

Funktionelle Charakterisierung von Noc4p-Interaktionen in der Ribosomenbiogenese



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Holger Kühn
aus Sinsheim

Regensburg 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.07.2007

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Gernot Längst
1. Gutachter:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
2. Gutachter:	Prof. Dr. Ludwig Lehle
3. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhart Sternner

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Tschochner am Lehrstuhl für Biochemie III des Instituts für Mikrobiologie, Genetik und Biochemie der Universität Regensburg erstellt.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, den 31.07.2007

*Groß sind die Werke des HERRN; wer sie
erforscht, der hat Freude daran.*

Psalm 111, 2

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Herbert Tschochner für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten.

Bei Dr. Philipp Milkereit bedanke ich mich für die vielen guten Anregungen, neue Ideen und die große Bereitschaft über die Ergebnisse zu diskutieren.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Tschochner danke ich für den kameradschaftlichen Umgang, die anregenden Diskussionen, die Hilfestellung bei den verschiedensten Problemen und nicht zuletzt das sehr angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglichten. Ihnen und meinen Geschwistern möchte ich für alle Unterstützung in jeglicher Form danken. Es gibt noch viele weitere Menschen, die mich auf dem Weg begleitet haben und die auf ihre Weise zum Gelingen beigetragen haben. Sie einzeln aufzulisten würden Rahmen sprengen. Ihnen sei auf diese Weise gedankt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Generelle Funktion und Struktur von Ribosomen.....	1
1.2 Ribosomenbiogenese in <i>S. cerevisiae</i>	2
1.2.1 Transkription der rRNA durch Pol I im Nukleolus.....	4
1.2.2 Modifikation der rRNA	7
1.2.3 Faltung der rRNA.....	9
1.2.4 Prozessierung der rRNA.....	11
1.2.5 Einbau der ribosomalen Proteine	15
1.2.6 Export der ribosomalen Untereinheiten	17
1.3 Regulation der Ribosomenbiogenese	21
1.4 Die Noc-Proteine.....	23
2 Aufgabenstellung.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Charakterisierung interaktionsrelevanter Proteindomänen von Noc4p in <i>S. cerevisiae</i>	27
3.1.1 Genetische Untersuchungen mit Deletionsmutanten der Proteindomänen	28
3.1.1.1 Alle Proteindomänen in Noc4p, mit Ausnahme von Domäne 1 sind für das Wachstum der Hefezellen essentiell	28
3.1.1.2 Die homologe Domäne von <i>H. sapiens</i> kann die essentielle Funktion der Noc-Domäne von Noc4p aus <i>S. cerevisiae</i> übernehmen, die Noc-Domänen von Noc1p und Noc3p aus Hefe können dies nicht.....	30
3.1.1.3 Eine Angleichung eines Hybridkonstruktes aus Noc4p und Noc1p-Noc-Domäne zur Noc4p-Noc-Domäne in sechs Aminosäuren ermöglicht Zellwachstum	32
3.1.2 Biochemische Funktionsanalysen der Proteindomänen von Noc4p	34
3.1.2.1 Die Proteindomänen 6 bis 8 von Noc4p sind für eine <i>ex vivo</i> Kopräzipitation von Nop14p ausreichend.....	36
3.1.2.2 Die Bindung von Noc4p an Nop14p korreliert mit rRNA-Interaktion, die N-terminalen Domänen sind für eine Unterstützung dieser rRNA-Interaktion notwendig	39
3.1.2.3 Die Interaktion von Noc4p mit rRNA wird vermutlich indirekt vermittelt	42
3.2 Funktionelle Untersuchungen von Noc4p im Prozess der Ribosomenbiogenese	49
3.2.1 Die Rolle von Noc4p im Kernexport von Prä-40S Partikeln	49
3.2.1.2 Hinweise auf genetische Interaktion von NOC4 mit Komponenten der Exportmaschinerie.....	52
3.2.1.3 Das mutante Protein Noc4-8p ist bei 37°C im Zytoplasma delokalisiert	53
3.2.2 Noc4p wird vermutlich unabhängig von Nop14p in den Zellkern importiert..	58
3.3 Der Noc4p-Nop14p-Komplex im Netzwerk präribosomaler Biogenesefaktoren....	60
4 Diskussion und Ausblick.....	65
4.1 Funktionelle Domänen von Noc4p	65
4.2 Die Interaktion von Noc4p mit RNA	66
4.3 Der Noc4p-Nop14p-Komplex im SSU-Prozessom.....	67
4.4 Die Funktion von Noc4p im Kernexport von Prä-40S-Untereinheiten.....	69
4.5 Wird Noc4p für die Assemblierung ribosomaler Proteine benötigt?	73
4.6 Noc4p im Netzwerk präribosomaler Biogenesefaktoren	75
5 Material und Methoden	78

5.1	Material	78
5.1.1	Verbrauchsmaterialien:	78
5.1.2	Geräte:	78
5.1.3	Kits:	78
5.1.4	Chemikalien :	79
5.1.5	Enzyme.....	80
5.1.6	Standards :	80
5.1.7	Antikörper :	80
5.1.8	Aminosäurestocklösungen und Endkonzentrationen im Medium	81
5.1.9	Verwendete synthetische Oligonukleotide:.....	81
5.1.10	Sonden (Oligonukleotide für <i>Northernblots</i>)	82
5.1.11	Häufig verwendete Puffer	83
5.1.12	Nährmedien:	84
5.2	Methoden.....	84
5.2.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	84
5.2.1.1	Extraktion von RNA.....	84
5.2.1.2	Immunpräzipitation von RNA:.....	85
5.2.1.3	Auf trennung von RNA im denaturierenden Agarosegel	86
5.2.1.4	RNA Analyse mit der <i>Northernblot</i> Technik.....	86
5.2.1.5	Markierung von synthetischen Oligonukleotid Sonden mit radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	87
5.2.1.6	<i>In vitro</i> Transkription von RNA-Sonden	87
5.2.1.7	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>) Polymerase Kettenreaktion.....	87
5.2.1.8	Reinigung von DNA aus einer PCR-Reaktion	88
5.2.1.9	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	88
5.2.1.10	Ligation hydrolysiert er DNA	88
5.2.1.11	Analyse von DNA im nativen Agarosegel	89
5.2.1.12	Reinigung von DNA aus einem nativen Agarosegel	89
5.2.1.13	Fällung von DNA	89
5.2.1.14	Sequenzierung von DNA	89
5.2.2	Arbeiten mit Proteinen	90
5.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem <i>Bradfordtest</i>	90
5.2.2.2	Proteinfällung mit Methanol/Chloroform	90
5.2.2.3	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	90
5.2.2.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese von Proteinen.....	90
5.2.2.5	Proteintransfer mit der <i>Westernblot</i> -Technik	91
5.2.2.6	Immunologischer Proteinnachweis auf der <i>Westernblot</i> -Membran.....	91
5.2.3	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	92
5.2.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	92
5.2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	92
5.2.4	Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	93
5.2.4.1	Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation.....	93
5.2.4.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	93
5.2.4.3	Selektion gegen Hefestämme mit Uracil-Prototrophie mittels 5-Fluoro-Uracil (5-FOA)	93
5.2.4.4	Sporulation von diploiden Hefezellen.....	94
5.2.4.5	Tetradenanalyse von sporulierten Hefezellen	94
5.2.4.6	<i>Random Spore</i> Analyse von sporulierten Hefezellen.....	94
5.2.4.7	Plasmidisolation aus <i>S.cerevisiae</i>	95
5.2.4.8	Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	95

5.2.4.9	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus <i>S. cerevisiae</i>	95
5.2.4.10	Genomische Epitopmarkierung von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	95
5.2.4.11	Immunfluoreszenzlokalisierungen von Proteinen in <i>S.cerevisiae</i>	96
5.2.4.12	Fraktionierung von <i>S. cerevisiae</i>	97
5.3	Verwendete Stämme	99
5.3.1	Herstellung des Stammes pDL-CRM1 (#307):.....	101
5.3.2	Herstellung des Stammes pDL-crm1T539C (#308).....	101
5.3.3	Herstellung des Stammes CRM1-BY-a (#373).....	101
5.3.4	Herstellung des Stammes CRM1-BY-alpha (#374).....	101
5.3.5	Herstellung des Stammes crm1-BY-a (#375)	101
5.3.6	Herstellung des Stammes crm1-BY-alpha (#376)	102
5.3.7	Herstellung des Stammes CRM1-BY-alpha-noc4-8 (#372)	102
5.3.8	Herstellung des Stammes crm1-noc4-8 (#500).....	102
5.3.9	Herstellung des Stammes NOC4-shuffle A43-HA (#205).....	102
5.3.10	Herstellung des Stammes noc4-8 A43-HA (#215)	103
5.4	Verwendete Plasmide	104
5.4.1	Herstellung des Plasmids K870:	105
5.4.2	Herstellung des Plasmids K871:	106
5.4.3	Herstellung des Plasmids K872:	106
5.4.4	Herstellung des Plasmids K873:	106
5.4.5	Herstellung des Plasmids K874:	106
5.4.6	Herstellung des Plasmids K875:	107
5.4.7	Herstellung des Plasmids K876:	107
6	Literaturverzeichnis.....	108
6.1	Publikationen im Rahmen dieser Doktorarbeit	108
6.2	Allgemeine Literatur	108
7	Abkürzungen	118
8	Zusammenfassung.....	121

1 Einleitung

1.1 Generelle Funktion und Struktur von Ribosomen

Ribosomen findet man in allen Reichen des Lebens, und sie spielen prinzipiell immer die gleiche Rolle: Sie bilden den funktionellen Teil der Proteinsynthesemaschinerie einer Zelle, die entsprechend der Information der mRNA die Reaktion der Verknüpfung von Aminosäuren zu Polypeptidketten katalysiert.

Die Zusammensetzung dieser makromolekularen Ribonukleoproteinkomplexe aus einer großen und einer kleinen Untereinheit ist in allen Organismen gleich. Beide Untereinheiten sind jeweils aus ribosomalen Proteinen (r-Proteine) und ribosomaler RNA (rRNA) aufgebaut. Zwischen den Reichen gibt es jedoch Unterschiede in der Anzahl und Größe der ribosomalen Proteine, sowie dem rRNA-Anteil.

Die Größe der Untereinheiten von Ribosomen wird durch ihre Sedimentationsgeschwindigkeit im Dichtegradienten charakterisiert, die man in Svedberg-Einheiten (S) angibt. Ein prokaryontisches Ribosom sedimentiert mit 70S, die einzelnen Untereinheit mit 30S und 50S. Eukaryontische Ribosomen sedimentieren mit 80S (Molekulargewicht ca. 4,2 MDa), die einzelnen Untereinheiten mit 40S (Molekulargewicht ca. 1,4 MDa) und 60S (Molekulargewicht ca. 2,8 MDa).

Während der Translation stellt die kleine Untereinheit den Rahmen zur Verfügung, in dem die tRNAs und die Codons der mRNA aufeinander abgestimmt werden. In der großen Untereinheit liegt dagegen das aktive Zentrum der Peptidyltransferaseaktivität, das die Bildung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren katalysiert. Jedes Ribosom hat drei Bindestellen für die tRNA – die A-, P- und die E-Bindestellen (Aminoacyl-tRNA, Peptidyl-tRNA und Exit) – sowie eine Bindestelle für die mRNA.

In eukaryontischen Zellen kann man Ribosomen nach dem Ort ihrer Synthesetätigkeit unterscheiden. Freie Ribosomen liegen im Zytosol vor und erzeugen Proteine, die ihre Aufgabe entweder ebenfalls im Zytosol oder im Zellkern wahrnehmen. Membrangebundene Ribosomen sind mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums verbunden und leiten die dort synthetisierten Proteine kotranslational in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Freie und membrangebundene Ribosomen haben die gleiche Struktur und können zwischen den Funktionen wechseln, je nachdem welche mRNA sie translatieren (Halic und Beckmann, 2005; Halic et al., 2006; Luirink und Sinning, 2004). Man findet Ribosomen schließlich auch noch in den Mitochondrien. Mitochondriale Ribosomen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und Struktur allerdings deutlich von denen im Zytoplasma. Sie

ähneln in ihrem Aufbau in vielen Punkten bakteriellen Ribosomen und sind deshalb empfindlich gegenüber Antibiotika.

1.2 Ribosomenbiogenese in *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein etablierter, eukaryontischer Modellorganismus zum Studium zellulärer Vorgänge, da Hefezellen einfach und in großer Menge zu kultivieren und außerdem gut genetisch zu manipulieren sind. Eine Hefezelle hat ca. 200.000 Ribosomen, das heißt, dass ein hoher prozentualer Anteil des Zytoplasmas der Zelle aus Ribosomen besteht. Da sich Hefezellen in der logarithmischen Phase des Wachstums etwa alle 100 min teilen, muss die Zelle etwa 2000 Ribosomen pro Minute produzieren, damit eine ausreichende Zahl an Ribosomen auf die Tochterzellen verteilt werden kann. Dies stellt eine der größten Stoffwechselleistungen der Zelle dar und wird folglich stark reguliert, da die Produktion von Ribosomen nur unter beträchtlichem Energieaufwand geschieht. Die Zelle ist also hauptsächlich mit der Produktion der Komponenten von Ribosomen (rRNA und ribosomale Proteine) beschäftigt: Unter günstigen Wachstumsbedingungen macht die rRNA 60% der gesamten RNA in einer Zelle aus, und geschätzte 50% aller mRNAs sind mRNAs von ribosomalen Proteinen (Warner, 1999). Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, welchen Stellenwert die Produktion von Bestandteilen der Ribosomen im Metabolismus einer Zelle einnimmt.

In *S. cerevisiae* besteht ein reifes 80S-Ribosom aus 78 r-Proteinen, die von 137 Genen codiert werden, und vier rRNA-Spezies (18S, 25S, 5.8S und 5S), die aus einem gemeinsamen Vorläufertranskript (35S) herausgeschnitten werden. Die reife 60S-Untereinheit enthält die 5S-, 5.8S- und 25S-rRNA sowie 46 ribosomale Proteine, die reife 40S-Untereinheit enthält die 18S rRNA und 32 ribosomale Proteine. Mit Hilfe der Ultrazentrifugation von Zellextrakten aus Hefezellen in Dichtegradienten wurden vor mehr als 30 Jahren außer den reifen Untereinheiten die Partikel 90S, 66S und 43S identifiziert (Trapman et al., 1975; Udem und Warner, 1972), die verschiedene rRNA-Spezies aufweisen: 90S enthält das 35S-Transkript, während 66S und 43S aufgrund der in ihnen enthaltenen rRNA-Spezies als Vorläufer der 60S- bzw. 40S-Untereinheit gelten.

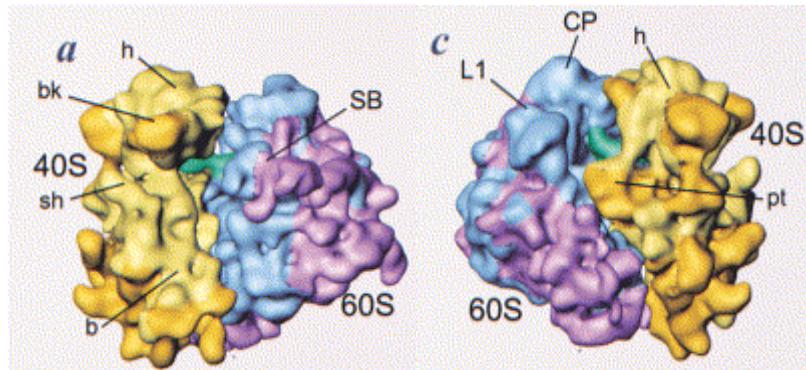


Abbildung 1: Cryoelektronenmikroskopische Karte des 80S Ribosoms von *S. cerevisiae*. Die 40S Untereinheit ist gelb dargestellt, die 60S Untereinheit blau. Eine an die P-Stelle gebundene tRNA ist grün dargestellt. Gold und lila sind nicht-homologe Bereiche zur bekannten Struktur von *E. coli* 70S-Ribosomen gezeigt. Abkürzungen: b=body, bk=beak, h=head, sh=shoulder, pt=platform, L1=L1 protuberance, CP=central protuberance, SB=stalk base. (Spahn et al., 2001)

Die Herstellung von Ribosomen beansprucht die Syntheseleistung von allen drei RNA-Polymerasen: RNA-Polymerase I (Pol I) transkribiert ein polycistronisches Primärtranskript (35S-Prä-rRNA), aus dem dann drei der vier rRNA-Spezies herausgeschnitten werden (18S, 5.8S und 25S, siehe 1.2.4). RNA-Polymerase III (Pol III) transkribiert den 5S-RNA-Vorläufer (der ebenfalls aus einer Vorläufer-rRNA zurechtgeschnitten wird (siehe Abschnitt 1.2.4)). Durch RNA-Polymerase II (Pol II) werden die mRNAs der ribosomalen Proteine transkribiert, die dann im Zytoplasma durch die Ribosomen translatiert und für den Einbau ins Ribosom in den Zellkern transportiert werden. Im Zuge der Ribosomenbiogenese werden die rRNA-Transkripte zurechtgeschnitten und zusammen mit den ribosomalen Proteinen in die jeweiligen Untereinheiten „verpackt“. Die Einzelprozesse dieses Vorgangs werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Transkription der rRNA durch Pol I im Nukleolus

Am Beginn der Ribosomenbiogenese steht die Transkription der 35S-rRNA durch die RNA-Polymerase I (Pol I) und des 5S-RNA-Vorläufers durch RNA-Polymerase III (Pol III). Die Transkription der rRNA ist für die spätere Funktion des Ribosoms von grundlegender Bedeutung, da die katalytische Aktivität eines Ribosoms von der rRNA ausgeht.

Die RNA-Polymerasen transkribieren das rRNA-Gen, das in 100- bis 200-facher Kopienzahl auf Chromosom XII vorliegt (Warner, 1999). Diese Kopien machen bis zu 10% des gesamten Hefegenoms aus. Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick über die Anordnung des Genlokus der rDNA auf Chromosom XII.

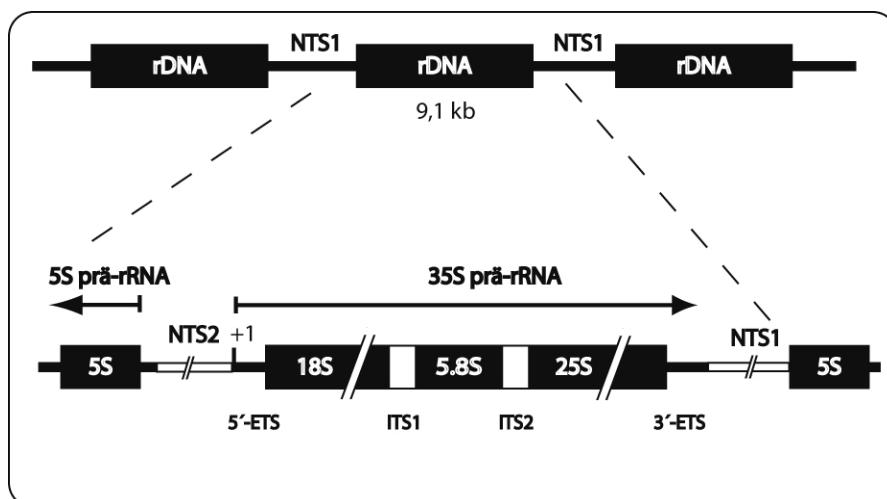


Abbildung 2: Schematische Übersicht über den rDNA-Genlokus von *S. cerevisiae*. Eine rDNA-Einheit umfasst 9137 bp. Die Einheiten liegen in gleicher Orientierung hintereinander und sind durch die nicht transkribierten Spacer NTS1 voneinander getrennt. Der nicht transkribierte Bereich NTS2 trennt das Prä-5S vom Prä-35S-Transkript. Das 35S-Transkript enthält drei der vier rRNA-Spezies, die durch die beiden internen transkribierten Bereiche (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt und am 5'- und 3'-Ende von den externen transkribierten Bereichen (5'-ETS und 3'-ETS) flankiert werden.

Die Transkription durch Pol I findet im Nukleolus statt, einem Subkompartiment des Nukleus. Dieses Subkompartiment ist allerdings nicht durch eine Membran abgegrenzt, sondern ist in seiner Struktur begründet. Der Nukleolus lässt sich in die drei Substrukturen *fibrillar center* (FC), *dense fibrillar center* (DFC) und *granular component* (GC) einteilen (Leger-Silvestre et al., 1999).

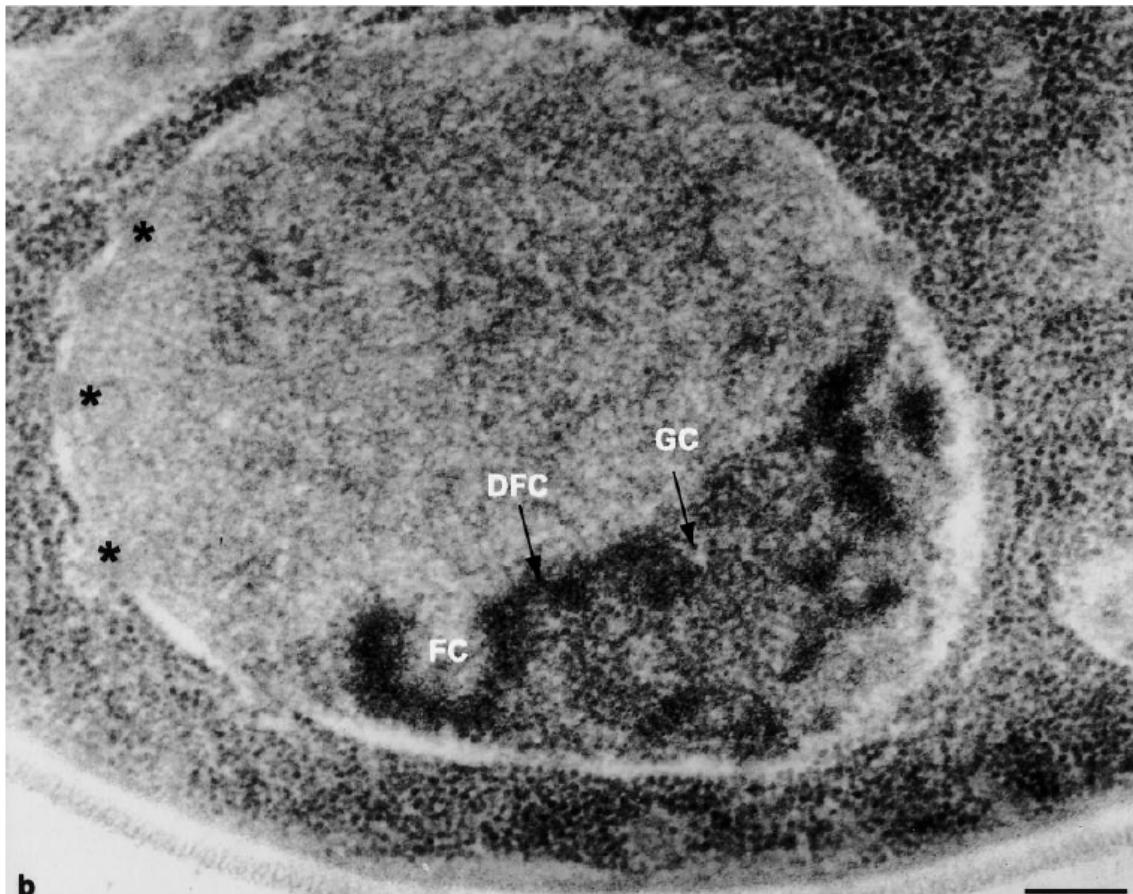


Abbildung 3: Der Nukleus von *S. cerevisiae*. Man erkennt deutlich abgesetzt das Subkompartiment des Nukleolus mit den Bereichen *fibrillar center* (FC), *dense fibrillar center* (DFC) und *granular component* (GC). Die Sterne markieren Kernporen. Aus Leger-Silvestre et al., 1999. Der Größenbalken entspricht 200nm.

