the budding yeast separase. *J Biol Chem* 279: 1191-6.
- Sullivan, M., C. Lehane, and F. Uhlmann. 2001. Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. *Nat Cell Biol* 3: 771-7.
- Sullivan, M., and F. Uhlmann. 2003. A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol* 5: 249-54.
- Takita, Y., M. Takahara, S. Nogami, Y. Anraku, and Y. Ohya. 1997. Applications of the long and accurate polymerase chain reaction method in yeast molecular biology: direct sequencing of the amplified DNA and its introduction into yeast. *Yeast* 13: 763-8.
- Tyers, M., and A. R. Willems. 1999. One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 284: 601, 603-4.

-
- Varshavsky, A. 1992. The N-end rule. *Cell* 69: 725-735.
- . 1996. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12142-9.
- Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2: 709-18.
- Visintin, R., F. Stegmeier, and A. Amon. 2003. The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell* 14: 4486-98.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-808.
- Wagner, B. 2002. Das proteasomale Mutantenallel *pre4-72*: grundlegende Studien zur Verifizierung der Slk19-Proteasom-Interaktion. *Institut für Biochemie*. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Walz, J., A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A. J. Koster, and W. Baumeister. 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* 121: 19-29.
- Watanabe, Y., and P. Nurse. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400: 461-4.
- Wilk, S., and M. Orlowski. 1980. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem* 35: 1172-82.
- Wilkinson, C. R., M. Wallace, M. Morpew, P. Perry, R. Allshire, J. P. Javerzat, J. R. McIntosh, and C. Gordon. 1998. Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J*. 17: 6465-6476.
- Willems, A. R., T. Goh, L. Taylor, I. Chernushevich, A. Shevchenko, and M. Tyers. 1999. SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1533-50.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-78.
- Yaglom, J., M. H. Linskens, S. Sadis, D. M. Rubin, B. Futcher, and D. Finley. 1995. p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol* 15: 731-41.

-
- Yeong, F. M., H. H. Lim, C. G. Padmashree, and U. Surana. 2000. Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell* 5: 501-11.
- Yoshida, S., K. Asakawa, and A. Toh-e. 2002. Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12: 944-50.
- Yoshimura, T., K. Kameyama, T. Takagi, A. Ikai, F. Tokunaga, T. Koide, N. Tanahashi, T. Tamura, Z. Cejka, W. Baumeister, and et al. 1993. Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111: 200-11.
- Zeng, X., J. A. Kahana, P. A. Silver, M. K. Morpew, J. R. McIntosh, I. T. Fitch, J. Carbon, and W. S. Saunders. 1999. Slk19p is a centromere protein that functions to stabilize mitotic spindles. *J Cell Biol* 146: 415-25.
- Zeng, X., and W. S. Saunders. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* Centromere Protein Slk19p Is Required for Two Successive Divisions During Meiosis. *Genetics* 155: 577-587.
- Zimmermann, J. 1998. Identifizierung und Charakterisierung des Bic1-Proteins, eines mit der β -Untereinheit Pre4 des Proteasoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* interagierenden Proteins. *Institut für Biochemie*. Universität Stuttgart, Stuttgart.