In diesen Substrukturen sind bestimmte Ribosomenbiogenesefaktoren sequestriert, von denen man annimmt, dass sie für die räumliche und zeitliche Reihenfolge der Biogenese verantwortlich sind. Im DFC findet sich Nop1p, snoRNAs wie U3 und die neu transkribierte rRNA (Beven et al., 1996). Man nimmt an, dass das DFC der Ort der Transkription der rRNA durch Pol I ist (Cmarko et al., 2000). Im FC sind vermutlich inaktive rRNA-Gene lokalisiert und im GC werden möglicherweise die Vorläuferpartikel der ribosomalen Untereinheiten zusammengebaut (Carmo-Fonseca et al., 2000).

Das Produkt der Transkription durch Pol I ist die polycistronische 35S-rRNA, die die rRNA-Spezies 18S, 5.8S und 25S enthält. Von den ca. 100 bis 200 Kopien der Gene werden allerdings nur ca. 50% aktiv transkribiert, der Rest ist inaktiv (Dammann et al., 1993).

Die Transkription beginnt am Promoter des Gens, wo die Transkriptionsmaschinerie durch basale Transkriptionsfaktoren rekrutiert und zum Prä-Initiationskomplex zusammengebaut wird. Der rDNA-Promoter enthält zwei wichtige Sequenzabschnitte, das *upstream element* (UE) und das *core element* (CE).

In der Bäckerhefe bindet für die Initiation der Transkription der heteromultimere Komplex *upstream activating factor* (UAF) an das UE (Reeder, 1984). UAF besteht aus den sechs Untereinheiten Rrn5p, Rrn9p, Rrn10p, den Histonen H3 und H4 (Keener et al., 1997) und dem 2001 identifizierten Protein Uaf30p (Siddiqi et al., 2001). Das TATA-Box bindende Protein TBP (TATA-binding protein), das auch für die Initiation der Transkription durch Pol II und Pol III nötig ist, interagiert spezifisch sowohl mit CF (Lin et al., 1996; Steffan et al., 1996), als auch mit UAF (Steffan et al., 1996). Über TBP wird nun der ebenfalls heteromultimere Komplex *core factor* (CF) rekrutiert, der an das CE des Promoters bindet (Keys et al., 1994; Lalo et al., 1996; Lin et al., 1996). CF besteht aus den Untereinheiten Rrn6p, Rrn7p und Rrn11p (Lalo et al., 1996). Nun kann Pol I, die aus 14 Untereinheiten aufgebaut ist, an den Promoter rekrutiert werden. Pol I muss komplexiert mit Rrn3p vorliegen um initiationskompetent zu sein (Milkereit und Tschochner, 1998); allerdings liegt nur ein geringer Prozentsatz (< 2%) der freien Polymerase so vor (Milkereit und Tschochner, 1998). Rrn3p bindet einerseits an die A43-Untereinheit der Pol I und vermittelt andererseits durch Interaktion mit Rrn6p am CF die Bindung an die bereits gebundenen basalen Transkriptionsfaktoren. TFIIH ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der ursprünglich im Pol-II-System beschrieben wurde und der bei der Initiation der Pol-I-abhängigen Transkription benötigt wird (Iben et al., 2002).

Nach dem vollständigen Zusammenbau des Initiationskomplexes am Promoter beginnt Pol I mit der Synthese der rRNA und geht in die Phase der Elongation über. Rrn3p dissoziiert von der elongierenden Polymerase ab und kann für eine weitere Runde der Initiation verwendet werden (Bier et al., 2004; Milkereit und Tschochner, 1998). Während der Elongation spielt ein Komplex aus den Proteinen Spt4p und Spt5p eine Rolle in der Regulation. Eine gleichartige Funktion wird diesem Komplex ebenfalls in der Pol II-abhängigen Transkription zugeschrieben (Schneider et al., 2006). In letzter Zeit wurde postuliert, dass sich ein Großteil der Transkriptionsregulation auf Ebene der Elongation abspielen soll, indem die Geschwindigkeit der Elongation durch die nachfolgenden Prozesse, wie z.B. die Prozessierung der rRNA und der Zusammenbau der präribosomalen Partikel, gesteuert wird (Moss et al., 2006). Andersherum scheint aber auch die Elongation die Prozessierung der rRNA zu beeinflussen. Es wird vermutet, dass Pol-I-Elongationsfaktoren und rRNA-Sequenzelemente gemeinsam für eine optimierte Transkriptionselongation sorgen. Dies wird erreicht, indem sie die ko-transkriptionellen Interaktionen von vielen Proteinfaktoren und snoRNA mit der Prä-rRNA koordinieren, was sich auf die korrekte rRNA-Prozessierung und den Zusammenbau von Ribosomen auswirkt (Schneider et al., 2007).

Am Ende des Elongationsprozesses steht die Termination, bei der Pol I durch Terminationselemente am 3'-Ende des rRNA-Gens gestoppt wird. Daran ist maßgeblich das Protein Reb1p beteiligt, das an ein DNA-Element 93 bp stromabwärts des 3'-Endes von 25S bindet (Reeder et al., 1999).

Am rDNA-Promoter eines Gens können nacheinander bis zu einhundert Pol-I-Komplexe für die Transkription initiiert werden und hintereinander das gleiche Gen transkribieren. Das entspricht einer Dichte von einer Polymerase alle 70 Nukleotide (Bier et al., 2004). Im elektronenmikroskopischen Bild eines gerade transkribierten rDNA-Lokus (*Miller spread* (Miller und Beatty, 1969)) ergibt das eine charakteristische Struktur, die man *Christmastrees* (siehe Abbildung 4) nennt.

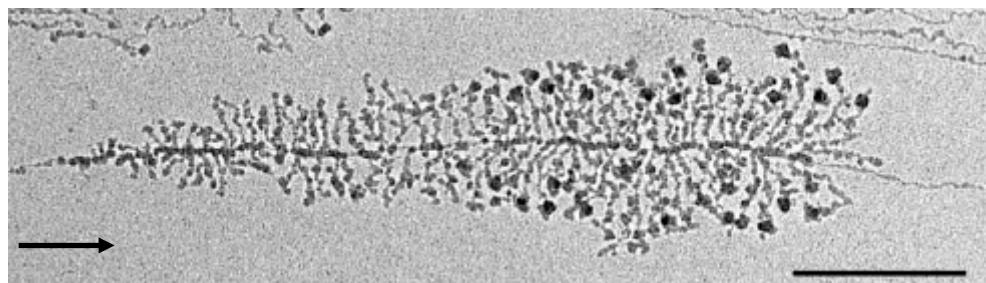


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines transkribierten rRNA-Gens. (Aus French et al., 2003, verändert). Den Stamm des *Christmastrees* bildet die rDNA, an der die Polymerasen sitzen. Deutlich sind die elongierenden RNA-Moleküle als Seitenäste zu sehen, die in Richtung 3'-Ende der rDNA immer länger werden. Am Ende der RNA-Ketten sind Verdickungen zu sehen, die als *terminal balls* bezeichnet werden. Der Pfeil gibt die Syntheserichtung der Pol I (5' nach 3') an, der Balken entspricht 0,5 µm.

Auffällig an dieser Struktur sind die rundlichen Verdickungen am Ende eines Transkripts. Diese werden als *terminal balls* bezeichnet. Es wird angenommen, dass in diesen Strukturen bereits parallel zur noch laufenden Transkription die ersten Schritte der Prozessierung (siehe Abschnitt 1.2.4) der Vorläufer-rRNA ablaufen (Dragon et al., 2002; Osheim et al., 2004), so zum Beispiel die Spaltung der 35S-rRNA in die 18S- und 25S/5.8S-Vorläufer. Dadurch findet bereits sehr früh eine Trennung der Prozessierungswege für 40S- und 60S-Untereinheiten statt.

1.2.2 Modifikation der rRNA

Sobald die RNA transkribiert wurde, bzw. bereits parallel zur noch laufenden Transkription, wird das Transkript verschiedenen Modifikationen unterzogen, hauptsächlich kommen Isomerisierung von Uracil zu Pseudouridin (Basenrotation) und 2'-O-Methylierung der Ribose vor. Diese Reaktionen werden durch zwei Klassen von snoRNPs katalysiert (Balakin et al., 1996; Tollervey und Kiss, 1997): Die Box C+D snoRNAs sind vornehmlich für die 2'-

O-Methylierung der Ribose an 55 Stellen der rRNA verantwortlich (Kiss-Laszlo et al., 1996). Sie liegen komplexiert mit Nop1p (katalysiert die Methylierung), Nop56p, Nop58p und Snu13p vor. Die Box H+ACA snoRNAs vermitteln die Bildung von Pseudouridin an 45 Stellen der rRNA (Ni et al., 1997) und sind mit Cbf5p, Gar1p, Nhp2p und Nop10p komplexiert. In beiden Fällen wird die zu modifizierende Stelle durch Basenpaarung der RNA-Komponente des snoRNPs mit der rRNA gefunden (*Guide*-Funktion der RNA). Keine dieser Modifikationen spielt für sich alleine genommen eine entscheidende Rolle, doch die Gesamtheit der Modifikationen scheint eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der rRNA zu spielen. Es wird postuliert, dass sie hierbei als molekularer „Klebstoff“ wirken, der die benötigten Konformationen stabilisiert, die andernfalls zu flexibel wären (Ofengand, 2002).

In Bakterien liegen die Modifikationen hauptsächlich in funktionellen Bereichen der rRNA - dort wo keine ribosomalen Proteine binden - und scheinen für die Feinabstimmung der Aktivität bei der Translation wichtig zu sein (Kowalak et al., 1995; Nissen et al., 2000). Im Gegensatz zu Prokaryonten ist in Eukaryonten die genaue Lage der meisten ribosomalen Proteine nicht bekannt. Daher kann man nicht sagen, ob an den modifizierten Stellen r-Proteine zu finden sind.

An 10 Stellen der rRNA werden noch Basenmethylierungen durch Proteinfaktoren katalysiert. Diese finden die Stelle der Modifikation ohne eine guide-RNA. Ein gut charakterisiertes Enzym der Basenmethylierung ist Dim1p, das den Stemloop des 3'-Ende der 20S an zwei benachbarten Adenosinen im Nukleolus dimethyliert (Lafontaine et al., 1994) und das zusätzlich noch für die Prozessierung von 20S-rRNA zu 18S-rRNA benötigt wird (Lafontaine et al., 1995). Es wurde vorgeschlagen, dass Dim2p, ein Protein, das zwischen Kern und Zytoplasma pendelt und ebenfalls für die Dimethylierung benötigt wird, an Dim1p bindet und dafür sorgt, dass Dim1p an nukleäre 20S-rRNA binden kann (Vanrobays et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Basenmethylierung alleine ebenfalls nicht essentiell für das Wachstum der Zellen ist. Allerdings war ein Zellextrakt ohne diese Basenmethylierung *in vitro* nicht mehr in der Lage, mRNA zu translatieren. Daraus wurde geschlossen, dass die Basenmethylierung *in vivo* eine Rolle bei der Feinabstimmung der Translation spielt (Lafontaine et al., 1998).

1.2.3 Faltung der rRNA

Die ribosomale RNA nimmt eine zentrale Rolle in der Funktion der Ribosomen bei der Translation ein und braucht dafür eine räumliche Struktur. Die rRNA-Moleküle haben verschiedene Aufgaben bei der Proteinsynthese: 25S hat eine katalytische Funktion bei der Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Untereinheit, 18S spielt eine Rolle bei der Erkennung und der Positionierung der mRNA und der Peptidyl-tRNA.

Es ist wenig darüber bekannt, wie die Faltung genau vonstatten geht und welche Faktoren (ribosomale Proteine, Biogenesefaktoren, snoRNPs) für eine korrekte Ausbildung der 3D-Struktur benötigt werden. Da die katalytische Aktivität des Ribosoms in der rRNA liegt, ist die korrekte Faltung der rRNA von maßgeblicher Bedeutung. Für die Faltung von zumindest Teilen der rRNA werden einige der ribosomalen Proteine benötigt. Dies konnte durch Untersuchungen an einigen r-Proteinen der kleinen Untereinheit gezeigt werden.

Das Protein Rps3p wird benötigt, damit der *beak*, eine schnabelähnliche Vorwölbung von Helix 33 der rRNA im fertigen Ribosom, korrekt ausgebildet wird (Schafer et al., 2006). Für die Ausbildung der *Head*-Domäne der kleinen Untereinheit wird das Protein Rps5p benötigt. Fehlt dieses, kommt es nicht zur Ausbildung der gesamten Domäne (Ferreira-Cerca et al., 2007, zur Veröffentlichung eingereicht). Die Faltung der eukaryontischen rRNA innerhalb der Ribosomen geschieht also nicht spontan, sondern wird von den ribosomalen Proteinen mit beeinflusst.

Andere biochemische Daten legen nahe, dass sich die Aktivität von Biogenesefaktoren auf die dreidimensionale Struktur der rRNA auswirkt. Dies geht aus der Tatsache hervor, dass für die Prozessierung (siehe Abschnitt 1.2.4) an den Stellen A₀, A₁ und A₂ die U3 snoRNA benötigt wird (Hughes und Ares, 1991). U3 snoRNA geht eine komplementäre Basenpaarung mit der rRNA an den entsprechenden Stellen ein. Die Stellen A₀ und A₁ liegen am 5'-Ende der Prä-18S-rRNA, wohingegen A₂ am 3'-Ende liegt (siehe Prozessierungsschema Abbildung 7). In einem Modell wurde nun vorgeschlagen, dass sich die rRNA um den U3 snoRNP faltet, um die Prozessierungsstellen in räumliche Nähe zu bringen (Wehner et al., 2002). Ob diese Struktur der Prozessierung für die endgültige Faltung der rRNA beibehalten wird, ist nicht klar, da U3 snoRNA im reifen Ribosom nicht mehr vorhanden ist. Aus anderen Versuchen wurde deutlich, dass U3 snoRNA auch für die Bildung des zentralen Pseudoknotens der 18S-rRNA benötigt wird und somit bleibenden Einfluss auf die Faltung der rRNA nimmt (Hughes, 1996). Es konnten Mutanten von U3 snoRNA isoliert werden, die einer völligen U3-

Depletion ähnelten, allerdings keinen Defekt in der A₀-Prozessierung zeigten. Hieraus könnte man einen Zusammenhang zwischen Prozessierung und RNA-Faltung ableiten.

Computergestützte Analysen für die rRNA-Spezies zeigen, welche Bereiche der eukaryontischen rRNA eine Sekundärstruktur ausbilden könnten. In Abbildung 5 ist die Sekundärstruktur aus *S. cerevisiae* für drei der vier rRNA-Spezies gezeigt, die aus Berechnungen und Modellierungen der rRNA-Struktur von *Thermus thermophilus* erstellt wurde.

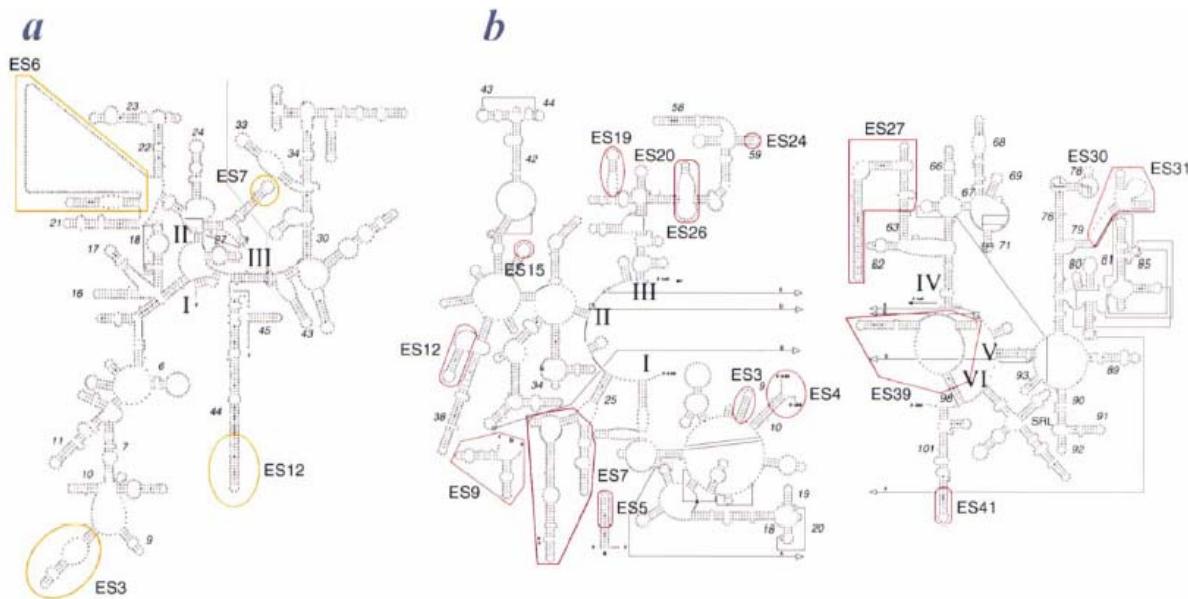


Abbildung 5: Die Sekundärstruktur der rRNA von *S. cerevisiae*. (Spahn et al., 2001). In (a) ist das Diagramm der Sekundärstruktur der 18S-rRNA gezeigt, (b) zeigt die Strukturen von 25S- und 5.8S-rRNA. Die umrandeten Bereiche sind zusätzliche Sequenzen (*expansion sequences*) der eukaryontischen rRNA, die in Prokaryonten nicht existieren.

Mit Hilfe von Cryo-Elektronenmikroskopie gelang es, die Struktur translatierender 80S-Ribosomen von *S. cerevisiae* in einer Auflösung von ca. 12,7 Å zu rekonstruieren. Computergestützt wurden elektronendichte Bereiche von rRNA und Proteinen getrennt. Die Bereiche der rRNA wurden mit den 2D-Struktur-Modellen der rRNA ohne die zusätzlichen Sequenzen überlagert. Ebenso wurden die Bereiche der ribosomalen Proteine, deren Strukturen in Eukaryonten größtenteils unbekannt sind, mit der bekannten *T. thermophilus*-Ribosomenstruktur überlagert, um so ein computergestütztes Modell der ribosomalen Untereinheit zu erhalten (Spahn et al., 2001). Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Überlagerung auf rRNA-Ebene und macht die komplexe 3D-Faltung deutlich.

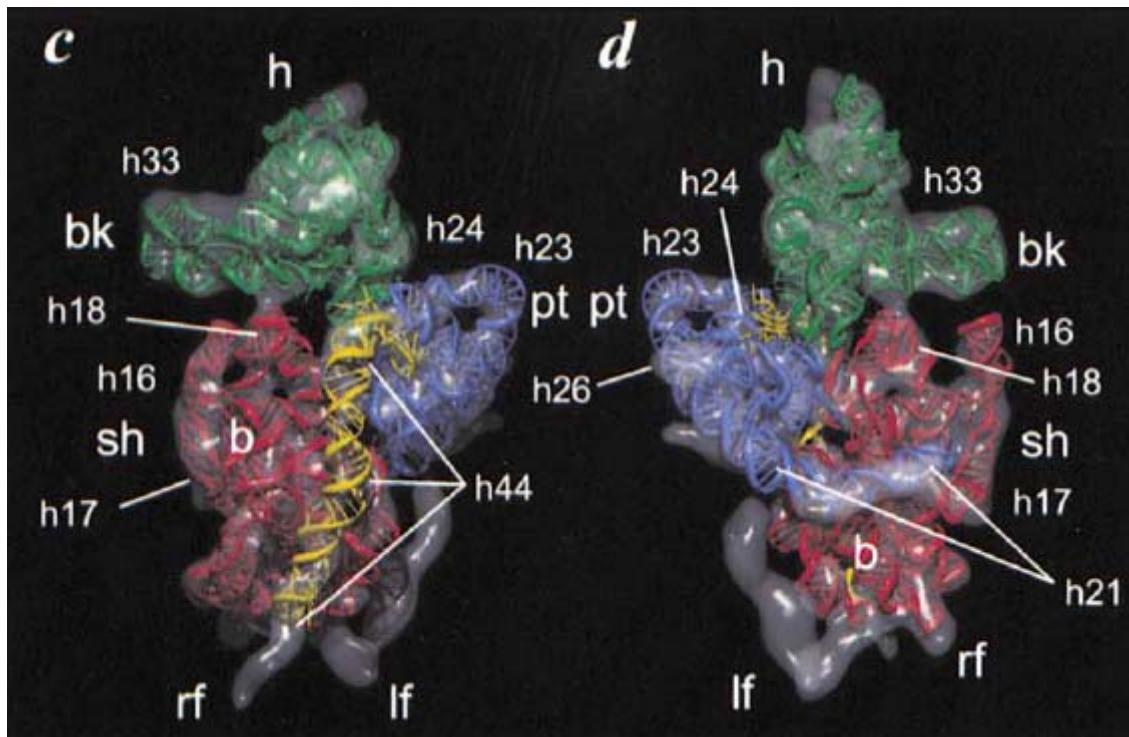


Abbildung 6: Die dreidimensionale Struktur der 18S rRNA. (Spahn et al., 2001) Die RNA ist transparent überlagert mit dem Bändermodell der bekannten rRNA-Struktur von *T. thermophilus*. (Abkürzungen: b=body, pt=platform, h=head, sh=shoulder, bk=beak, lf=left foot, rf= right foot, h33=Helix 33 usw.)

Die korrekte Faltung eukaryontischer rRNA ist also von zentraler Bedeutung für den Fortschritt der Biosynthese und die Funktion des Ribosoms. Im Laufe der Ribosomenbiogenese müssen RNA-Bereiche sowohl durch ribosomale Proteine als auch durch Biogenesefaktoren in ihre korrekte Konformation gebracht werden, um funktionelle Ribosomen zu erhalten.

1.2.4 Prozessierung der rRNA

Die Prozessierung der polycistronischen Vorläufer-rRNA (35S) in die rRNA-Spezies der beiden Untereinheiten stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum reifen Ribosom dar. Der Ablauf der einzelnen Prozessierungsschritte ist gut verstanden, allerdings sind nur wenige für die Spaltungen verantwortlichen Faktoren genau bekannt. Depletionen vieler Biosynthesefaktoren resultieren in Prozessierungsdefekten, was darauf hindeutet, dass der jeweilige Faktor für den entsprechenden Schritt eine Rolle spielt. Ob der betreffende Faktor direkt, also als Exo- oder Endonuklease, oder nur indirekt als Ko-Faktor gebraucht wird, ist in den meisten Fällen nicht bekannt.

Durch eine Abfolge von 11 endo- und exonukleolytischen Spaltungen wird das 35S-Transkript zu den reifen rRNA-Spezies (18S, 5.8S und 25S) prozessiert. In Abbildung 7 ist schematisch die Lage der Prozessierungsstellen auf dem 35S-Vorläufertranskript gezeigt.

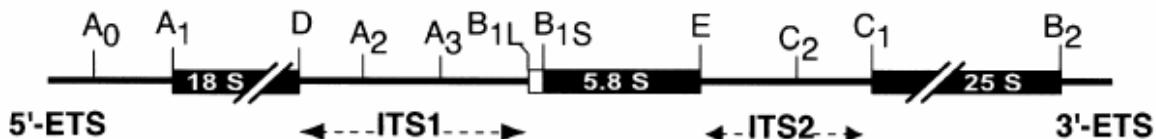


Abbildung 7: Schematische Darstellung der 35S Prä-rRNA mit den Prozessierungsstellen. Durch eine Abfolge der 11 endo- und exonukleolytischen Spaltungen (A_0 , A_1 , A_2 , A_3 , B_{1L} , B_{1S} , B_2 , C_1 , C_2 , D und E) werden die reifen rRNA-Spezies hergestellt (aus Fromont-Racine et al., 2003).

Der klassischen Sichtweise folgend beginnt die Prozessierung, nachdem die Transkription beendet ist (Abbildung 9). Das Auftreten von 35S-RNA-Spezies im 90S-Partikel bestätigt diese Vermutung. Dieser Vorläufer wird gebildet durch die Endonuklease Rnt1p an der Stelle B_0 im Bereich von 3'-ETS (B_0 ist in Abbildung 7 nicht gezeigt). Danach folgen aufeinander die drei Schnitte an den Stellen A_0 , A_1 und A_2 durch bisher noch unbekannte Enzyme. Es sind jedoch einige Faktoren beschrieben, die eine Rolle für diese Prozessierung spielen, darunter auch U3 snoRNP (s.u.). Dadurch werden die Vorläufer-rRNAs für die kleine Untereinheit (20S) und die große Untereinheit (27SA₂) hervorgebracht. Die 20S-rRNA im 40S-Vorläuferpartikel wird ins Zytoplasma transportiert und an der Stelle D geschnitten, um die reife 18S-rRNA zu erhalten. Ein vorzeitiger Schnitt an der Stelle A_3 führt nach dieser Vorstellung zu einem aberranten 23S-Produkt (Venema und Tollervey, 1999).

Ein alternativer Weg (Abbildung 8), der vor einiger Zeit vorgeschlagen wurde, ist die primäre Prozessierung an der Stelle A_3 (Billy et al., 2000; Wehner et al., 2002); u.a.). 23S-rRNA stellt hier ein normales Zwischenprodukt dar, das dann am 5'-Ende an A_0 (22S), A_1 (21S) und A_2 prozessiert wird, was dann wieder zu 20S führt. Wie im klassischen Weg wird dann 18S-rRNA durch die Prozessierung an Stelle D im Zytoplasma gebildet.

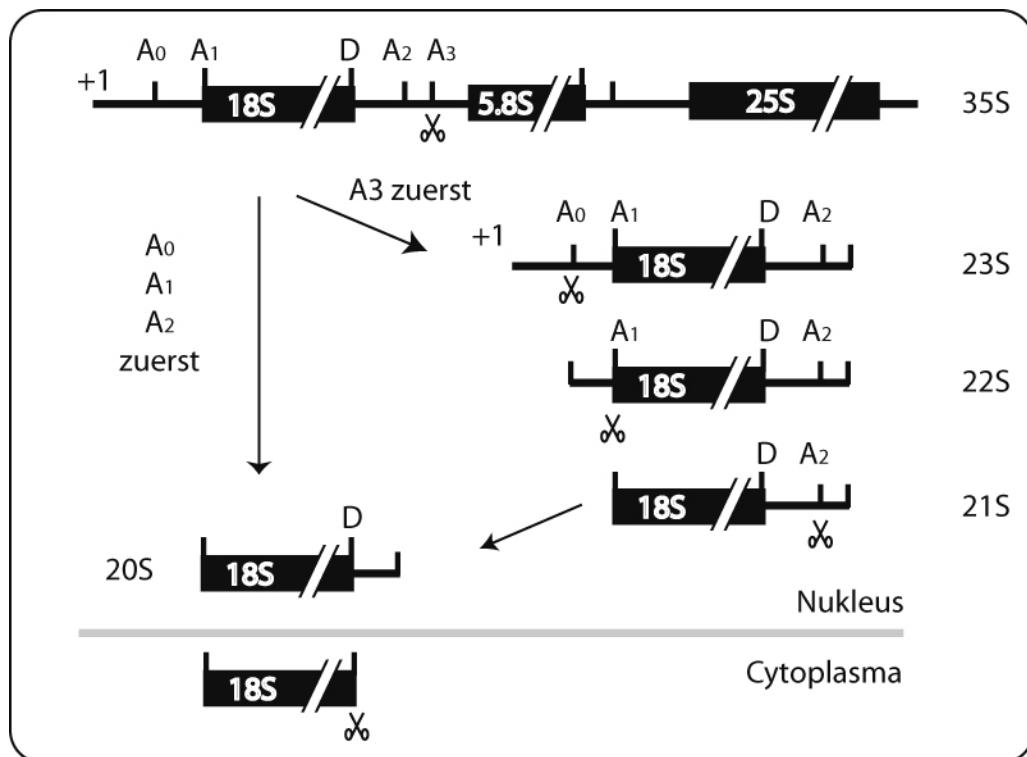


Abbildung 8: Die alternativen Synthesewege für 18S aus dem 35S-Vorläufer. Als mögliche Alternative zur klassischen Sicht (linker Weg: Schnitte A₀, A₁, A₂ und A₃) kann auch zuerst an A₃ geschnitten werden, danach A₀, A₁ und A₂ (rechter Weg).

Der Syntheseweg der rRNAs der großen Untereinheit ist durch alternative Schnittstellen viel komplexer (Abbildung 9) und braucht sowohl Endo- als auch Exonukleasen. Obwohl diese Prozessierung im Detail weniger gut verstanden ist, sind doch einige Enzymaktivitäten der 5.8S/25S-Prozessierung genau bekannt. Es können jedenfalls zwei Formen von 27SB Prä-rRNA, 7S-Prä-rRNA und daher der reifen 5.8S-rRNA produziert werden (Venema und Tollervey, 1999). Die reife Form von 5.8S_S ist am 5'-Ende um sieben Nukleotide kürzer als die alternative längere Form 5.8S_L. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen Formen ist unbekannt; 80-85% der 5.8S-rRNA sind in der kurzen Form 5.8S_S vorhanden.

Die meisten (85%) der 27SA₂-Prä-rRNA-Spezies werden an der Stelle A₃ durch den RNA-Protein-Komplex MRP geschnitten (Chu et al., 1994). Darauf folgt ein exonukleolytischer Verdau an der Stelle B_{1S} durch die Exonukleasen Rat1p und Xrn1p (Henry et al., 1994), woraus die Form 27SB_S entsteht. Im alternativen Prozessierungsweg wird durch einen unbekannten Mechanismus an der Stelle B_{1L} geschnitten, was in der Form 27SB_L resultiert. Es wird angenommen, dass die weitere Prozessierung von 27SB_L und 27SB_S bzw. 5.8S_L und 5.8S_S identisch verläuft. Das 3'-Ende der 27S-Formen wird durch einen exonukleolytischen Verdau von B₀ nach B₂ durch die Exonuklease Rex1p (RNase H) produziert (van Hoof et al., 2000). Die Vorläufer von 5.8S und 25S werden durch den Schnitt einer unbekannten Nuklease an der Stelle C₂ in der ITS2-Sequenz in 26S und 7S getrennt. Am 5'-Ende von 26S

wird nun durch Rat1p und Xrn1p das reife 5'-Ende der 25S prozessiert (Geerlings et al., 2000). Die Fertigstellung des 3'-Endes von 5.8S erfolgt in mehreren Schritten, an denen das Exosom sowie die Exonukleasen Rex1p und Rex2p beteiligt sind (van Hoof et al., 2000).

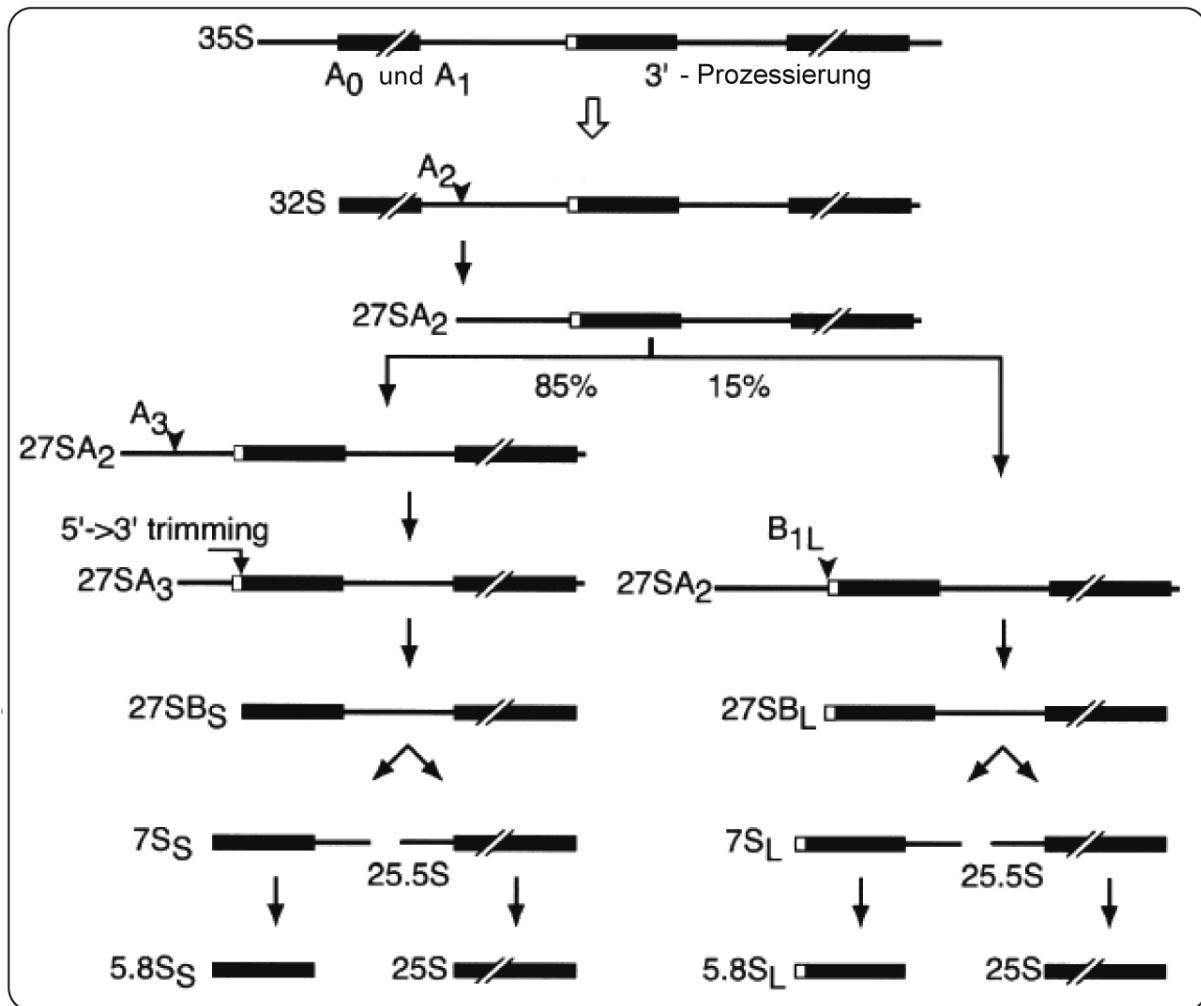


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Abfolge der Prozessierungsschritte, die zur reifen 25S und 5.8S rRNA führen (verändert nach Fromont-Racine et al., 2003). Zur besseren Übersicht wurde die Prozessierung für 18S-rRNA weggelassen. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text.

Die 5S-rRNA wird ebenfalls prozessiert. Das 5'-Ende entspricht bereits dem reifen Transkript, das 3'-Ende wird jedoch um 7 bis 13 Nukleotide verkürzt (van Hoof et al., 2000). An den Prozessierungsschritten sind neben den genannten Proteinen auch snoRNAs beteiligt (U3, U14, snR10, snR30). Auf die Rolle von U3 soll hier nun genauer eingegangen werden, da sie stark in die Prozessierung des Prä-40S-Partikel involviert ist.

Wie bereits erwähnt wird U3 für die Schnitte A₀, A₁ und A₂ benötigt (Hughes und Ares, 1991). U3 ist in einem Prozessierungskomplex zu finden, der als *small subunit processome* (SSU-Prozessom) bezeichnet wird (Dragon et al., 2002). Dieser Komplex wurde bei einer Suche nach U3-assoziierten Proteinen in einer zweistufigen Reinigung der Proteine Nop58p (integraler Bestandteil des U3 snoRNP) und Mpp10p identifiziert. Das ursprünglich gereinigte

Partikel enthielt 28 Proteine, von denen 17 bis dato unbekannt waren und die dann als *U-three proteins* (Utp1p bis Utp17p) bezeichnet wurden (teilweise wurden jedoch auch Proteine umbenannt). In weiteren Experimenten wurden 12 weitere Proteine identifiziert (Bernstein und Baserga, 2004).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen den *terminal balls* an den 5'-Enden der nascierenden RNA-Kette und dem SSU-Prozessom hergestellt werden, da sowohl durch Depletion von essentiellen Komponenten des SSU-Prozessoms (Dragon et al., 2002), als auch durch Mutationen der U3 snoRNA (Mougey et al., 1993) die terminal balls verschwanden. Daraus wurde abgeleitet, dass diese terminal balls den frühesten präribosomalen Komplexen (90S) entsprechen.

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Miller-Spreads* in verschiedenen Mutanten wurde vorgeschlagen, dass die Prozessierung der rRNA schon parallel zur noch laufenden Transkription der rRNA beginnt (Osheim et al., 2004). Dieser Vorschlag wurde gestützt durch Chromatin-Immunpräzipitationen, die zeigen, dass eine Subpopulation der Utps am rDNA-Lokus lokalisiert ist und mit der Transkription der rRNA in direkter Verbindung steht (Gallagher et al., 2004).

Problematisch an diesem Modell ist allerdings, dass es durch ko-transkriptionelles Prozessieren der rRNA niemals zur Bildung eines 35S-Vorläufertranskripts kommen würde. Dieses Transkript ist jedoch von vielen verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Daher wurde vorgeschlagen, dass der 90S-Prozessom-Partikel nur einer von weiteren möglichen 90S-Partikeln ist (Bernstein et al., 2004), die in einigen Veröffentlichungen beschrieben wurden (Grandi et al., 2002; Schafer et al., 2003). Die Analyse von 90S-Partikeln lässt den Schluss zu, dass die 40S-Synthesemaschinerie hauptsächlich mit der 35S-Prä-rRNA assoziiert vorliegt. Die 60S-Biogenesefaktoren hingegen binden erst, nachdem die Schnitte A₀, A₁ und A₂ durchgeführt sind.

1.2.5 Einbau der ribosomalen Proteine

Die r-Proteine sind integrale Bestandteile eines Ribosoms und übernehmen wichtige Aufgaben in seiner Funktion bei der Translation. Sie sind involviert in kotranslationale Prozesse, wie die Interaktion mit Faltungshelfern am *Exit-Tunnel* des Ribosoms (Kramer et al., 2002; Pool et al., 2002) sowie die kotranslationale Translokation der nascierenden Peptidkette ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (Beckmann et al., 2001; Clemons et al., 2004) und tragen (in Prokaryonten) zur mRNA-Helikase-Aktivität des Ribosoms bei

(Takyar et al., 2005). Im Zuge der Ribosomenbiogenese müssen die r-Proteine korrekt in die Struktur des Ribosoms eingebaut werden (Assemblierung), um eine fehlerfreie Funktion des Ribosoms zu gewährleisten.

Die Assemblierung der r-Proteine wurde intensiv im vergleichsweise einfachen System von Bakterien (*E. coli*) untersucht. Hier gelang es *in vitro*, funktionsfähige Ribosomen durch Zusammenfügen der Einzelkomponenten (reife rRNA und r-Proteine) herzustellen. Es konnte dabei eine Hierarchie in der Bindung von ribosomalen Proteinen an den ribosomalen Vorläufer festgestellt werden. Sogenannte *primary binder* stellen den ersten Kontakt mit der rRNA her und auf ihrer Basis werden die *secondary binder* und *tertiary binder* eingebaut (Held et al., 1974; Mizushima und Nomura, 1970). Ein wichtiges Detail der *in vitro*-Rekonstitution der 30S-Untereinheit von *E. coli* ist die Temperaturabhängigkeit. Nur bei Energiezufuhr durch Erhitzen auf ca. 55°C werden korrekte 30S-Untereinheiten gebildet, ansonsten entstehen nur 21S-26S-Intermediate (Culver und Noller, 2000). Diese Energiezufuhr wird *in vivo* vermutlich durch das Chaperonsystem DnaK übernommen, einer der wenigen Biogenesefaktoren in *E. coli* (Maki et al., 2002). Chaperone sind Katalysatoren, die als Faltungshelfer wirken, indem sie einem Protein ermöglichen, schnell die energetisch günstigste Faltung einzunehmen.

In Eukaryonten ist über den Einbau ribosomaler Proteine in die Vorläuferpartikel bisher nicht viel bekannt. In frühen Arbeiten wurde die Kinetik des Einbaus von einzelnen ribosomalen Proteinen in zytoplasmatische und nukleäre Partikel nach einem Puls von Tritium markierten Aminosäuren studiert. Daraus wurde eine grobe zeitliche Abfolge des Einbaus der ribosomalen Proteine abgeleitet, die zeigte, dass der Einbau der Proteine in die Vorläufer teilweise erst im Zytoplasma erfolgte (Kruiswijk et al., 1978c). Ein *in vitro*-Zusammenbau ribosomaler Untereinheiten von Eukaryonten ist bis dato nicht möglich, da hierbei offensichtlich eine Vielzahl von Biogenesefaktoren mit spezifischen Aufgaben benötigt wird. Hierzu gehört auch, dass die ribosomalen Proteine in Eukaryonten posttranskriptionale Modifikationen unterzogen werden, wie Methylierungen (Kruiswijk et al., 1978b) und Phosphorylierungen (Kruiswijk et al., 1978a). Die Wichtigkeit der Phosphorylierung ribosomaler Proteine zeigt sich auf struktureller Ebene. Im Zuge des Reifungsprozesses der kleinen Untereinheit wird unter anderem auch das Protein Rps3p durch die Kinase Hrr25p phosphoryliert, was die korrekte Ausbildung der *beak*-ähnlichen Struktur maßgeblich beeinflusst (Schafer et al., 2006).

Die Biogenesefaktoren und ihre Aufgaben an Präribosomen wurden bisher verstärkt untersucht und in charakteristischen Phänotypen beschrieben. Dagegen blieben die Aufgaben,

die die ribosomalen Proteine bei der Biogenese der Ribosomen übernehmen könnten, relativ lange unbeachtet.

In einer systematischen Analyse wurde die Rolle der ribosomalen Proteine in der Biogenese der 40S-Untereinheit untersucht, indem die r-Proteine der kleinen Untereinheit *in vivo* abgereichert wurden und somit die Assemblierung der Prä-40S-Untereinheit blockiert wurde. Der Effekt dieser Assemblierungsblockierung wurde auf rRNA-Ebene untersucht (Ferreira-Cerca et al., 2005). Hierbei zeigte sich, dass die ribosomalen Proteine in vier Untergruppen eingeteilt werden können, entsprechend den beobachteten Phänotypen der rRNA-Prozessierung. Eine Gruppe bildet keine 20S-rRNA mehr, eine weitere bildet sie zwar noch, sie wird allerdings nicht mehr in Zytoplasma exportiert. Die dritte Gruppe bildet 20S rRNA, diese wird auch ins Zytoplasma exportiert, aber nicht in reife 18S konvertiert. Die vierte Gruppe schließlich bildet 20S, exportiert sie ins Zytoplasma und konvertiert sie zu reifer 18S, allerdings mit einer Verzögerung.

Die korrekte Assemblierung der ribosomalen Proteine ist also für die Prozessierung der Vorläufer-rRNA und den Transport des reifenden Partikels ins Zytoplasma von maßgeblicher Bedeutung. Bis auf drei Ausnahmen sind alle r-Proteine in *S. cerevisiae* essentiell – ganz im Gegensatz zu ihren prokaryontischen Homologen. Dort werden mindestens ein Drittel der r-Proteine in *E. coli* für ein Wachstum bei 37°C nicht gebraucht. (Dabbs, 1991).

In der Literatur werden Biogenesefaktoren oft als *Assembly*-Faktoren bezeichnet (Fromont-Racine et al., 2003; Hage und Tollervey, 2004), also als solche Proteine, die für den korrekten Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten benötigt werden. Dies ist eine weit gehaltene Definition, denn es fehlt bisher an detaillierten Kriterien, anhand derer man die Aussagen überprüfen kann. Biogenesefaktoren, die einen Einfluss auf die Prozessierung der rRNA haben, sind nicht zwangsläufig Assemblierungsfaktoren.

1.2.6 Export der ribosomalen Untereinheiten

Der Wirkungsort der Ribosomen ist das Zytoplasma, die ersten Schritte der Ribosomenbiogenese finden allerdings im Nukleolus statt. Das reifende Ribosom muss also den Zellkern verlassen. Hierzu muss der Vorläufer den Kernporenkomplex (NPC) passieren. Der NPC ist eine komplexe makromolekulare Struktur, die aus Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen, aufgebaut ist. In der Hefe *S. cerevisiae* besteht der Porenkomplex aus etwa 30 Nukleoporinen und besitzt eine Masse von 66 MDa (Rout et al., 2000; Rout und Blobel, 1993). Die Dimensionen des Kanals innerhalb des Kernporenkomplexes (ca. 500 Å) lassen

nur den Export von Ribosomen in ihre Untereinheiten getrennt als Prä-40S und Prä-60S zu (Gleizes et al., 2001; Yang et al., 1998). Die Untereinheiten gelangen außerdem unabhängig voneinander ins Zytoplasma, denn Mutationen, die die Synthese einer der beiden Untereinheiten betreffen, verhindern nicht den Export der unbeeinflussten Untereinheit (Venema und Tollervey, 1999).

Kleine Moleküle wie H₂O sowie Ionen oder Proteine kleiner als 40 kDa können durch die Pore diffundieren. Der Transport von Makromolekülen durch die Kernpore funktioniert nur unter Aufwendung von Energie (Hydrolyse von GTP) als ein zielgerichteter Prozess, der durch spezifische Transportsignale reguliert wird. Proteine, die in den Zellkern importiert werden, besitzen eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS). Dagegen besitzen Proteine, welche aus dem Zellkern exportiert werden, ein nukleäres Exportsignal (NES). Diese Aminosäuresequenzen werden von spezifischen Transportfaktoren, den Karyopherinen, erkannt, die den Durchtritt durch die Kernpore vermitteln. Zur Familie der Karyopherine gehören die Importin-β-ähnlichen Proteine, welche nach dem ersten charakterisierten Transportfaktor benannt wurden. Aufgrund ihrer zellulären Funktion für den Import und den Export unterscheidet man in Importine und Exportine (Gorlich und Kutay, 1999; Mattaj und Englmeier, 1998; Pemberton et al., 1998). Proteine der β-Karyopherinsuperfamilie sind aufgebaut aus einem Doppelmotiv von HEAT-Repeats (Huntington-elongation-A subunit-TOR), die zwei antiparallele α-Helices bilden, welche durch eine Windung miteinander verbunden sind (Chook und Blobel, 1999; Cingolani et al., 1999). β-Karyopherine enthalten 18-20 dieser Repeats (Matsuura und Stewart, 2004), die zusammen eine Superhelix bilden. Diese superhelikale Struktur spielt vermutlich beim Prozess der Translokation durch die Kernpore eine Rolle, wie weiter unten ausgeführt wird.

Die Kernporenproteine sind nicht nur die strukturellen Bausteine der Kernpore, sondern besitzen wichtige Funktionen bei der Translokation von Transportsubstraten. Hervorzuheben sind 12 Nukleoporine, die eine sogenannte *FG-repeat*-Domäne besitzen. Diese Domäne enthält mehrere Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin (F) und Glycin (G) in unterschiedlichen Motiven (FG, GLFG oder FxFG). Für die Bedeutung dieser FG-Repeats in der Kernpore gibt es verschiedene Modelle. Es ist zum einen möglich, dass aufgrund der Interaktion der FG-repeats mit Transportfaktoren diese Domänen die Bindestellen der Kernpore für die Karyopherine darstellen (Rout und Aitchison, 2001; Ryan und Wente, 2000). In einem anderen Modell wurde vorgeschlagen, dass das Lumen der Pore durch die FG-Repeats ein hydrophobes Netzwerk bildet, das die freie Diffusion von großen Molekülen und Komplexen stark erschwert oder verhindert (Ribbeck und Gorlich, 2002). Diese Barriere wird

von Transportmolekülen mit Hilfe der β -Karyopherine überwunden, die bedingt durch ihre superhelikale Struktur (s.o.) ihrerseits mit den FG-Repeats interagieren können und so hydrophiles Transportgut abschirmen.

Für den Export binden die Exportine an die NES, die als Leucin-reiche Regionen beschrieben sind, wie z.B. im cAMP-abhängigen Proteinkinase-Inhibitor (PKI) (Wen et al., 1995) oder auch im HIV-I Rev Protein (Fischer et al., 1995). Die Bindung des Exportins erfolgt in Gegenwart von RanGTP, der GTP-gebundenen Form der kleinen GTPase Ran. Nach dem Durchtritt durch die Kernpore ins Zytoplasma wird die GTPase-Aktivität von Ran durch das RanGAP (Ran activating protein) zur Hydrolyse des GTP stimuliert, was zur Folge hat, dass das Transportmolekül vom Exportrezeptor entlassen wird. Das Exportin für Leucin-reiche Exportsequenzen ist Crm1p (wird synonym auch Xpo1p genannt), das ebenfalls zu den β -Karyopherinen gehört (Fornerod et al., 1997).

Der Export der präribosomalen Untereinheiten ist ebenfalls an den Ran-Zyklus gekoppelt (Moy und Silver, 1999) und hängt für beide Untereinheiten auch von Crm1p als Exportin ab (Gadal et al., 2001; Ho et al., 2000; Moy und Silver, 2002). Die Exportmaschinerie interagiert mit den präribosomalen Untereinheiten über einen Exportadapter, der bindet sowohl an die präribosomalen Untereinheiten als auch an Crm1p bindet und ist essentiell für den Export.

Für den Export der Prä-60S-Untereinheit wird neben Nukleoporinen, dem Ran-System und Crm1p das Protein Nmd3p benötigt. Nmd3p weist in seinem C-Terminus zwei Leucin-reiche Regionen auf, von denen gezeigt werden konnte, dass sie als Exportsignale dienen (Gadal et al., 2001; Hedges et al., 2006). Nmd3p bindet im Nukleus an den ribosomalen Vorläufer der großen Untereinheit und stellt nun mit dem Exportrezeptor Crm1p die Verbindung zur RanGTP-abhängigen Exportmaschinerie und dem NPC her (Johnson et al., 2002; Thomas und Kutay, 2003; Trotta et al., 2003). Sobald der Exportkomplex ins Zytoplasma gelangt, verlässt Nmd3p die Untereinheit, noch bevor sich die 40S- und 60S-Untereinheiten zum reifen 80S-Ribosom zusammenlagern. Dieser Schluss wurde gezogen, weil Nmd3p nie an translatierenden Polysomen gefunden wurde (Ho und Johnson, 1999). Nmd3p wird nun in den Zellkern reimportiert und steht für den Export weiterer Untereinheiten zur Verfügung (Gadal et al., 2001).

Das ribosomale Protein der 60S-Untereinheit, Rpl10p, spielt ebenfalls eine Rolle beim Export. Frühere Arbeiten ließen vermuten, dass die Bindung von Nmd3p an Rpl10p eine Qualitätskontrolle ermöglicht, da Rpl10p für die Verbindung der Untereinheiten bei der Translation benötigt wird und in räumlicher Nähe zur Peptidyltransferasestelle liegt (Dick et al., 1997; Eisinger et al., 1997).

In neueren Arbeiten wurde die zytoplasmatische GTPase Lsg1p als ein weiterer Faktor ins Spiel gebracht. Sie kann an freie zytoplasmatische 60S-Untereinheiten assoziieren, ist selbst aber nie im Nukleus zu finden (Kallstrom et al., 2003). Interessanterweise akkumulieren Mutanten von Lsg1p Prä-60S-Untereinheiten im Nukleolus, was zu dem Schluss führte, dass Lsg1p die Freisetzung eines nukleären Biogenesefaktors von der 60S-Untereinheit bewirkt. Dieser nukleäre Faktor ist vermutlich Nmd3p, für dessen Freisetzung vom zytoplasmatischen 60S-Vorläufer sowohl Rpl110p als auch Lsg1p benötigt werden. Dies macht deutlich, dass Nmd3p der limitierende Exportfaktor des Prä-60S-Partikels ist (Hedges et al., 2005).

Für den Export der Prä-40S ist bisher kein Exportadapter ähnlich Nmd3p bekannt. Selbst eine groß angelegte Suche mit ca. 800 konditional-letalen Hefestämmen nach einem solchen Adapter verlief bisher erfolglos. Es konnte dabei aber gezeigt werden, dass Yrb2p für den effizienten Crm1p-abhängigen Export benötigt wird und dass Nukleoporine im Export der kleinen Untereinheit ebenfalls eine Rolle spielen (Moy und Silver, 2002).

Daher wurde vorgeschlagen, dass es beim Export dieser Untereinheit mehrere solcher Adapter geben könnte, die redundant und daher einzeln nicht essentiell sind. Ein solcher Adapter könnte das nicht essentielle Protein Ltv1p sein, das Crm1p-abhängig zwischen Kern und Zytosoma pendelt, genetisch mit Yrb2 interagiert und für den effizienten Export der Prä-40S gebraucht wird. (Seiser et al., 2006).

Fraglich beim Export der ribosomalen Untereinheiten aus dem Zellkern ist, wie ein vergleichsweise kleines Protein wie Crm1p gemessen am großen, makromolekularen Komplex einer Untereinheit beim Transport der Untereinheit durch die Pore diese von den hydrophoben FG-Repeats in der Pore abschirmen soll. Ein einzelnes Karyopherin würde für eine ribosomale Untereinheit nicht ausreichen. Daher wurde vorgeschlagen, dass Biogenesefaktoren diese Rolle mit übernehmen könnten. Diskutiert werden hierfür unter anderen die Proteine Rrp12p, Utp10p und Utp20p. Alle drei Proteine zeichnen sich durch relativ große molare Massen aus (138-287 kDa) und sind trotz generell getrennter Synthesewege an der Biogenese beider Untereinheiten beteiligt (Dragon et al., 2002; Gavin et al., 2002; Schafer et al., 2003). Basierend auf Computerberechnungen wurden für alle drei Proteine HEAT-Repeats vorausgesagt, die den Kernexport der Untereinheiten ins Zytosoma beeinflussen sollen (Oeffinger et al., 2004). Die Computervorhersage berechnete diese Repeats auch für drei Noc-Proteine (Noc1p, Noc3p und Noc4p), für die eine Funktion im Kernexport der ribosomalen Untereinheiten bereits beschrieben wurde (HEAT-Repeats in

Noc-Proteinen: (Dlakic und Tollervey, 2004; Oeffinger et al., 2004); Noc-Proteine und Kernexport: (Milkereit et al., 2001; Milkereit et al., 2003b)).

1.3 Regulation der Ribosomenbiogenese

Die Zelle reagiert schnell auf sich ändernde Wachstumsbedingungen wie z.B. Typen, Menge und Verfügbarkeit von Nährstoffen, Temperatur, Osmolarität und pH-Wert des umgebenden Mediums, UV-Strahlung oder auch giftige Substanzen. Bei ungünstigen Wachstumsbedingungen wird die Synthese der Ribosomen gestoppt, um Energie zu sparen. Ebenso wird mit weiteren wachstumsgekoppelten Prozessen z.B. der Genexpression der *Housekeeping*-Gene verfahren. Andere Gene wiederum werden stark exprimiert, weil sie in die Stressantwort der Zelle involviert sind (z.B. Hitzeschockproteine). Fraglich ist allerdings die Reihenfolge, d.h. welcher Prozess nun welchem hierarchisch übergeordnet ist.

Für die Ribosomenbiogenese werden die Aktivitäten von allen drei RNA-Polymerasen in koordinierter Weise benötigt, da für die Produktion von funktionsfähigen Ribosomen die Einzelkomponenten (ribosomale Proteine und rRNA-Spezies) in äquimolaren Mengen gebraucht werden. In der Koordination der drei Polymerasen scheinen die beiden Serin/Threonin-Kinasen Tor1p und Tor2p (*target of rapamycin*) des TOR-Signaltransduktionswegs eine wichtige regulatorische Rolle zu spielen. Sind genug Nährstoffe vorhanden, sind die TOR-Kinasen aktiv und geben positive Signale an alle drei RNA-Polymerasen. Der TOR-Signaltransduktionsweg kann mit Hilfe des immunsuppressiven Macroliden Rapamycin, das die Kinasen Tor1p und Tor2p spezifisch inhibiert, untersucht werden. Rapamycin ruft dieselbe Wirkung hervor wie die Abreicherung einer Aminosäure im Nährmedium, was ungünstige Wachstumsbedingungen für die Zelle darstellt. Eine Rapamycin-Behandlung oder anderweitige Inaktivierung des TOR-Signaltransduktionswegs blockiert den Zellzyklus im Übergang von der G1- zur S-Phase und führt zu physiologischen Veränderungen, die charakteristisch für Zellen im G0-Stadium sind (Zaragoza et al., 1998). Aktive TOR-Kinasen begünstigen die Proteinsynthese bei gleichzeitiger Inhibition der Proteindegredation. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen hingegen wird der TOR-Signaltransduktionsweg inhibiert, was zu einer Reduktion der Proteinsyntheserate und Erhöhung der Proteindegredation führt. Somit sorgt der TOR-Signaltransduktionsweg für eine Balance zwischen Proteinsynthese und -abbau, so dass die Zelle ihre Massezunahme schnell an die Menge der verfügbaren Nährstoffe anpassen kann. Als eine zentrale Kontrollstelle für das Zellwachstum kontrolliert der TOR-Signaltransduktionsweg auch die Ribosomen-

biogenese und koppelt die Verfügbarkeit von Nährstoffen an die Regulation der Ribosomenbiosynthese (Schmelzle und Hall, 2000).

Eine Möglichkeit der Regulierung der Pol-I-Aktivität geschieht über den TOR-Signaltransduktionsweg, der u.a. auf den essentiellen Initiationsfaktor Rrn3p einwirkt (siehe Abschnitt 1.2.1). Behandlung mit Rapamycin inaktiviert Rrn3p und verhindert so die Komplexbildung zwischen Pol I und Rrn3p, die für die Initiation der Pol I-abhängigen Transkription notwendig ist (Claypool et al., 2004).

Die Pol-II-abhängige Transkription von ribosomalen Proteingenen wird durch TOR auf Ebene der Promotoren beeinflusst. Hierbei spielen die Transkriptionsfaktoren Fhl1p mit den Ko-Faktoren Ifh1p (Ko-Aktivator) und Crf1p (Ko-Repressor) (Martin et al., 2004; Schawalder et al., 2004; Wade et al., 2004) sowie das Zinkfinger-Protein Sfp1p (Jorgensen et al., 2004) wichtige regulatorische Rollen, die wiederum durch TOR in ihrer Funktion beeinflusst werden.

Über die Regulation der Pol-III-abhängigen Transkription ist bisher nicht viel bekannt. Es gibt allerdings Hinweise auf ein Zusammenwirken des TOR-Signaltransduktionswegs und des Signaltransduktionsweges der durch extrazelluläre Signale regulierten Kinase ERK. Beide wirken sowohl auf Pol-I-Transkription, sowie möglicherweise auch auf die Transkription durch Pol III (White, 2005).

Zusätzlich zu den ribosomalen Komponenten (r-Proteine und rRNA) werden von den Zellen für die Herstellung von Ribosomen ca. 180 weitere Biogenesefaktoren (Proteine) und etwa die gleiche Anzahl an sn- und snoRNPs für den Zusammenbau der Einzelkomponenten zu reifen Ribosomen benötigt. Diese Biogenesefaktoren sind in vielfältige Aufgaben am reifenden Ribosomenvorläufer involviert (s.o.). Die Regulation ihrer Synthese erfolgt in sogenannten RiBi-Regulons (Gasch et al., 2000; Jorgensen et al., 2004), einer Art Transkriptionsprogramme, die die Ribosomenbiogeneserate in Bezug auf die intra- und extrazellulären Bedingungen vorgeben. Es sind die größten in Hefe bekannten Einheiten koordiniert exprimierter Gene. Auch auf diese Einheiten nimmt der TOR-Signaltransduktionsweg wiederum Einfluss, indem durch die Aktivitäten der TOR-Kinasen die subzelluläre Lokalisation vieler spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

Da die Ribosomenbiogenese einen großen Teil des Zellstoffwechsels ausmacht und folglich stark reguliert ist, liegt die Vermutung nahe, dass es Überschneidungen mit dem Zellzyklus gibt. Dieser Zusammenhang wurde in einigen Arbeiten aufgezeigt. Es wurde beobachtet, dass die Deletion von Proteinen des SSU-Prozessoms zu einer Verzögerung von G1 führt und der Unfähigkeit der Zellen erneut in den Zellzyklus einzutreten (Bernstein und Baserga, 2004).

Andere Autoren weisen auf Zusammenhänge zwischen Replikation und Ribosomenbiogenesefaktoren der 60S-Untereinheit hin (Du und Stillman, 2002; Oeffinger et al., 2007; Oeffinger und Tollervey, 2003; Zhang et al., 2002). Allerdings sind die Mechanismen, die den Zellzyklus und die Ribosomenbiogenese koordinieren, weitestgehend unbekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Biogenese von Ribosomen in *S. cerevisiae* und anderen Eukaryonten ein hoch komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren benötigt, damit translationskompetente Ribosomen produziert werden können. Die Anzahl an Faktoren, die für die Produktion reifer Ribosomen benötigt wird, übersteigt die Anzahl an ribosomalen Proteinen bei Weitem (Hage und Tollervey, 2004). Präribosomale Partikel werden im Nukleolus zusammengebaut und durchlaufen während ihres Transports durch den Zellkern hin zur Kernpore zahlreiche Reifungsschritte, an denen die Biogenesefaktoren maßgeblich beteiligt sind. Durch Einzeluntersuchungen von Biogenesefaktoren gelangen erste Einblicke in den Biogeneseweg der 40S- und 60S-Untereinheit, ein vollständiges Bild des gesamten Netzwerkes entsteht jedoch nur langsam. Ein Hauptproblem stellt hierbei die Sensitivität der Methoden dar, die zur Identifizierung der präribosomalen Biogenesefaktoren angewendet werden. In den letzten Jahren ist es gelungen, mit der Einführung der zweistufigen Affinitätsreinigung (Rigaut et al., 1999) in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen eine große Vielzahl der Biogenesefaktoren mit unterschiedlichen Intermediaten von Ribosomenvorläufern zu reinigen und dadurch Momentaufnahmen der Zusammensetzung eines reifenden Partikels zu machen (Baßler et al., 2001; Fatica et al., 2002; Gavin et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Ho et al., 2002; Nissan et al., 2002). Einen Überblick über die Biogenesefaktoren und die Komplexe, in denen sie gefunden wurden, gibt die im Internet abrufbare Datenbank www.pre-ribosome.de (Milkereit et al., 2003a).

1.4 Die Noc-Proteine

Unter den vielen Biogenesefaktoren, die für die Produktion von funktionellen Ribosomen benötigt werden, spielt die Familie der Noc-Proteine (nucleolar complex) eine wichtige Rolle. Die Familie umfasst die fünf Mitglieder Noc1p, Noc2p, Noc3p, Noc4p und Nop14p (teilweise auch Noc5p genannt), die sowohl an der Reifung der 60S- als auch der 40S-Untereinheit beteiligt sind.

Die Proteine Noc1p, Noc2p und Noc3p sind für die Biogenese der 60S-Untereinheit erforderlich. Dort sind sie in die Prozessierung und den intranukleären Transport involviert

und sind dynamisch mit dem Prä-60S-Vorläufer assoziiert (Milkereit et al., 2001). Noc1p und Noc2p bilden einen stabilen heterodimeren Komplex, der mit 90S und Prä-60S assoziiert und im Nukleolus lokalisiert ist. Die Reifung des Prä-60S-Partikel geht mit einem Austausch von Noc1p gegen Noc3p einher, wobei ein Übergang der Partikel vom Nukleolus ins Nukleoplasma stattfindet. Diese Dynamik in den Komplexen mit Noc2p scheint ein wesentliches Element bei der Reifung der 60S-Untereinheit zu sein. Die Rolle von Noc1p, Noc2p und Noc3p wurde durch Affinitätsreinigungen, Analysen hinsichtlich synthetischer Letalität, subzelluläre Lokalisierung, Lokalisierung in Ribosomenprofilen und Prozessierung der Prä-rRNA in ts-Mutanten weiter charakterisiert. Es ist unklar, ob der Austausch von Noc1p gegen Noc3p ein aktives Transportsignal für den Vorläufer darstellt oder ob der Vorläufer durch den Noc1p-Noc2p-Komplex aktiv im Nukleolus zurückgehalten wird (Milkereit et al., 2001).

Noc3p spielt eine weitere interessante Rolle in der Replikation der DNA. Es hat ein basisches *Helix-Loop-Helix*-Motiv und kann daher an DNA binden. Es interagiert mit MCM- (mini chromosome maintenance) und ORC-Proteinen (origin recognition complex) und bindet während des Zellzyklus sowohl an Chromatin als auch an Replikationsfaktoren. Dort spielt es eine direkte Rolle in der Initiation der Replikation (Zhang et al., 2002).

Ähnlich wie beim Syntheseweg der 60S-Untereinheit spielt auch bei der Synthese der 40S-Untereinheit ein heterodimerer Komplex aus den Noc-Proteinen Noc4p und Nop14p eine Rolle. Dieser hauptsächlich nukleolär lokalisierte und für die Biosynthese der 40S-Untereinheit essentielle Komplex ist sehr stabil, wie durch Koimmunpräzipitation gezeigt werden konnte. Ribosomenprofile, ein 40S-Export-Assay, Lokalisierungsstudien und Analysen von temperaturabhängig letalen Mutanten ergaben, dass der Noc4p-Nop14p-Komplex an den 90S- und Prä-40S-Partikel assoziiert und für die Prozessierung und den Transport von Prä-40S benötigt wird. Die genaue Wirkungsweise dieses Komplexes am 40S-Vorläufer ist nicht bekannt. Die konditional letalen Mutanten von NOC4 zeigen einen Defekt in der Prozessierung von A₀, A₁ und A₂, was zu einer starken Abnahme von 18S rRNA im Zytoplasma führt. In der Analyse von Ribosomenprofilen wurde ein gestörtes Verhältnis von 40S- zu 60S-Absorptionsmaxima mit stark reduzierten 40S-Peaks beobachtet. Außerdem war eine Fehllokalisierung von Nop14p im Zytoplasma zu beobachten (Milkereit et al., 2003b).

Durch Koimmunpräzipitation wurde Emg1p als ein weiterer Bindungspartner für Nop14p identifiziert. Emg1p ist ein sowohl zytoplasmatisch als auch kernständig lokalisiertes, essentielles Protein. Es wird für die Produktion der 40S-Untereinheit benötigt, wie durch Ribosomenprofile von konditional letalen Mutanten gezeigt wurde. Emg1p wird in ähnlicher

Weise wie ribosomale Proteine unter Stress reguliert, woraus ebenfalls auf eine Rolle in der Ribosomenbiogenese geschlossen wurde. Die Depletion von Nop14p bewirkt eine ausschließlich zelluläre Lokalisierung von Emg1p im Zytoplasma, woraus abgeleitet wurde, dass Nop14p für die Kernlokalisierung von Emg1p verantwortlich ist (Liu und Thiele, 2001). Drei der fünf Noc-Proteine - Noc1p, Noc3p und Noc4p - zeichnen sich durch eine ca. 45 Aminosäuren umfassende Region aus, deren Sequenzen große Homologien aufweisen. Diese Region wird Noc-Domäne genannt. Die Homologie ist artüberschreitend nachweisbar, man findet sie in allen untersuchten eukaryontischen Organismen einschließlich des Menschen. In Noc3p liegt sie direkt am C-Terminus des Proteins, während sie in Noc1p und Noc4p im hinteren Drittel des Proteins zu finden ist. Die Überexpression der Noc3p-Noc-Domäne führt zur nukleolären Akkumulation von Prä-60S-Partikeln und zu Wachstumsdefekten, ohne jedoch die rRNA-Prozessierung zu beeinflussen (Milkereit et al., 2001). Eine genaue Funktion dieser Domänen kann bisher nicht benannt werden, da Untersuchungen auf molekularer Ebene bisher nicht durchgeführt wurden.

2 Aufgabenstellung

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Tschochner wurden die Noc-Proteine Noc1p, Noc2p und Noc3p identifiziert und ihre Rolle in der Ribosomenbiogenese beschrieben (Milkereit et al., 2001). Die hierbei entdeckte Noc-Domäne in Noc1p und Noc3p wurde durch eine *Blast*-Suche in einem weiteren offenen Leseraster gefunden, und das zugehörige Protein wurde Noc4p genannt. Durch Affinitätsreinigung von Noc4p unter stringenten Bedingungen wurde mittels massenspektrometrischer Analysen das Protein Nop14p als Bindungspartner identifiziert. Diese Interaktion wurde im reversen Experiment bestätigt. Weitere Untersuchungen an Noc4p zeigten, dass Noc4p für die Biogenese und den Kernexport des Vorläufers der 40S-Untereinheit benötigt wird (Milkereit et al., 2003b).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Komplex aus Noc4p und Nop14p in seiner Funktion in der Ribosomenbiogenese mit biochemischen, molekularbiologischen, genetischen und computertechnischen Methoden genauer zu charakterisieren.

Zum einen sollten interaktionsrelevante Domänen von Noc4p in Bezug auf Bindung an Nop14p, rRNA und U3 snoRNA kartiert werden, auch im Hinblick auf eine Analyse der Funktion der Noc4p-Noc-Domäne. Es sollte zudem überprüft werden, ob die Noc-Domänen von Noc1p und Noc3p die Noc4p-Noc-Domäne ersetzen können. Die Relevanz der Interaktion von Noc4p mit Nop14p in Bezug auf Bindung an rRNA und den Kernimport sollte geprüft werden.

Weiterhin sollte die Rolle von Noc4p im Kernexport der Prä-40S-Untereinheit, unter Verwendung des temperatursensitiven Allels *noc4-8*, mit einem verbesserten Assay genauer studiert werden.

Schließlich sollten in einem weiteren Teil der Arbeit die bisher publizierten Daten der systematischen Affinitätsreinigungen, die relevante Proteinkomplexe der Ribosomenbiogenese enthalten, in Form einer online zugänglichen Datenbank auswertbar gemacht werden. Diese soll einen Überblick über kogereinigte Faktoren geben und die gezielte Suche nach Komplexen ermöglichen, um unter anderem den Noc4p-Nop14p-Komplex im Netzwerk präribosomaler Biogenesefaktoren besser einordnen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung interaktionsrelevanter Proteindomänen von Noc4p in *S. cerevisiae*

Das essentielle Protein Noc4p von *S. cerevisiae* bildet einen stabilen, heterodimeren Komplex mit Nop14p. Dieser Komplex spielt für die Ribosomenbiogenese eine wichtige Rolle in der Prozessierung der Prä-rRNA und dem Export der reifenden Präribosomen der kleinen Untereinheit aus dem Nukleus (Milkereit et al., 2003b).

Noc4p wurde als ein Protein der Noc-Familie beschrieben, weil es eine Noc-Domäne enthält. Um die Rolle dieser und weiterer Proteindomänen von Noc4p für die Funktion der Ribosomenbiogenese und die Komplexbildung mit Nop14p aufzuklären, wurde eine detaillierte molekulare Analyse von Noc4p auf Basis von Proteindomänen durchgeführt.

Hierzu wurde Noc4p (in bereits durchgeführten Vorarbeiten von Dr. Philipp Milkereit) in Domänen zerlegt, die auf Grund ihrer Konservierung im Bezug auf Noc4p aus anderen Organismen definiert wurden. Die Strategie hierbei war, dass man hinterher beliebige Domänen für eine funktionale Untersuchung wieder zusammenführen kann. Dazu wurde hinter jeder Domäne eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease (Sall) eingefügt. Das Konstrukt mit der Schnittstelle wurde nun auf seine Funktionalität hin untersucht, um festzustellen, ob die eingefügte Schnittstelle die Funktion von Noc4p beeinträchtigt. Hierbei konnte in keinem der Fälle ein Einfluss beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden die Domänen so miteinander kombiniert, dass systematisch alle Domänen sowohl vom N- als auch vom C-Terminus her deletiert wurden. Zusätzlich wurden noch Kombinationen von Deletionen hergestellt. Die Abbildung 1 zeigt schematisch die Zusammensetzung der Deletionsmutanten.

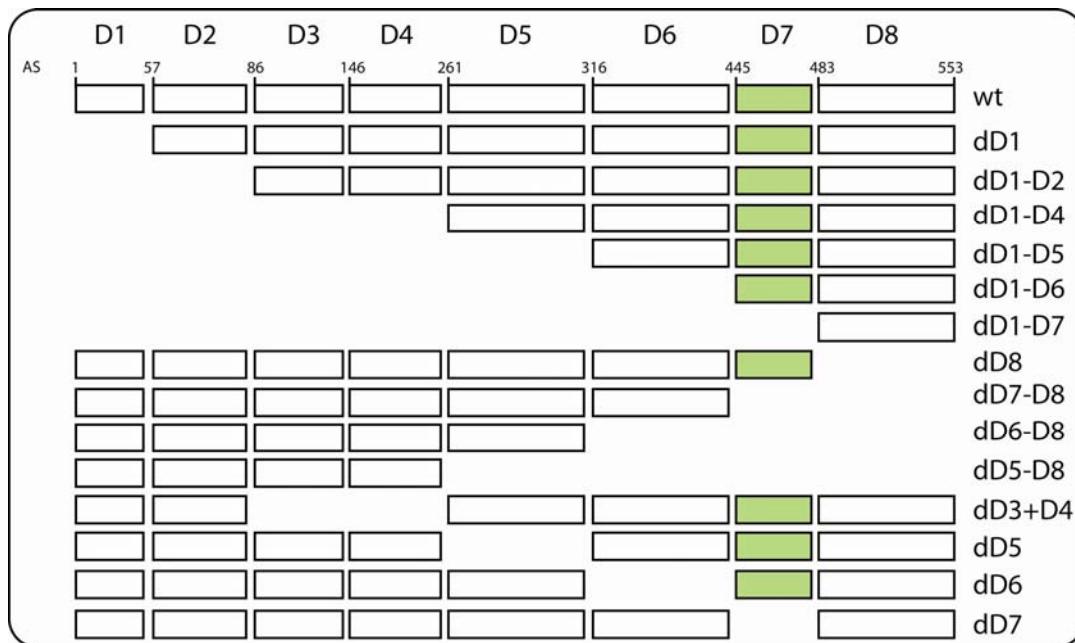


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte. Die grünlich eingefärbte Domäne stellt die Noc-Domäne dar, ein Bereich mit hoher Konservierung, der auch in Noc1p und Noc3p zu finden ist. AS = Aminosäure; die Zahl gibt an, bei welcher Aminosäure die jeweilige Domäne beginnt.

Die hergestellten Varianten des NOC4 wurden in den Vektor pNOP-PA kloniert, in dem sie unter der Kontrolle des konstitutiven Promoters von NOP1 stehen und zusätzlich N-Terminal mit dem ProteinA-Epitop fusioniert sind (Ein Großteil der Plasmide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Philipp Milkereit). Mit dieser Epitopmarkierung ist man in der Lage zum einen die Konstrukte im *Westernblot* zu detektieren, zum anderen bietet sich die Möglichkeit, die Konstrukte gezielt aus Gesamtzellextrakten zu präzipitieren und nach assoziierten Faktoren zu suchen, wie z.B. dem Interaktionspartner Nop14p oder auch nach RNA.

3.1.1 Genetische Untersuchungen mit Deletionsmutanten der Proteindomänen

3.1.1.1 Alle Proteindomänen in Noc4p, mit Ausnahme von Domäne 1 sind für das Wachstum der Hefezellen essentiell

Die hergestellten Deletionskonstrukte wurden in einen Stamm transformiert, in dem das chromosomalale Allel von NOC4 deletiert wurde und durch ein NOC4-Allel auf einem Plasmid unter der Kontrolle des GAL-Promoters ersetzt wurde. Auf YP-Platten mit Galaktose wird somit eine Wildtypkopie von NOC4 exprimiert und die Zellen können mit dieser Kopie gut wachsen. Werden die Zellen aber auf YP-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle

transferiert, sind die Zellen nun auf das Allel von NOC4 auf dem pNOP-PA-Plasmid angewiesen. Somit kann getestet werden, ob die Deletionskonstrukte funktional sind. In Abbildung 2 ist das Ergebnis einer Wachstumskontrolle der unterschiedlichen Konstrukte gezeigt.

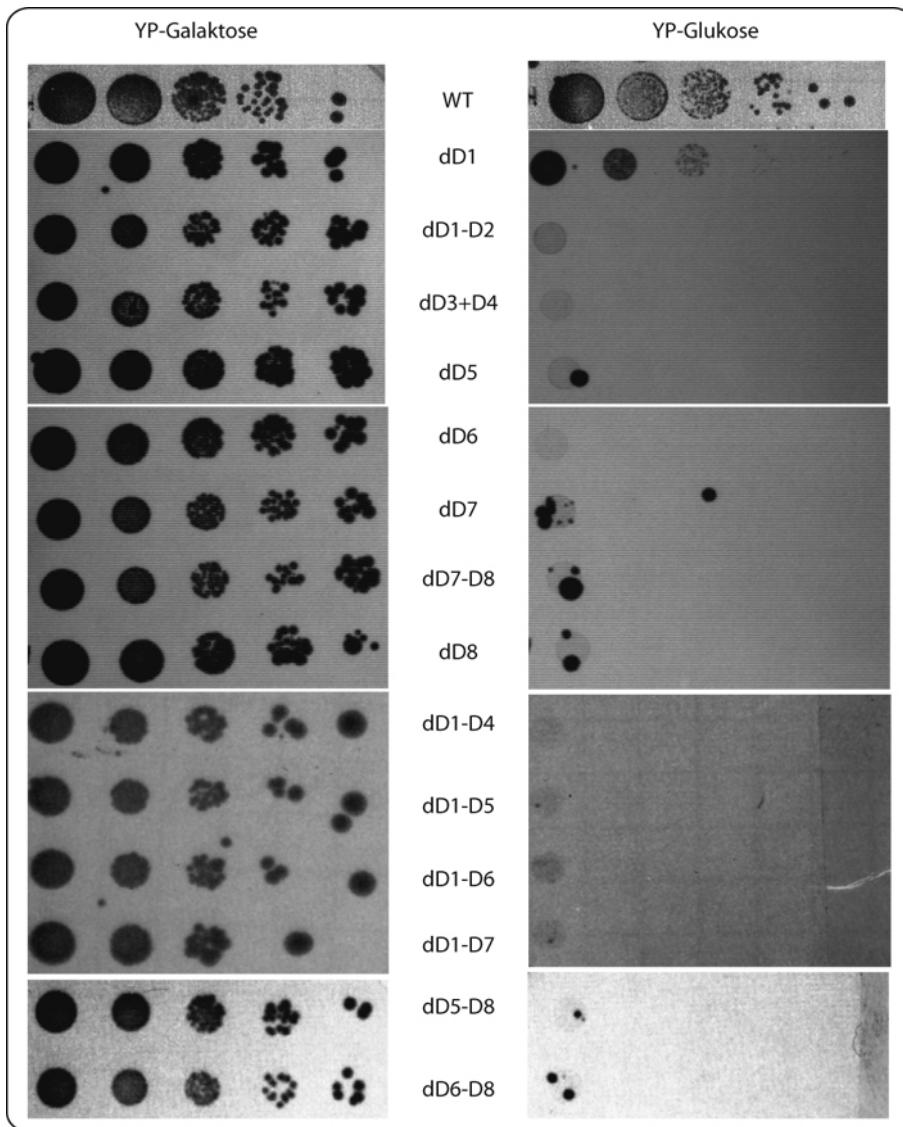


Abbildung 2: Wachstumskontrolle der verschiedenen Deletionsmutanten. Die verschiedenen Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe einmal auf YP-Galaktose- und einmal YP-Glukose-Platten aufgetragen.

Es wächst nur ein einziges Konstrukt: das mit der ersten N-terminalen Deletion. Diese Deletion bewirkt allerdings auch leicht vermindertes Wachstum im Vergleich zur Wildtypvariante von NOC4 auf Galaktose. Überraschenderweise können alle anderen Deletionskonstrukte das fehlende Wildtypprotein nicht komplementieren.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden die Deletionskonstrukte zusätzlich in den NOC4-Austauschstamm transformiert. In diesem Stamm ist wiederum das chromosomal Allel von NOC4 deletiert und durch ein NOC4-Allel auf einem Plasmid ersetzt, das als

Selektionsmarker das URA3-Gen enthält. Werden Zellen von diesen Stämmen nun auf Platten ausgestrichen, die das im Uracil-Metabolismus toxisch wirkende 5-FOA enthalten, so können nur diese Zellen überleben, die auxotroph für Uracil sind, also das URA3-Plasmid verloren haben und somit auf Uracil im Medium angewiesen sind und nicht 5-FOA verwerten. Nun sind die Zellen wieder von den Deletionskonstrukten abhängig. Diese Art der Selektion ist stringenter, als das Wachstum unter dem GAL-Promoter. Auch hier war keinerlei Wachstum zu erkennen in allen Konstrukten mit Ausnahme der Deletion von Domäne 1 (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.2 Die homologe Domäne von *H. sapiens* kann die essentielle Funktion der Noc-Domäne von Noc4p aus *S. cerevisiae* übernehmen, die Noc-Domänen von Noc1p und Noc3p aus Hefe können dies nicht

Der Bereich der Domäne 7 (D7) umfasst die sogenannte Noc-Domäne (Milkereit et al., 2003b). Diese Domäne, ursprünglich als Bereich von ca. 45 Aminosäuren beschrieben, zeichnet sich durch eine große Homologie zur Noc-Domäne aus Noc1p (15 von 42 übereinstimmende Aminosäuren,) und Noc3p (11 von 42 übereinstimmende Aminosäuren) aus. Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle Domänen bis auf die erste N-terminale Domäne des Noc4p essentiell sind, wurde nun die Frage aufgeworfen, ob die homologen Domänen von Noc1p und Noc3p aus *S. cerevisiae* eine Deletion der Domäne 7 von Noc4p komplementieren können.

Hierzu wurde Domäne 7 durch die entsprechenden Bereiche von Noc1p und Noc3p ersetzt. Zusätzlich wurde überprüft, ob der entsprechende Bereich aus dem zu Noc4p homologen Protein aus *H. sapiens* ebenfalls in der Lage ist, die Deletion von Domäne 7 zu komplementieren.

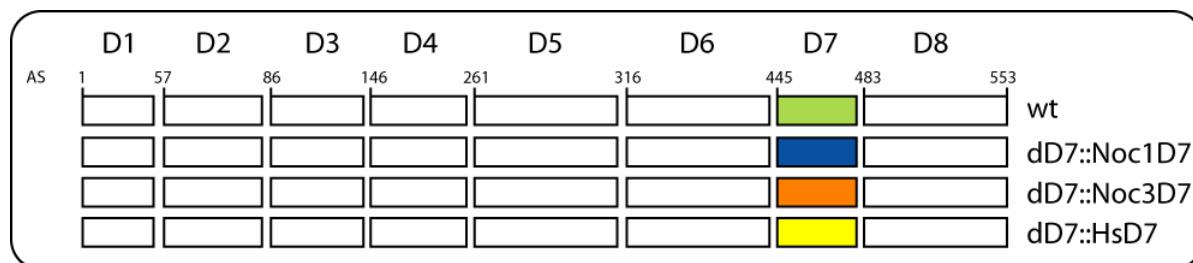


Abbildung 3: Schema des Austauschs der Noc-Domäne in Noc4p. Getestet wurde der Austausch der Noc4-Noc-Domäne durch die Noc-Domänen von Noc1p, Noc3p und *H. sapiens* (Hs) Noc4-Noc-Domäne.

Die hergestellten Allele von NOC4 wurden in den Stamm pGAL-NOC4 transformiert (NOC4 unter der Kontrolle des GAL-Promoters) und sowohl auf YP mit Galaktose als auch auf YP-Platten mit Glukose wachsen gelassen. Auf glukosehaltigen Platten wird das NOC4-Wildtypallel abgeschaltet, dadurch sind die Zellen im Wachstum auf die veränderten Allele angewiesen. In Abbildung 4 ist das Ergebnis dieses Versuchs gezeigt.

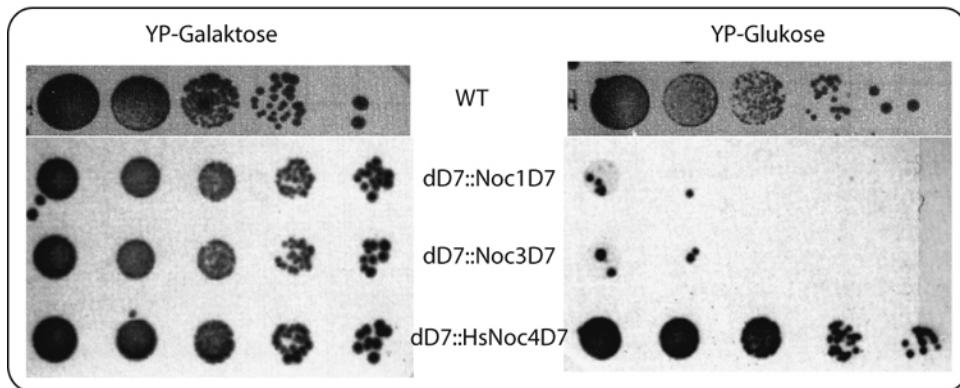


Abbildung 4: Verdünnungsreihen des Noc-Domänen-Austauschs. Je 10 μ l einer 1:10-Verdünnung der vorhergehenden Zellsuspension wurde sowohl auf YP-Galaktose- als auch YP-Glukose-Platten getropft und bei 30°C für > 2 Tage wachsen gelassen.

Die zur Domäne 7 von Noc4p homologen Noc-Domänen von Noc1p und Noc3p aus Hefe sind nicht in der Lage, die Deletion von Noc4p-D7 zu komplementieren. Die homologe Domäne von *H. sapiens* dagegen kann die Deletion der Wildtypdomäne ersetzen. Das Wachstum ist vergleichbar stark, wie das Wachstum auf Glukose mit dem Wildtypallel, d.h. dass vermutlich die volle Noc4p-Funktionalität hergestellt ist, im Gegensatz zur Deletion der ersten N-terminalen Domäne, wo das Wachstum zwar nur eingeschränkt, aber immerhin möglich ist (vgl. Abbildung 3).

Auf Aminosäureebene betrachtet (Abbildung 5) sieht man, dass es teilweise große Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Domänen aus den unterschiedlichen Proteinen gibt. Trotzdem kann nur die Domäne aus *H. sapiens* die essentielle Funktion der Noc-Domäne in Noc4p übernehmen und so Wachstum der Hefezellen ermöglichen. Hier stimmt die Noc-Domäne aus *H. sapiens* in 21 der 42 Aminosäuren mit der Sequenz der Noc4-Noc-Domäne überein, dies scheint für eine Komplementation ausreichend zu sein. Es gibt außerdem kaum Unterschiede in der Ladungsverteilung der Nettoladung der Aminosäuren, wie das beispielsweise für Noc1 der Fall ist.

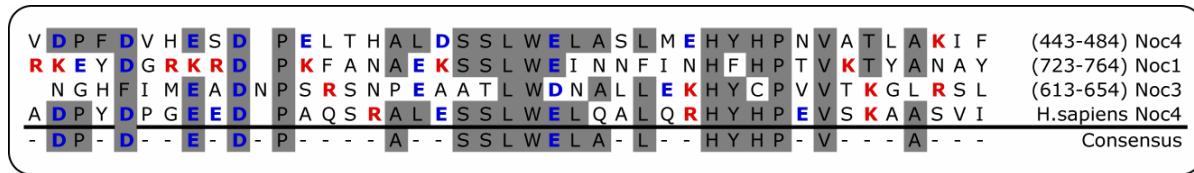


Abbildung 5: Die Noc-Domänen verschiedener Noc-Proteine. Der Bereich der Noc-Domäne von Noc1p, Noc3p, Noc4p und dem zu Noc4p homologen Protein aus *H. sapiens* sind gezeigt. Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt. Aminosäuren mit einer positiven Nettoladung sind rot, solche mit einer negativen Nettoladung sind blau gekennzeichnet.

Möglicherweise bildet sich hier eine für die Funktion des Proteins wichtige Tertiärstruktur aus, an der maßgeblich die Ladungen der Aminosäuren in bestimmten Schlüsselpositionen der Domäne beteiligt sind. Betrachtet man nur das Ladungsmuster der Domänen, so fällt auf, dass die Noc4p-Domänen aus Hefe und *H. sapiens* eine überwiegend negative Nettoladung haben, wohingegen die Domäne aus Noc1p überwiegend positive Reste hat und die Noc3p-Domäne fast ebenso viele positive wie negative Nettoladungen aufweist. Diese unterschiedliche Ladungsverteilung könnte eine Erklärung für die Ergebnisse der Wachstumstests sein.

3.1.1.3 Eine Angleichung eines Hybridkonstruktes aus Noc4p und Noc1p-Noc-Domäne zur Noc4p-Noc-Domäne in sechs Aminosäuren ermöglicht Zellwachstum

Um die entscheidenden Aminosäuren für die Spezifität der Noc-Domäne herauszufinden wurde versucht, ein Hybridkonstrukt aus Noc1p und Noc4p zu erzeugen, mit dem Hefezellen in der Lage sind zu wachsen. Der Sequenzvergleich zwischen den Noc-Domänen von Noc1p und Noc4p zeigt, dass immerhin 15 identische Aminosäuren in den Domänen vorhanden sind. Die komplementierende Sequenz von *H. sapiens* hat nur sechs identische Aminosäuren zur Noc4-Sequenz mehr, von denen fünf nun genommen wurden, um zu testen, ob ein Austausch dieser Aminosäuren der Noc1-Noc-Domäne in Richtung der Noc4-Noc-Domäne ein komplementierendes Hybrid erzeugt. Eine Übersicht über die Austausche gibt Abbildung 6. Die flankierenden Aminosäuren der Noc-Domäne wurden der Noc4-Sequenz angeglichen.

	443	484	
1	+ V D P F D V H E S D P E L T H A L D S S L W E I A S L M E H Y H P N V A T L A K I F		Noc4
2	- R K E Y D G R K R D P K F A N A E K S S L W E I N N F I N H F H P T V K T Y A N A Y		Noc1
3	- V D P F D G R E R D P K F A N A L D S S L W E I N N F I N H F H P T V K T L A K I F		Hybrid 1 Noc1-Noc4
4	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L D S S L W E L N N L I N H Y H P T V A T L A K I F		Hybrid 2 Noc1-Noc4
5	+ A D P Y D P G E E D P A Q S R A L E S S L W E L Q A L Q R H Y H P E V S K A A S V I		H.sapiens Noc4
6	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L D S S L W E L N N L I N H Y H P T V K T L A K I F		K478A
7	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L D S S L W E L N N L I N H F H P T V A T L A K I F		Y473F
8	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L D S S L W E L N N F I N H Y H P T V A T L A K I F		L469F
9	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L D S S L W E I N N L I N H Y H P T V A T L A K I F		L466I
10	+ V D P F D G R K R D P K F A N A L K S S L W E L N N L I N H Y H P T V A T L A K I F		D460K
11	+ V D P F D G R K R D P K F A N A E D S S L W E L N N L I N H Y H P T V A T L A K I F		L459E

↑ Wachstum

Abbildung 6: Schema der Austausche zu einem wachstumsfördernden Noc1-Noc4-Hybrid. Rot unterlegt sind die Aminosäuren, die in Richtung Noc4-Sequenz mutiert wurden. Grau unterlegt sind die Noc1-Reste. Die Reihe 1 zeigt die Sequenz der Noc4-Noc-Domäne, Reihe 2 zeigt die Sequenz der Noc1-Noc-Domäne. In Reihe 3 ist ein Hybrid zwischen den Noc-Domänen von Noc1 und Noc4 gezeigt, mit dem Hefezellen nicht in der Lage sind zu wachsen. Hier sind die drei rot hinterlegten Aminosäuren in Richtung zur Noc4-Sequenz verändert, zusätzlich wurden die flankierenden Bereiche weiter eingeengt. Reihe 4 zeigt ein Hybridkonstrukt, das Zellwachstum ermöglicht, indem weiter in Richtung der Noc4p-Sequenz mutiert wurde. Reihe 5 zeigt die Aminosäuresequenz der Noc-Domäne aus *H. sapiens*, die Wachstum unterstützt (siehe oben). Die Reihen 6-8 zeigen einzelne Aminosäure-Austausche, die auf Grundlage des wachstumsfördernden Hybridkonstruktes (Reihe 4) gemacht wurden.

In einem ersten Versuch wurde ein Hybrid getestet, in dem die ersten zwei N-terminalen Austausche gemacht wurden (Reihe 3: L459E und D460K). Der Austausch K450E ist unbeabsichtigt durch Mutationen bei der PCR eingeführt worden (dieser ist zufällig eine Mutation hin zur Noc4-Sequenz). Dieses Hybrid-Konstrukt war nicht in der Lage, die Noc-Domäne zu ersetzen.

Im Folgenden wurden dann vier weitere Austausche vorgenommen (Hybrid 2 in Reihe 4: L466I, L469F, Y473F und K478A). Dieses Konstrukt ist in der Lage, die Noc-Domäne zu ersetzen. Um die Funktionalität zu testen wurden die Plasmide in den NOC4-Austauschstamm (Y30) transformiert und anschließend gewachsene Kolonien auf 5-FOA-Platten ausgestrichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 (Sektor 8) dargestellt.

In weiteren Austauschen von Aminosäuren sollte nun getestet werden, ob sich die Funktionalität eines Hybrids an einzelnen Aminosäuren festmachen lässt. Hierzu wurden ausgehend vom komplementierenden Hybridkonstrukt (Abb. 6, Hybrid 2) einzeln die sechs Aminosäuren zur Noc1-Sequenz zurückgetauscht und auf Komplementation hin untersucht. (Reihen 6 bis 11). Alle so hergestellten Konstrukte waren immer noch zur Komplementation in der Lage (Abbildung 7), d.h. in der Hybridsequenz lässt sich keiner der Aminosäuren einzeln eine Schlüsselfunktion zuordnen.

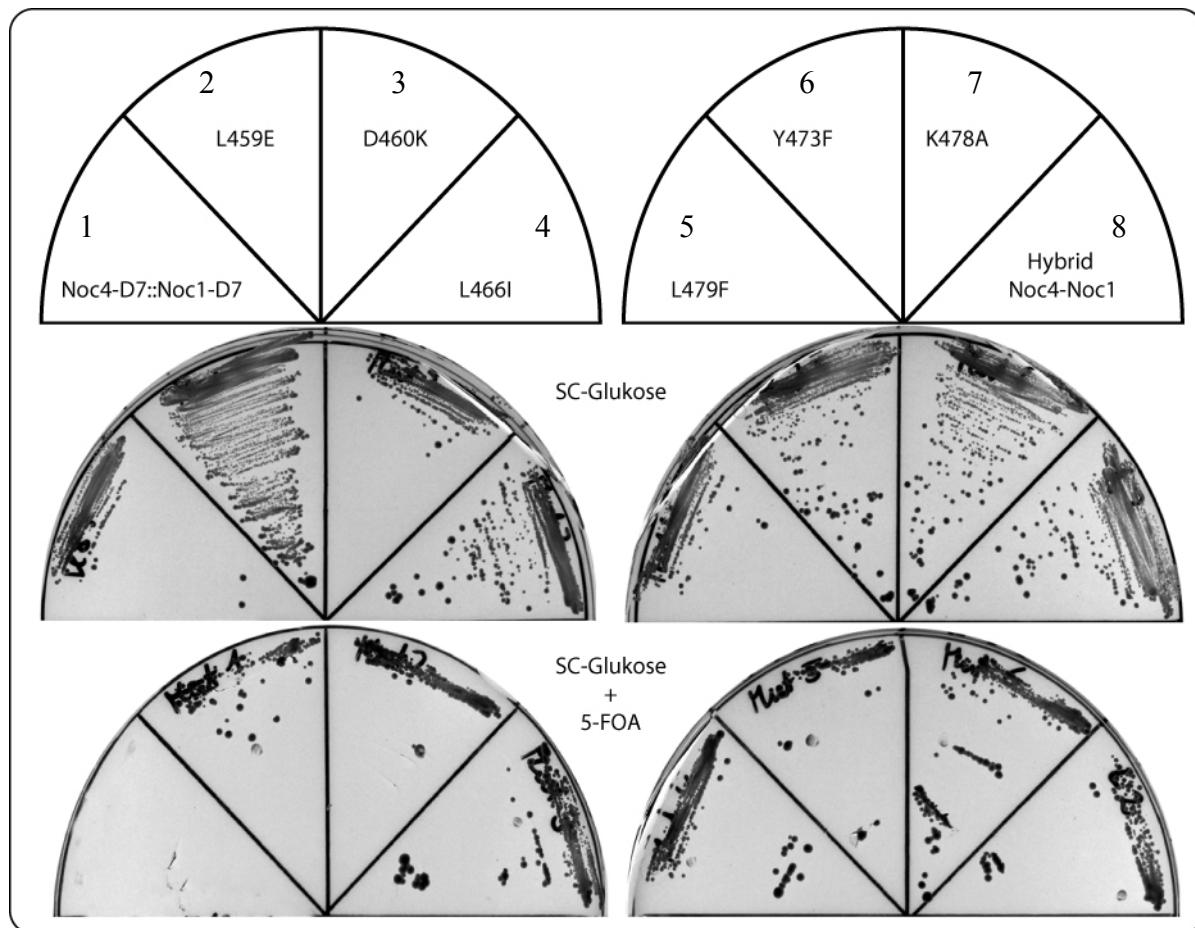


Abbildung 7: Wachstum der rückmutierten Hybridkonstrukte auf 5-FOA. Sektor 1: letales Konstrukt mit Noc1-Noc-Domäne in Noc4p; Sektor 8: Hybrid 2 aus veränderter Noc1-Noc-Domäne; Sektoren 2-7: basierend auf Hybrid 2 wurde jeweils eine Aminosäure rückgetauscht in Richtung zur Noc1-Sequenz, alle diese Mutationen sind vital (Sektoren 2-7).

Durch den Einzelaustausch von Aminosäuren zurück zur Noc1-Sequenz konnten keine Defekte im Wachstum beobachtet werden, vermutlich müssten Kombinationen von Aminosäuren getestet werden. Um alle Möglichkeiten zu erfassen wären 720 Konstrukte nötig.

3.1.2 Biochemische Funktionsanalysen der Proteindomänen von Noc4p

Die genetische Analyse der Deletionskonstrukte zeigte, dass eine Verkürzung von Noc4p nur in der ersten N-terminalen Domäne möglich ist, wenngleich diese Deletion bereits einen leichten Wachstumsphänotyp hervorruft. Um herauszufinden, welche Funktionen in der Ribosomenbiogenese durch die fehlenden Domänen beeinträchtigt werden, wurden biochemische Analysen der Deletionskonstrukte durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchungen war, die funktionelle Bedeutung der einzelnen Domänen zu charakterisieren und die Bereiche von Noc4p zu beschreiben, die für die Interaktion zu Nop14p nötig und

ausreichend sind. Ebenso sollte die Interaktion mit rRNA sowie snoRNA untersucht und in den Domänen charakterisiert werden.

Da die Deletionskonstrukte für das Wachstum der Hefezellen allein nicht ausreichend sind, musste ein System etabliert werden, in dem das Wachstum der Zellen durch eine konditional inaktivierbare Wildtypkopie von NOC4 unterstützt wird. Wenn die Wildtypkopie inaktiviert wird, ist das Wachstum der Zellen von den Deletionskonstrukten abhängig. Das System muss außerdem die Möglichkeit bieten, mit Hilfe der Deletionskonstrukte Immunpräzipitationen durchführen zu können, um Assoziationen von Interaktionspartnern, insbesondere Nop14p und RNA, zu überprüfen.

Um diese Ziele zu erreichen wurde ein Wildtypallel von NOC4 unter die Kontrolle des GAL-Promoters in einen Vektor mit dem URA3-Gen als Selektionsmarker kloniert und zusammen mit den Deletionskonstrukten in die Hefezellen transformiert, deren chromosomal Allel von NOC4 deletiert ist. Die Deletionskonstrukte wurden unter die Kontrolle des konstitutiven NOP1-Promoters gestellt und N-terminal mit dem Protein A-Epitop fusioniert. Als Selektionsmarker dieses Plasmide wurde LEU2 verwendet (Abbildung 8).

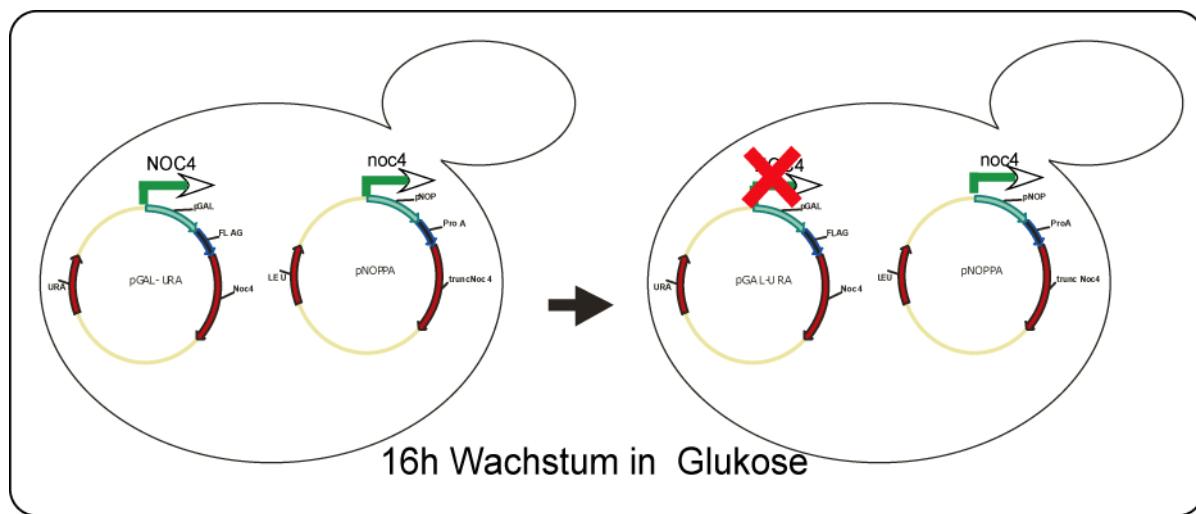


Abbildung 8: Schema der NOC4-Depletion. Die Zellen wurden mit Hilfe eines induzierbaren Wildtypallels auf YP-Medium mit Galaktose angezogen (linke Hefezelle), dann wurde das Wildtypallel durch Änderung der Kohlenstoffquelle auf Glukose (rechte Hefezelle) abgeschaltet und so die Zellen im Wachstum von den mutierten *noc4*-Allelen abhängig gemacht.

Die Hefestämme wurden nun in synthetischem Mangelmedium ohne Uracil und Leucin mit Galaktose als Kohlenstoffquelle kultiviert. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden Zellen nun in Mangelmedium ohne Uracil und Leucin mit Glukose als Kohlenstoffquelle transferiert. Dies führt zur Abschaltung des Wildtypallels auf dem URA3-Plasmid, die Zellen sind nun also von den Deletionskonstrukten abhängig.

Die Abschaltung von NOC4 bewirkt nicht sofort eine Abhängigkeit von den noc4-Mutanten, da die Wildtypkopien von Noc4p sowie die entsprechenden mRNA-Kopien zuvor abgebaut werden müssen. Daher muss überprüft werden, nach welcher Zeit die Menge an Noc4p signifikant zurückgegangen ist. Hierzu wurde eine Kinetik der Depletion gemacht, indem zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums auf Glukose Zellen entnommen wurden und mittels *Westernblot*-Analyse der Gehalt an Noc4p ermittelt wurde (Abbildung 9). Parallel hierzu wurden verschiedene andere Proteine (z.B. Noc1p und Phosphoglyceratkinaise) getestet, inwiefern sie von der Noc4p-Depletion betroffen sind.

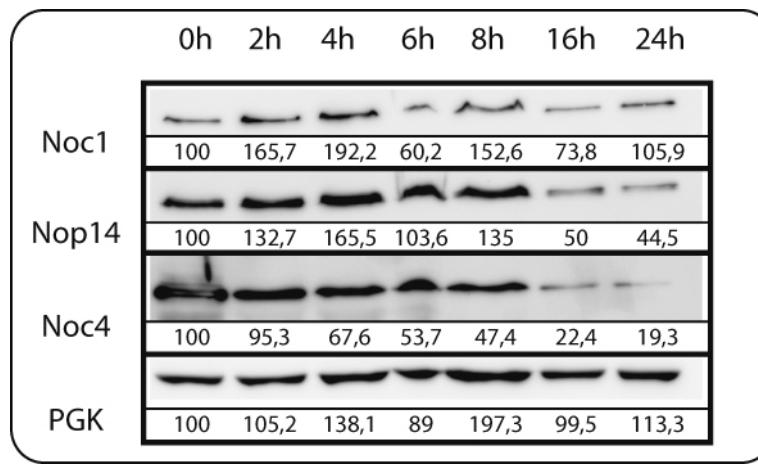


Abbildung 9: Kinetik der Noc4p-Depletion. Zu den angegebenen Zeitpunkten des Wachstums auf Glukose wurde Gesamtzellextrakt auf den Gehalt von Noc4p durch *Westernblot*-Analyse untersucht. Zur Überprüfung wurden verschiedene andere Proteine untersucht, als Ladekontrolle dient PGK (Phosphoglycerat-Kinase 3). Die Zahlen geben die prozentuale Menge an bezogen auf den Wert von 0h; Noc4p ist bei 16h Depletion auf weniger als $\frac{1}{5}$ seines ursprünglichen Wertes abgesunken. Noc1p wurde mit dem polyklonalen Noc1p-Antikörper nachgewiesen, Nop14p mit dem HA-Antikörper (16B12), Noc4p mit dem Protein A-Antikörper (PAP) und PGK mit dem

Anhand der Kinetik der Depletion wird ersichtlich, dass eine 16-stündige Inkubation der Zellen auf glukosehaltigem Medium ausreichend ist, um die Menge von Noc4p signifikant (auf ca. 20%) abzusenken. Im weiteren Vorgehen wurde dieser Zeitwert für die Untersuchungen verwendet. Als weitere Beobachtung kann festgehalten werden, dass auch die Menge von Nop14p um ca. 50% reduziert wird, wohingegen die Menge von Noc1p und PGK weniger beeinflusst werden. Möglicherweise werden Noc4p und Nop14p gemeinsam reguliert.

3.1.2.1 Die Proteindomänen 6 bis 8 von Noc4p sind für eine *ex vivo* Kopräzipitation von Nop14p ausreichend

Nachdem überprüft wurde, nach welcher Zeit das Wildtyp-Protein in den Zellen genügend abgereichert ist, wurde nun damit begonnen, mit Hilfe des an die Deletionskonstrukte

fusionierten Protein-A-Epitops Immunpräzipitationen durchzuführen. Das Ziel dieser Analysen war es, Proteindomänen von Noc4p zu identifizieren, die an der Komplexbildung mit Nop14p beteiligt sind. Hierzu wurde in den Hefestämmen mit den unterschiedlichen Deletionskonstrukten von Noc4p in der oben beschriebenen Weise die Wildtypkopie von Noc4p abgereichert und anschließend Immunpräzipitationen der Deletionskonstrukte mit Hilfe des an die Konstrukte fusionierten Protein-A-Epitops durchgeführt. Mit Hilfe der *Westernblot*-Technik wurde anschließend überprüft, welchen Deletionskonstrukten von Noc4p noch eine Kopräzipitation von Nop14p-HA möglich ist. In Abbildung 10 ist das Ergebnis dargestellt.

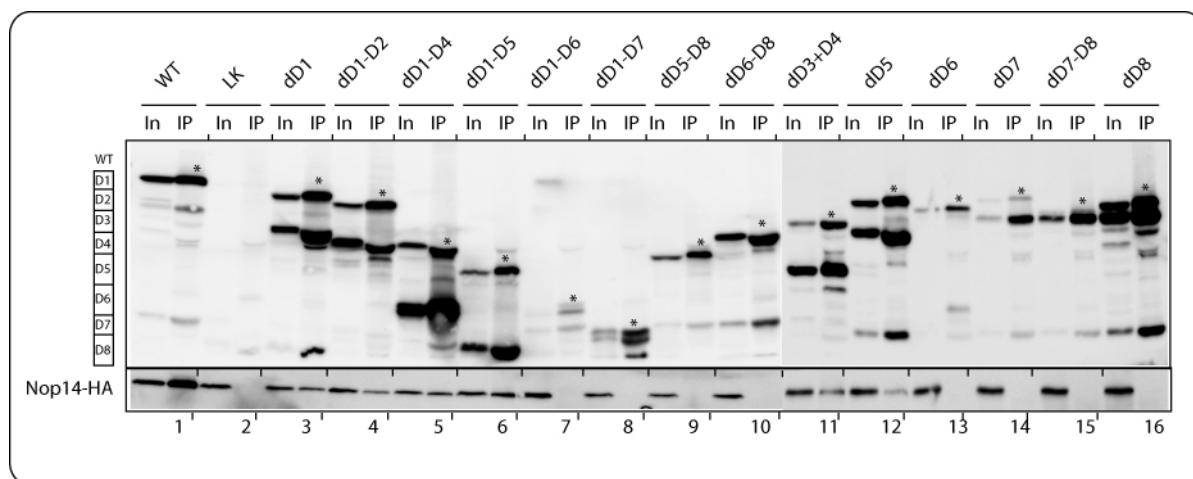


Abbildung 10: Immunpräzipitation der Deletionskonstrukte mit Kopräzipitation von Nop14p-HA. Die Konstrukte wurden über das fusionierte Protein-A-Epitop präzipitiert und durch die *Westernblot*-Analyse mit dem PAP-Antikörper nachgewiesen. Kopräzipitiertes Nop14p wurde mit einem Antikörper gegen das an Nop14p fusionierte HA-Epitop nachgewiesen (3F10). Abkürzungen: WT=Wildtyp, LK=Leerkontrolle, In=Input, IP=Immunpräzipitation. Die Sterne markieren die nicht degradierte Bande der Konstrukte.

Die Immunpräzipitation von Wildtyp-Noc4p resultiert in einer guten Anreicherung von Noc4p und dem Interaktionspartner Nop14p (Spur 1). Die Negativkontrolle (LK) zeigt, dass es kein nachweisbares Hintergrundsignal von Nop14p-HA gibt (Spur 2).

Die Spuren 3-16 zeigen die unterschiedlichen Immunpräzipitationen der Deletionskonstrukte mit dem jeweiligen Input-Signal jeweils links daneben. Man erkennt, dass eine Anreicherung der Konstrukte durch die Immunpräzipitation gut möglich ist, auch in den Fällen, in denen die Expression des Konstruktes bereits auf sehr niedrigem Niveau ist (Spuren 7 und 14 mit den jeweiligen Inputspuren). Man erkennt ebenfalls, dass die Konstrukte starken Degradationen unterworfen sind, trotz Zugabe von Proteaseinhibitoren. Dies könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Konstrukte in der Zelle funktionslos sind und deshalb abgebaut

werden. Teilweise geben die Abbaubanden stärkere Signale als das eigentliche Konstrukt (z.B. Spuren 5 und 14).

Über die Kopräzipitation von Nop14p mit Hilfe der Deletionskonstrukte lässt sich zusammenfassend sagen: alle Konstrukte, bei denen die Domänen 6-8 vorhanden sind, sind in der Lage, Nop14p zu kopräzipitieren. Dies sind die wachstumsfähige Mutante $\Delta D1$, ebenso wie die nicht wachstumsfähigen Mutanten $\Delta D1-D2$, $\Delta D1-D4$, $\Delta D1-D5$, $\Delta D3+D4$ und $\Delta D5$ (Spuren 3- 6 und 11-12). Die Mengen an kopräzipitiertem Nop14p schwanken zwar, aber es sind deutlich Signale von Nop14p zu erkennen. Spur 12 zeigt das schwächste Signal, aber da es kein nachweisbares Hintergrundsignal von Nop14p gibt, kann angenommen werden, dass es sich hierbei tatsächlich um kopräzipitiertes Nop14p handelt.

Allen Konstrukten, denen eine oder mehrere der Domänen 6-8 fehlen, sind nicht zur Kopräzipitation von Nop14p in der Lage. Dies sind die Konstrukte $\Delta D1-D6$, $\Delta D1-D7$, $\Delta D5-D8$, $\Delta D6-D8$, $\Delta D6$, $\Delta D7$ und $\Delta D8$ (Spuren 7-10 und 13-16). Da die Anreicherung dieser Deletionskonstrukte in den IP-Spuren bis auf die Ausnahme dD1-D6 (Spur 7) recht gut ist, kann die Aussage getroffen werden, dass ein Fehlen der drei C-terminalen Domänen von Noc4p (Domänen 6 bis 8) zu einem Verlust der Interaktion mit Nop14p führt und nicht auf eine mangelhafte Immunpräzipitation zurückzuführen ist. Diese Aussage lässt sich an den Spuren 8, 10 und 13-16 nachvollziehen. Allen diesen Konstrukten fehlt wenigstens eine der drei Domänen und in keinem der Konstrukte kann eine Interaktion mit Nop14p beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass diese Domänen für die Interaktion benötigt werden. Da es sich hierbei um eine negative Aussage handelt, d.h. eine Interaktion geht verloren, muss man in Erwägung ziehen, dass möglicherweise diese Konstrukte auch aus anderen Gründen nicht mehr in der Lage sind mit Nop14p zu interagieren.

Eine positive Aussage kann jedoch mit dem Konstrukt $\Delta D1-D5$ in Spur 6 getroffen werden. Bei diesem Konstrukt werden nur die drei C-terminalen Domänen 6, 7 und 8 exprimiert. Dieses Konstrukt kann Nop14p kopräzipitieren. Somit kann die Aussage erweitert werden: die drei C-terminalen Domänen sind für eine Interaktion mit Nop14p ausreichend.

Im reversen Experiment wurden diese Aussagen nun überprüft, indem Nop14p-HA präzipitiert wurde und eine mögliche Kopräzipitation der Deletionskonstrukte untersucht wurde. Diese Experimente wurden nicht mit allen Konstrukten durchgeführt, sondern exemplarisch mit einigen ausgewählten Konstrukten. Vor der Immunpräzipitation mittels des fusionierten HA-Epitops an Nop14p wurde die Wildtyp-Noc4p-Expression wie oben beschrieben abgeschaltet. Das Ergebnis hierzu ist in Abbildung 11 abgebildet.

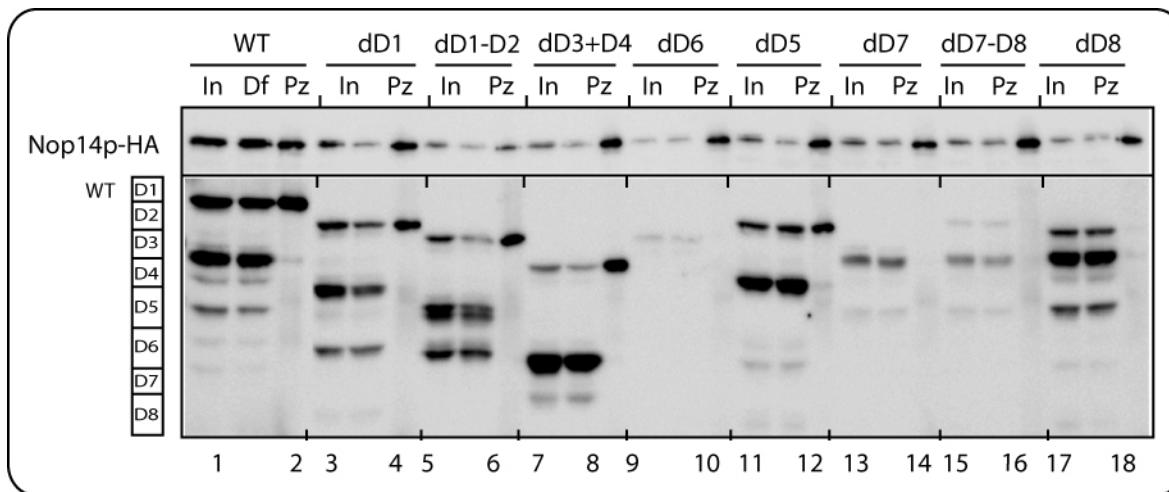


Abbildung 11: Immunpräzipitation von Nop14p-HA mit Kopräzipitation von Noc4p-Deletionskonstrukten. Nop14p wurde mit Hilfe der HA-Epitopmarkierung aus Gesamtzellextrakt präzipitiert und mit dem HA-Antikörper 3F10 im *Westernblot* nachgewiesen. Es wurde getestet, ob Deletionskonstrukte von Noc4p kopräzipitieren. Dieses wurde mit dem Protein A-Antikörper (PAP) nachgewiesen. Abkürzungen: In=Input, Df=Durchfluss, Pz=Präzipitat, WT=Wildtyp (d.h. eine Wildtypkopie unter der Kontrolle des NOP-Promoters). Noc4p-Konstrukte wurden mit dem PAP-Antikörper nachgewiesen.

Im oberen Teil der Abbildung ist die Präzipitation von Nop14p-HA gezeigt. Man sieht, dass in allen Fällen Nop14p-HA gut angereichert wurde, gerade auch in solchen Fällen, in denen das Expressionsniveau niedrig war (Δ D6, Spur 9).

Wildtyp-Noc4p lässt sich gut kopräzipitieren, wie man in Spur 2 sieht. Ebenfalls erkennbar ist, dass alle Konstrukte, die die Domänen 6-8 enthalten durch Nop14p kopräzipitiert werden können (Spuren 4, 6, 8, und 12), während alle Konstrukte, denen eine dieser Domänen fehlt nicht mitgereinigt werden (Spuren 10, 14, 16, und 18).

Als weiteres Argument für die Richtigkeit der Hypothese kann angeführt werden, dass keine Degradationsprodukte in den Immunpräzipitationen angereichert werden. Da es sich hierbei um C-terminale Degradationen handelt (das Protein-A-Epitop ist N-terminal fusioniert, also sind C-terminale Degradationsprodukte nachweisbar), wird durch die Degradation der C-Terminus (also Domänen 6-8) verkürzt, bzw. entfernt. Da diese Produkte nicht durch die Präzipitation angereichert werden, kann gefolgert werden, dass sie nicht mehr in der Lage sind, mit Nop14p zu interagieren, weil ihnen die hierfür notwendigen Domänen 6-8 fehlen.

3.1.2.2 Die Bindung von Noc4p an Nop14p korreliert mit rRNA-Interaktion, die N-terminalen Domänen sind für eine Unterstützung dieser rRNA-Interaktion notwendig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Noc4p ex vivo über die C-terminalen Domänen mit Nop14p interagiert, wurde im Folgenden untersucht, ob und welche Konstrukte in der Lage sind, mit rRNA zu interagieren.

Hierzu wurden Immunpräzipitationen in der oben beschriebenen Weise durchgeführt (Anzucht auf galaktosehaltigem Medium, dann 16h Inkubation in glukosehaltiges Medium), nach den Immunpräzipitationen wurde über *Northern blot* Analyse die assoziierte rRNA untersucht. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 12 gezeigt. Um die Korrelation der rRNA-Interaktion von Noc4p und Nop14p besser zu verdeutlichen, sind in dieser Abbildung die Ergebnisse der Proteininteraktionen noch einmal abgebildet.

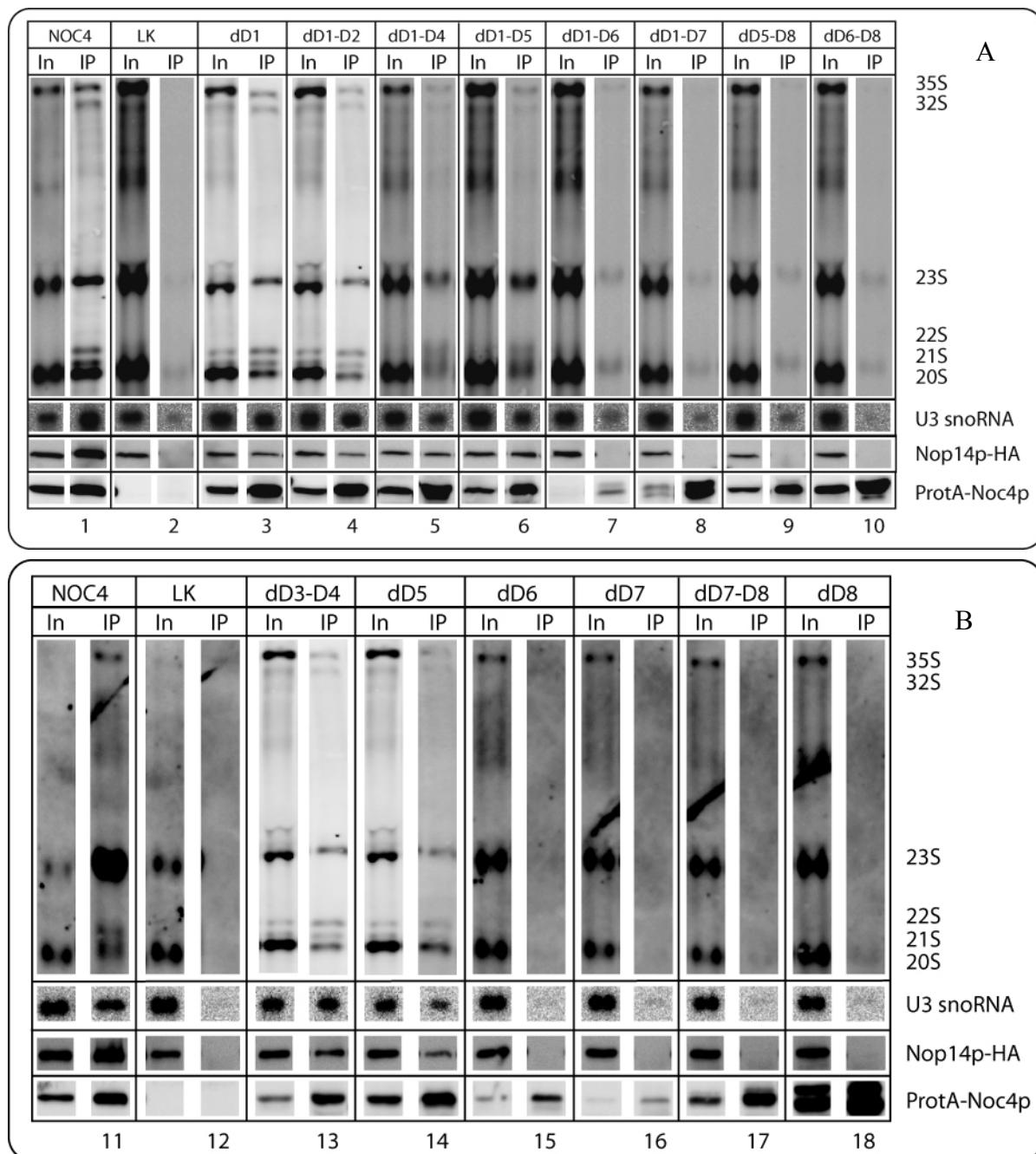


Abbildung 12A+B: RNA-Immunpräzipitationen der Deletionskonstrukte. Die Präzipitationen wurden über das Protein-A-Epitop durchgeführt. Analysiert wurden sowohl RNA- als auch Protein Kopräzipitationen. Die rRNA-Vorläufer wurden im *Northern blot* mit einer DIG-markierten Sonde gegen den Bereich von ITS1 entwickelt, die U3 snoRNA wurde mit einer komplementären ³²P-markierten Sonde detektiert. Noc4p wurde mit dem PAP-Antikörper, Nop14p mit dem HA-Antikörper 3F10 nachgewiesen. LK=Kontrolle ohne epitopmarkiertes NOC4-Allel.

Die Anreicherung von Wildtyp-Noc4p durch die Immunpräzipitation ist gut nachvollziehbar, ebenso wie die Kopräzipitation von Nop14p (Spur 1). Man erkennt, dass Noc4p RNA-Vorläufer der kleinen Untereinheit präzipitiert (35S, 32S, 23S, 22S, 21S und 20S). Besonders die späten Spezies, wie 21S und 22S scheinen durch Noc4p präzipitiert zu werden. Diese sind im Input nicht zu sehen, werden durch die Präzipitation aber stark angereichert.

Es wurden mit Hilfe anderer Sonden weitere rRNA-Spezies untersucht, so z.B. die Vorläufer der 60S Untereinheit sowie reife 18S und 25S rRNA. Es konnte jedoch keine signifikante Anreicherung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann man den Schluss ziehen, dass Noc4p spezifisch mit den Vorläufern der 40S Untereinheit interagiert. Durch dieses Experiment wird allerdings nicht klar, ob es sich hierbei um eine direkte oder eine indirekte Interaktion von Noc4p mit rRNA handelt. Diese Frage wird später untersucht (siehe Abschnitt 3.1.2.3)

Man erkennt auch, dass Noc4p in der Lage ist, U3 snoRNA zu präzipitieren. Dies deckt sich mit Literaturveröffentlichungen, die Noc4p als Teil des *Small Subunit Processomes* beschreiben (Bernstein et al., 2004).

Die Leerkontrolle (LK, Immunpräzipitation Spur 2) hat kein funktionelles NOC4-Allel, das nach dem Transfer auf glukosehaltiges Medium das chromosomal deletierte Allel ersetzt. Man erkennt im Input, dass sich dadurch ein Phänotyp ausbildet: es kommt daher zu einer Akkumulation von 35S, aber auch 23S und einer leichten Reduktion von 20S. Allerdings wird hier auch deutlich, dass der beschriebene Phänotyp für eine Abreicherung von Noc4p nach 16h Inkubation auf Glukose noch nicht vollständig etabliert ist (Bernstein et al., 2004). In dieser Veröffentlichung wird nach 24h Noc4p-Depletion ein deutlicher Verlust von 20S beobachtet.

Das Hintergrundsignal von rRNA in der Präzipitation ist sehr niedrig (nur bei 20S ist ein wenig unspezifische Assoziation zu sehen). U3 snoRNA weist dagegen ein deutlicheres Hintergrundsignal in der Präzipitationsspur auf (Spur 2).

Das Konstrukt dD1 (komplementiert die chromosomale NOC4-Deletion) ist in der Lage, rRNA-Spezies wie der Wildtyp zu präzipitieren (Spur 3). Allerdings sind die Level deutlich (ca. 50%) niedriger als der Wildtyp. Auch die Anreicherung von U3 snoRNA gelingt mit diesem Konstrukt.

Weitere Verkürzungen des Noc4p werden von den Hefezellen nicht toleriert. Dies könnte möglicherweise an der mangelhaften Interaktion zur Vorläufer-rRNA liegen, die bei Verkürzungen in anderen Domänen als Domäne 1 weiter abnimmt (vgl. Spur 4, 5 und 6, Abb. 12A, sowie Spur 13 und 14 auf Abbildung 12B). Diese Konstrukte sind allerdings immer

noch in der Lage, etwas rRNA zu präzipitieren. Auch U3 snoRNA wird von diesen Konstrukten präzipitiert, wenn auch in deutlich geringerem Umfang, als in der Wildtypsituation.

Werden allerdings die Nop14p-Interaktionsdomänen (Domänen 6 bis 8) deletiert, geht zum einen der Kontakt zu Nop14p verloren, zum anderen sind diese Konstrukte nicht mehr in der Lage, Vorläufer-rRNA zu präzipitieren (vgl. Spur 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17 und 18). In allen diesen Konstrukten fehlt entweder eine der drei Domänen, oder Kombinationen von ihnen. Keines dieser Konstrukte präzipitiert Nop14p und rRNA-Vorläufer. Die Signale von U3 snoRNA liegen auf Hintergrundniveau und müssen daher als unspezifisch deklariert werden. Diese Experimente zeigen, dass die gleichen Domänen von Noc4p notwendig sind, um rRNA, U3 snoRNA und Nop14p zu binden. Auf Grundlage dieser Experimente kann man den Schluss ziehen, dass eine Bindung an Nop14p die Voraussetzung darstellt, damit Noc4p mit rRNA und U3 snoRNA interagieren kann.

Den N-terminalen Domänen kann einzeln keine spezielle rRNA-Bindeaktivität zugeordnet werden. Einzeldeletionen von Domänen resultieren nicht in vollständigem RNA-Verlust. Möglicherweise werden diese Domänen für eine Verstärkung der Bindung an rRNA benötigt. Es wäre denkbar, dass der Grad der Interaktion mit RNA über die Fähigkeit zur Komplementation entscheidet.

Möglicherweise spielen diese Domänen aber auch andere, bisher nicht bekannte Rollen.

3.1.2.3 Die Interaktion von Noc4p mit rRNA wird vermutlich indirekt vermittelt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Noc4p in der Lage ist, mit RNA zu interagieren und dies mit der Interaktion mit Nop14p korreliert, wurde nun untersucht, ob die Interaktion von Noc4p mit rRNA direkt oder indirekt vermittelt wird.

Hierzu wurden folgende Ansätze gewählt: in einem Experiment sollte das Protein Nop14p *in vivo* in den Zellen abgereichert werden und danach mit Hilfe des an Noc4p fusionierten TAP-Epitops (Protein-A-Epitop plus Calmodulin-Bindestelle) Immunpräzipitationen durchgeführt werden, die anschließend auf RNA-Präzipitation hin untersucht wurden. In einem zweiten Ansatz wurde das umgekehrte Experiment durchgeführt, nämlich Noc4p *in vivo* abzureichern und Nop14p-TAP zu präzipitieren. Um Noc4p bzw. Nop14p *in vivo* abzureichern, wurden die entsprechenden Gene unter die Kontrolle des GAL-Promoters gestellt. Die Hefezellen wurden nach der Anzucht in galaktosehaltigem Medium für 16h in glukosehaltigem Medium

inkubiert und anschließend die Immunpräzipitation durchgeführt. Durch die Depletion der Proteine für 16 Stunden wurde eine signifikante Auswirkung auf den *steady state level* der rRNA Intermediate festgestellt, wenngleich sich für die komplett depletierten Proteine typischen Prä-rRNA-Mengen erst nach mehr als 24 h (Bernstein et al., 2004; Dragon et al., 2002) einstellten. Da unter diesen Bedingungen jedoch das Expressionsniveau des jeweiligen Bindpartners bereits so stark reduziert war dass damit keine befriedigende RNA-Immunpräzipitationen durchgeführt werden konnte (siehe Abb. 9), wurden die RNA-Immunpräzipitationen nach jeweils 16-stündiger Depletion von Noc4p bzw. Nop14p durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 13 dargestellt.

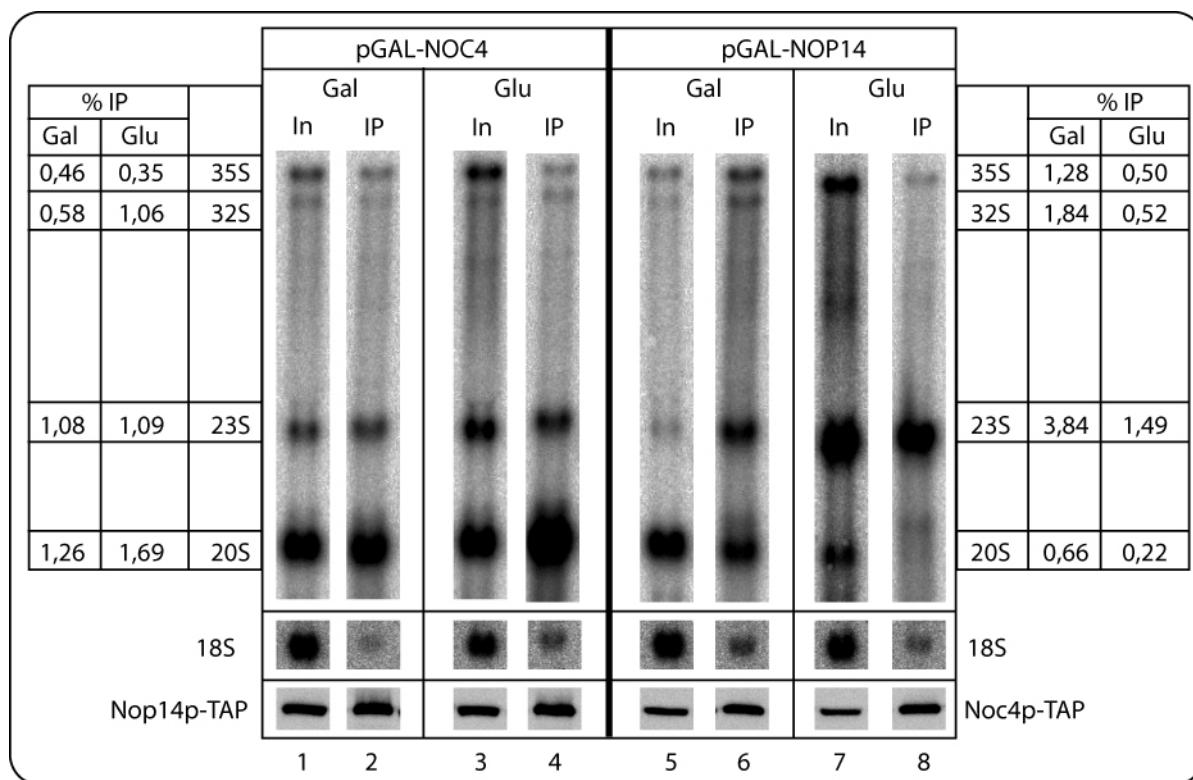


Abbildung 13: RNA-Immunpräzipitation nach Depletion des Bindungspartners. Nach einer 16-stündigen Abreicherung des einen Komplexpartners wurde eine Immunpräzipitation des anderen durchgeführt und auf assoziierte rRNA-Spezies untersucht. Die Detektion erfolgte mittels Northernblot mit der Sonde /ST1 und 18S. Zusätzlich ist die Präzipitation des Proteins dargestellt. Die Tabellen geben die Quantifizierungen der Signale der Präzipitationen bezogen auf den Input an. In=Input, IP=Immunpräzipitation.

In den Spuren 1 und 5 ist das Wachstum der Konstrukte auf Galaktose abgebildet, in dessen Gegenwart die Zellen prinzipiell wie Wildtyp wachsen sollten. Hierbei erkennt man in Spur 1 allerdings, dass bereits leichte Defekte in der RNA Prozessierung vorliegen, da 35S, 32S und 23S leicht verstärkt nachweisbar sind. Dies wurde in den vorherigen Experimenten mit pGAL-NOC4 nicht beobachtet und ist wahrscheinlich auf die Epitopmarkierung von Nop14p

zurück zu führen. In Wachstumskurven schlug sich dieser Effekt leicht nieder, da die Zellen im Gegensatz zum Wildtyp (ca. 2 h) eine Generationszeit von ca. 2,5h Stunden hatten.

Der Wechsel der Kohlenstoffquelle auf Glukose wirkt sich bei den Stämmen in unterschiedlichem Maße aus (Spuren 3 und 7): im Falle von pGAL-NOC4 verstärken sich die Defizite in der RNA-Prozessierung weiter, es akkumulieren 35S, 32S und 23S RNA, wie auch für die Inaktivierung von Noc4 zu erwarten ist (Milkereit et al., 2003b) und es ist außerdem nach wie vor 20S RNA gut nachweisbar. Im Falle von pGAL-NOP14 in glukosehaltigem Nährmedium ist ein stärkerer Phänotyp erkennbar. Die Produktion von 20S geht deutlich zurück, während 23S sowie 35S nach dieser Inkubationszeit von 16h deutlich akkumulieren.

Die Präzipitationen machen nun deutlich, ob die Interaktion mit der Vorläufer-rRNA durch die Abreicherung des jeweiligen Noc-Proteins beeinflusst wird. Im Falle der Noc4p-Abreicherung und anschließender Nop14p Immunpräzipitation bleibt die Interaktionen von Nop14p mit Vorläufer-rRNA weitgehend erhalten: 35S bleibt bei ca. 0,5%, 23S wird weiterhin zu ca. 1% präzipitiert und 20S zu ca. 1,5%. Interessanterweise wird sogar nach Noc4p-Abreicherung mehr 20S durch Nop14p angereichert, was dafür spricht, dass 20S durch die Noc4p-Inaktivierung zwar nicht mehr weiter prozessiert werden und z.B. aus dem Zellkern transportiert werden kann, aber noch an Nop14p binden kann.

Im Gegensatz zu Nop14p verliert Noc4p die Eigenschaft an Prä-rRNA zu binden bei Abreicherung des Protein-Bindungspartners. Wird Nop14p abgereichert, sieht man, dass über Noc4p deutlich weniger 35S (1,3% → 0,5%) und 32S (1,8% → 0,52%) präzipitiert wird. Die Präzipitation von 23S geht von 3,8% auf 1,5% zurück, 20S von 0,7% auf 0,22% (Rückgang um 84%). Zwar wird auf Glukose nur noch wenig 20S hergestellt, diese wird aber nicht mehr durch die Noc4p-Präzipitation angereichert.

Aus diesem Experiment kann also der Schluss gezogen werden, dass Noc4p ohne Nop14p nicht mit Vorläufer-rRNA interagiert. Die verbleibende Interaktion ist wahrscheinlich auf unvollständige Nop14p-Depletion zurückzuführen und würde bei längeren Inkubationszeiten weiter zurückgehen. Im Gegensatz dazu ist Nop14p immer noch in der Lage, mit rRNA zu interagieren, auch wenn Noc4p abgereichert wird.

Um die gemachten Beobachtungen mit einem anderen Versuchsansatz zu überprüfen, wurde eine ähnliche Interaktionsstudie mit einem temperatursensitiven Allel von NOP14 (*nop14-2ts*, Labor Tschochner) unternommen, das N-terminal mit einem Protein-A-Epitop fusioniert ist und unter der Kontrolle des NOP-Promoters steht. Das chromosomale Allel von NOP14 ist in diesem Stamm deletiert. Das mutante Allel lässt ein Wachstum auf 37°C nicht zu, weil das

Protein durch zufällig eingeführte Mutationen bei 37°C in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Es sollte getestet werden, ob das mutante Protein bei der restriktiven Temperatur noch mit den Vorläufer-RNAs und dem Interaktionspartner Noc4p interagieren kann. Als Kontrolle dient ein Stamm, der anstatt des mutanten Allels ein Wildtypallel exprimiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.

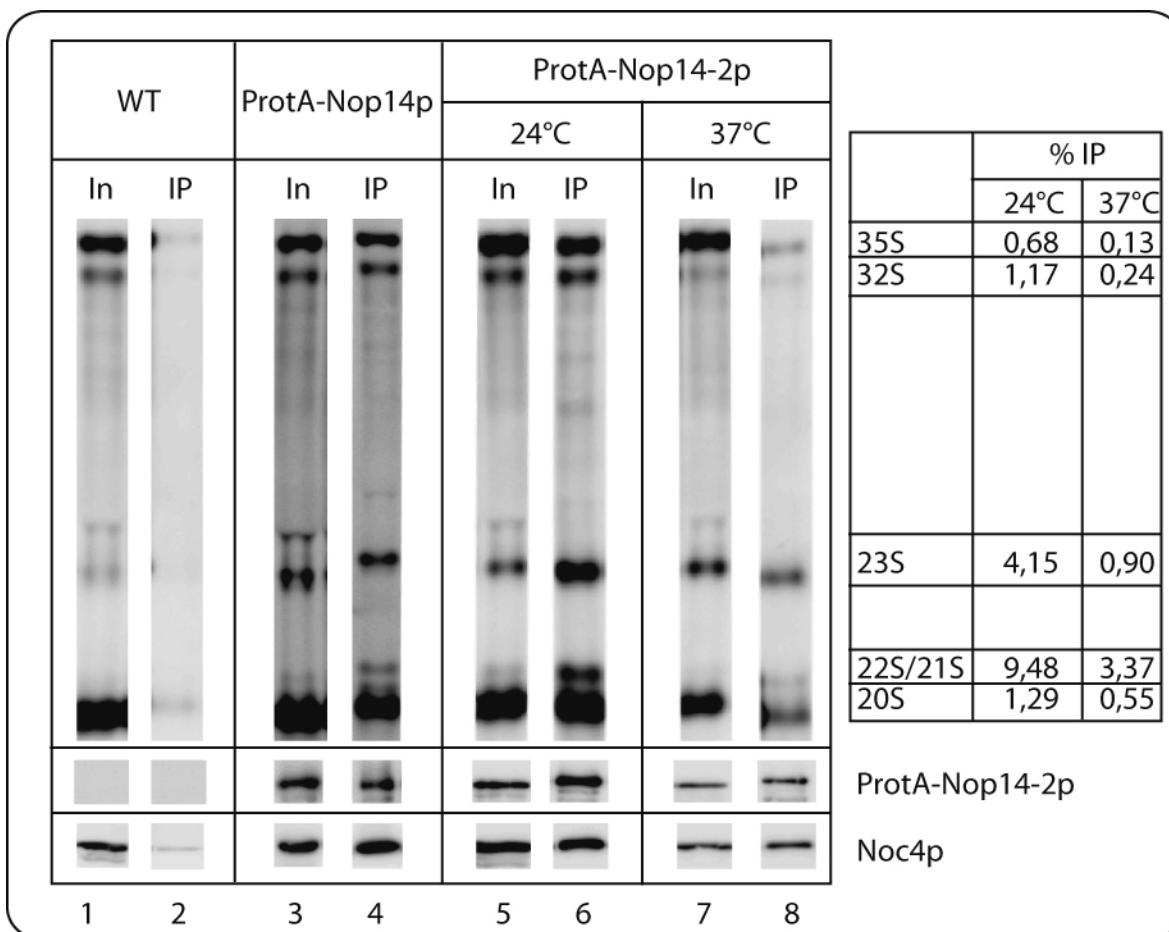


Abbildung 14: Immunpräzipitation des temperatursensitiven Allels *nop14-2*. Die Spuren 1 und 2 zeigen einen unmarkierten Stamm, um den Hintergrund an kopräzipitiertem Protein und RNA zu ermitteln. Spur 4 zeigt die Präzipitation von einem Wildtypallel mit fusioniertem Protein-A-Epitop. Spuren 6 und 8 zeigen die Präzipitation des temperatursensitiven Allels *nop14-2ts* bei 24°C bzw. nach 3h Inkubation bei 37°C. Kopräzipitation von Noc4p wurde im Westernblot durch den monoklonalen Antikörper 2D12 nachgewiesen Protein A-Nop14p durch den PAP-Antikörper. Die Tabellen geben die Quantifizierungen der Signale der Präzipitationen bezogen auf den Input an. In=Input, IP=Immunpräzipitation.

Der Stamm ohne Epitopmarkierung weist kein nachweisbares Hintergrundsignal auf RNA-Ebene auf, Noc4p zeigt einen leichten Hintergrund in der Präzipitation, was in Spur 2 zu sehen ist.

Das Wildtypallel mit dem Protein-A-Epitop lässt sich gut präzipitieren und zeigt auch die erwartete Kopräzipitation von Noc4p (Spur 4). In der Wildtypsituation ist Nop14p auch mit Vorläufer-rRNA assoziiert. Es wird 35S, 32S, 23S, 22S, 21S und 20S präzipitiert. Das Präzipitationsmuster erinnert an das von Noc4p (vgl. Abb. 12A Spur 1).

In den Spuren 6 und 8 sind die Präzipitationen von Nop14-2p bei den unterschiedlichen Temperaturen gezeigt. Bei 24°C sind keine wesentlichen Unterschiede zur Wildtypsituation erkennbar. Allerdings liegt bei diesem Stamm bereits ein leichter Phänotyp vor, denn 35S im Input (Spur 5) ist prominenter als im Input von Wildtyp (Spur 3), was auf einen schwachen Prozessierungsdefekt hindeutet. Die Präzipitation in Spur 6 ist sehr ähnlich zu der in Spur 4. Auch auf Proteinebene erkennt man, dass Noc4p in gleichem Maße kopräzipitiert wird, wie in der Wildtypsituation.

Wird dieser Stamm nun für 3h auf 37°C inkubiert, so erkennt man, dass 35S weiter akkumuliert, 32S sowie 23S und 20S werden reduziert. Wird nun die Präzipitation durchgeführt, so wird deutlich, dass die Interaktion zur rRNA bei dieser Mutante reduziert wird. Obwohl viel 35S vorhanden ist, wird diese nicht präzipitiert. Die Präzipitation von 35S geht auf 0,13%, 23S auf 0,9% und 20S auf 0,55% zurück (vgl. jeweils die Präzipitation bei 24°C). Auf Proteinebene sieht man, dass ein Verlust der Interaktion mit Vorläufer-rRNA nicht auf einen Verlust der Interaktion mit Noc4p zurück zu führen ist, da der Interaktionspartner auch bei 37°C weiterhin in gut nachweisbarer Menge angereichert wird. Insgesamt ist der Level an beiden Proteinen abgeschwächt, aber sie sind beide nachweisbar. Nop14-2p lässt sich noch präzipitieren und auch eine Koreinigung von Noc4p ist immer noch möglich.

Das mutante Protein Nop14-2p ist also bei nicht permissiver Temperatur (37°C) nur noch bedingt in der Lage mit der rRNA zu interagieren, wohingegen die Interaktion zu Noc4p nicht maßgeblich beeinflusst erscheint.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde nun überprüft, wie sich die Interaktion von Noc4p zur rRNA und zu Nop14p durch die Verwendung des temperatursensitiven Allels *noc4-8* bei nicht permissiver Temperatur verändert. Hierzu wurde im Stamm *noc4-8* das Allel von NOP14 chromosomal mit dem HA-Epitop fusioniert, um Nop14p als kopräzipitierten Faktor nachweisen zu können. Das temperatursensitive Allel *noc4-8* wird als Fusionsprotein mit dem Protein A-Epitop unter der Kontrolle des NOP-Promoters exprimiert und kann so präzipitiert werden. Das chromosomal Wildtypallel von NOC4 ist in diesem Stamm deletiert. Als Kontrolle wird im gleichen Stammhintergrund anstelle des mutanten Allels ein Wildtypallel exprimiert. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 15 gezeigt.

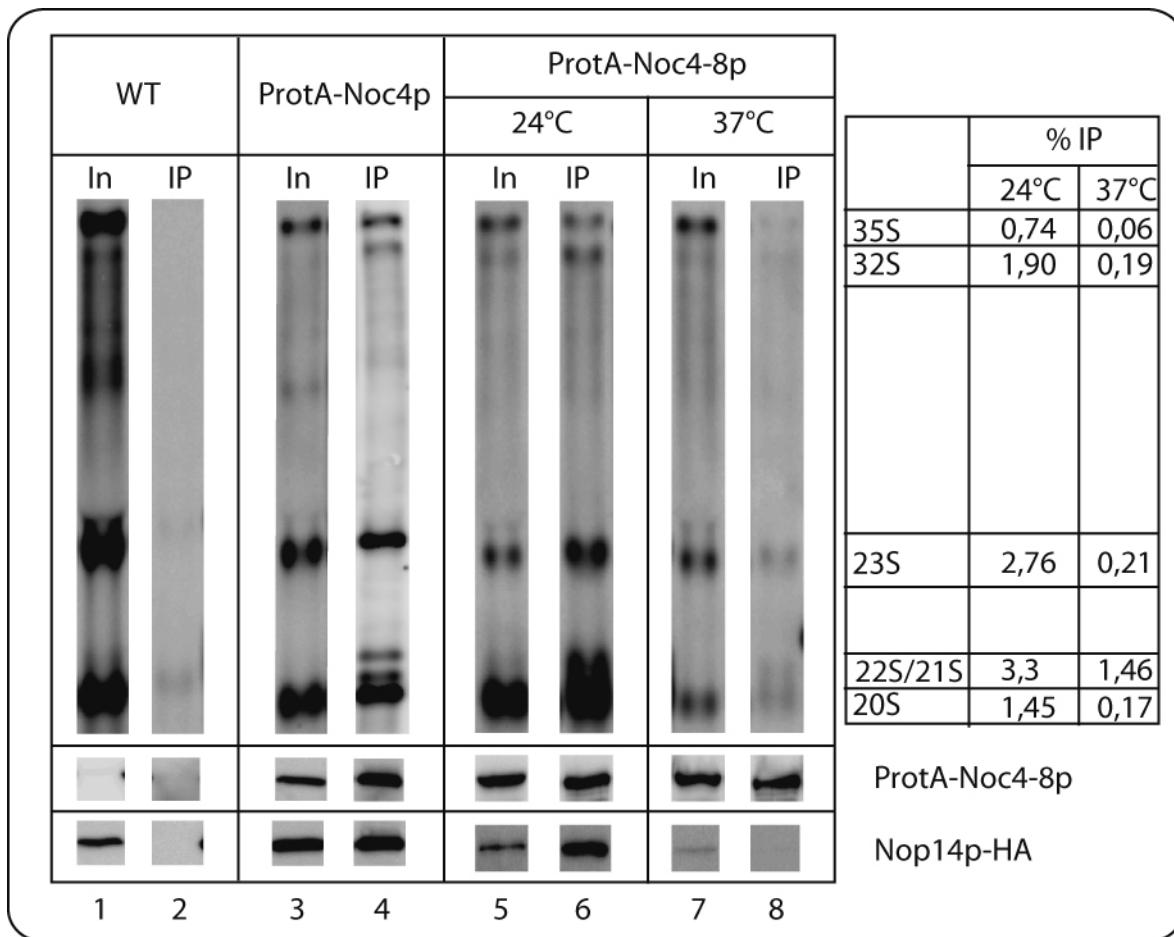


Abbildung 15: Immunpräzipitation des temperatursensitiven Allels *noc4-8*. Die Spuren 1 und 2 zeigen einen unmarkierten Stamm, um den Hintergrund an kopräzipitiertem Protein und RNA zu ermitteln. Spur 4 zeigt die Präzipitation von einem Wildtypallel mit fusioniertem Protein-A-Epitop. Spuren 6 und 8 zeigen die Präzipitation des temperatursensitiven Allels *noc4-8* bei 24°C bzw. nach 3h Inkubation bei 37°C. Kopräzipitation von Nop14p-HA wurde im *Westernblot* durch den HA-Antikörper nachgewiesen, Protein A-Noc4p durch den PAP-Antikörper. Die Tabellen geben die Quantifizierungen der Signale der Präzipitationen bezogen auf den Input an. In=Input, IP=Immunpräzipitation.

Ein Stamm ohne Epitopmarkierung an Noc4p zeigt in der rRNA-Präzipitation nur im Bereich von 20S rRNA ein schwaches Hintergrundsignal (Spur 2). Ohne eine Epitopmarkierung an Noc4p wird auch kein Nop14p nachweislich kopräzipitiert und es ist auch kein Protein A-Noc4p im *Westernblot* nachweisbar.

Bei Verwendung des epitopmarkierten Wildtypproteins Noc4p sieht man erneut das bereits beobachtete Präzipitationsmuster der Vorläufer-rRNA-Spezies (35S-, 32S-, 23S-, 22S-, 21S- und 20S rRNA, siehe Abb. 12A). Nop14p-HA wird ebenfalls durch die Präzipitation von Protein A-Noc4p gut angereichert (Spur 4).

Im Fall des mutanten Proteins Noc4-8p sieht man bei der Präzipitation nach Inkubation bei 24°C keine großen Unterschiede zur Wildtypesituation, weder bei der Präzipitation von Vorläufer-rRNA noch bei der Kopräzipitation von Nop14p-HA (Spur 6). Wird dieser Stamm allerdings für 3h bei 37°C inkubiert, ändert sich das Bild deutlich. Protein A-Noc4-8p wird weiterhin gut exprimiert und kann auch in etwa auf Wildtypniveau präzipitiert werden. Die

Inkubation auf 37°C bewirkt jedoch, dass Nop14p-HA deutlich weniger exprimiert wird, möglicherweise, weil die Interaktion zu Noc4-8p bei 37°C verloren geht. Dies würde auch erklären, warum sich Nop14p-HA nicht mehr anreichern lässt. In Spur 8 ist jedenfalls Nop14p-HA nicht mehr nachweisbar.

Auf rRNA-Ebene hat das mutante Allel Auswirkungen auf die Menge an 20S rRNA. Diese geht deutlich zurück, während 35S- und 23S rRNA akkumulieren. Dies entspricht dem bereits beschriebenen Phänotyp anderer mutanter Allele (Milkereit et al., 2003b). Deutlich sind auch die Auswirkungen auf die Präzipitation von rRNA-Vorläufern. Die Präzipitation von 35S-Prä-rRNA geht auf 0,06% zurück, 32S-Prä-rRNA auf 0,19%, 23S-Prä-rRNA auf 0,21% und 20S-Prä-rRNA auf 0,17%. Im Fall von 21S- und 22S-Prä-rRNA ist der Rückgang entsprechend der Quantifizierung nicht so stark ausgeprägt, es könnte sich hierbei jedoch auch um ein Artefakt in der Quantifizierung handeln, da eine genaue Auf trennung der Banden in 20S-, 21S und 22S-rRNA hier nicht möglich ist.

Es ist jedenfalls deutlich zu erkennen, dass es Unterschiede in der Präzipitation von Vorläufer-rRNA-Spezies bei Inkubation auf 37°C gibt. Ob dies nun auf eine ungenügende Koreinigung von Nop14p-HA zurückzuführen ist, lässt sich nicht sagen. Prinzipiell wäre es denkbar, dass durch das niedrige Expressionsniveau von Nop14p-HA weniger rRNA-Vorläufer präzipitiert würden. Es wäre ebenso denkbar, dass die Interaktion von Noc4-8p mit Nop14p bei 37°C verloren geht und daher reduzierte Mengen an rRNA-Vorläufern präzipitiert werden. Das kann hier nicht abschließend geklärt werden, was aber keine Auswirkungen auf die Schlussfolgerungen hat, da in beiden Modellen die Interaktion von Noc4p über Nop14p zu laufen scheint.

Diese Experimente bekräftigen, was durch die Depletionsexperimente bereits vermutet wurde: Noc4p hat keinen direkten Kontakt zur rRNA, sondern braucht hierfür wenigstens den Kontakt an Nop14p.

3.2 Funktionelle Untersuchungen von Noc4p im Prozess der Ribosomenbiogenese

3.2.1 Die Rolle von Noc4p im Kernexport von Prä-40S Partikeln

3.2.1.1 *Noc4p wird für den Export von 20S rRNA aus dem Zellkern benötigt*

Einige Aspekte der Rolle des Komplexes von Noc4p und Nop14p in der Ribosomenbiogenese der 40S Untereinheit wurden bereits durch Milkereit et al. 2003 aufgezeigt. Unter anderem wurde in dieser Publikation mit Hilfe eines fluoreszenzbasierenden *in vivo* Exportassays der Nachweis erbracht, dass zumindest Noc4p am intranukleären Transport und nukleärem Export beteiligt ist.

In diesem Assay wurde ein Protein der kleinen Untereinheit (rpS2p) mit einem GFP-Epitop fusioniert, was die Möglichkeit eröffnet, den Export von reifenden Untereinheiten *in vivo* zu verfolgen. Unter Wildtypbedingungen ist das Reporterkonstrukt ausschließlich im Zytoplasma in reifen Ribosomen lokalisiert, wie durch Fluoreszenzmikroskopie und Polysomenprofilen gezeigt wurde. Das Wachstum wird durch die Integration des GFP-Epitops nicht beeinflusst und daher kann ein solcher Stamm prinzipiell für Untersuchungen verwendet werden. Die Verwendung eines konditional letalen Allels (*noc4-1 ts*), das kein Wachstum der Hefezellen auf 37°C erlaubt, wurde nun die Lokalisation des rpS2-GFP-Reporterkonstrukts bei restriktiver Temperatur beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass das Reporterkonstrukt im Nukleus akkumuliert, wohingegen Prä-60S-Untereinheiten durch die Verwendung des mutanten NOC4-Allels unbeeinflusst blieben. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass Noc4p für den Export der Prä-40S-Untereinheit eine Rolle spielt. Allerdings bleibt bei diesen Experimenten die Frage offen, ob der Export direkt betroffen ist, oder es sich hierbei um sekundäre Effekte handelt. Diskutiert wurden hierbei eine Blockierung der 40S-Biogenese, die direkte Verhinderung des Transportes oder das Fehlen von aktiven Transportsignalen.

Um diese Frage gezielt adressieren zu können wurde durch Dr. Philipp Milkereit (in der AG Nicole Gas, CNRS Toulouse) ein biochemischer Assay entwickelt, der genauere Aussagen zulässt.

Durch eine Fraktionierung von Hefezellen in Nuklei und Zytoplasma nach einer radioaktiven Pulsmarkierung neu produzierter rRNA, anschließender RNA-Extraktion aus den Fraktionen und Analyse im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel kann bestimmt werden, welche Prä-rRNA-Spezies durch Dysfunktionen im präribosomalen Transport im Nukleus

zurückgehalten werden. Dieser Assay wurde in Leger-Silvestre et al. 2004 veröffentlicht (Leger-Silvestre et al., 2004).

In Zusammenarbeit mit Dr. P. Milkereit wurde dieser Assay nun auf die Mutante *noc4-8* angewendet. Als Vergleich für einen nukleären Exportdefekt der präribosomalen Untereinheiten dienten die bereits veröffentlichten Daten der *Crm1p*-Mutante (Leger-Silvestre et al., 2004). Der Austausch von Threonin 539 zu Cystein ermöglicht in dieser Mutante eine kovalente Bindung des Fungizids Leptomyycin B (LMB) an *Crm1p* und somit seine Inhibition (Kudo et al., 1999). In diesem Stamm wird in Anwesenheit von LMB der Kernexport von sowohl Prä-60S als auch Prä-40S Untereinheiten blockiert (Gadal et al., 2001; Ho et al., 2000; Moy und Silver, 2002). In Abbildung 16 ist das Ergebnis der Experimente mit dem Stamm *noc4-8* neben den Daten von *Crm1p* gezeigt.

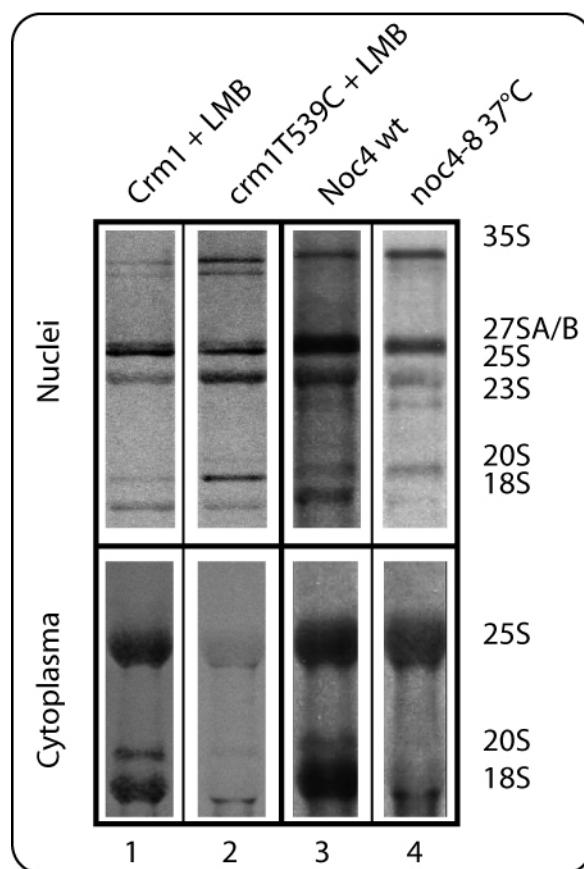


Abbildung 16: Die Fraktionierung von Hefezellen in Kern und Zytoplasma von Wildtyp und Mutanten von *Crm1p* und *Noc4p*. Hefezellen wurden für 15 min mit Tritium-markiertem Uracil inkubiert, danach fraktioniert, die RNA aus den Fraktionen isoliert, anschließend auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und im Northernblot-Verfahren auf eine Membran übertragen. Mit Leptomyycin B wurde 100 nM für 30 min vor der Pulsmarkierung inkubiert. Im Falle von *noc4-8* wurde vor dem radioaktiven Puls für 15 min auf 37°C inkubiert und die Inkubation mit Tritium-Uracil ebenfalls auf 37°C durchgeführt. Die entsprechende Wildtypkontrolle wurde ebenso behandelt. (Spuren 1 und 2 mit freundlicher Genehmigung verändert aus Leger-Sylvestre et al., 2004.)

Spur 1 zeigt den Wildtyp (mit Leptomyycin B-Behandlung). Man erkennt, dass ausschließlich in der Zellkernfraktion die Prä-rRNAs auftreten die im Zellkern entstehen (35S, 32S, 27S_{A/B},

und 20S). In der Zytoplasmafraktion tauchen dagegen in erster Linie reife 18S und 25S-Spezies auf, während sie nur schwach in der nukleären Fraktion zu sehen sind. Hierbei handelt es sich um Kontamination der Kernfraktionen mit Zytoplasma, was nie ausgeschlossen werden kann, da die Kerne durch Zentrifugation vom Zytoplasma abgetrennt werden. Möglich wäre auch noch, dass es sich hierbei um 25/18S von reifen Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums handelt, die in dieser Reinigung mit den Kernen gereinigt werden. Man erkennt auch, dass die letzten Prozessierungsschritte von 20S nach 18S (Restriktion an der Stelle D, siehe Einleitung) im Zytoplasma stattfinden, da diese Spezies verstärkt im Zytoplasma auftaucht. Die erfolgreiche Trennung von Zellkern und Zytoplasma kann man daran erkennen, dass in der Zytoplasmafraktion außer der 20S RNA keine andere Prä-rRNAs auftauchen. Die kinetisch langsameren Schritte der 25S-Produktion finden nämlich hauptsächlich im Kern statt, was an der recht prominenten Bande der 27S-Spezies nachvollzogen werden kann. Die reifen rRNAs der 40S- und 60S-Untereinheit sind im Wildtyp auch in etwa gleich stark vertreten.

In der Leptomycin B-sensitiven Mutante *crm1pT539C* (Spur 2) erkennt man, dass hier der Export von Prä-40S und Prä-60S massiv beeinträchtigt ist. In der zytoplasmatischen Fraktion ist keine rRNA mehr zu sehen. Die schwachen Signale, die noch zu sehen sind röhren von Quenching-Effekten her, die durch den großen Anteil unmarkierter rRNA an derselben Stelle hervorgerufen werden. Stattdessen ist in der Kernfraktion deutlich die Akkumulation von Vorläuferspezies zu sehen: 35S und 32S akkumulieren, 25S taucht verstärkt auf und auch 20S wird nicht mehr exportiert. 18S wird gar nicht mehr gebildet, weil die nötigen Schritte hierfür im Zytoplasma stattfinden.

Die Spur 3 zeigt wiederum Wildtypsituation, diesmal allerdings bei 37°C. Dadurch ist ein Unterschied in den Intensitäten der Banden zu beobachten. In diesem Sinne wird auch die leichte Akkumulation von 35S gedeutet, da generell alle Banden der Vorläufer stärker repräsentiert sind. Im Verhältnis gesehen sticht allerdings keine Bande in auffälliger Weise hervor.

Wird statt des Wildtypallels das Allel *noc4-8ts* verwendet, so kann man deutlich erkennen, dass im Zytoplasma kein 18S mehr ankommt, da 20S offensichtlich im Kern zurückgehalten wird. 25S erscheint dagegen unbeeinflusst im Zytoplasma, auch in der Kernfraktion taucht kein verstärktes Signal von 25S auf, wie es beim Exportblock durch *Crm1p*-Inhibition zu sehen ist (Spur 2). Daraus kann man schlussfolgern, dass ausschließlich der Export der Prä-40S-Partikel von dem temperatursensitiven Allel betroffen ist. *Noc4p* spielt also eine wichtige

Rolle im Kernexport von 20S ins Zytoplasma, durch seine Inaktivierung wird der Kernexport von 20S blockiert.

3.2.1.2 Hinweise auf genetische Interaktion von NOC4 mit Komponenten der Exportmaschinerie

Die Ergebnisse des Exportassays sprechen deutlich für eine Rolle von Noc4p im Export der Prä-40S-Untereinheiten aus dem Nukleus, 40S-Export wiederum ist an Crm1p als Exportin gekoppelt (Moy und Silver, 2002). Es wurde nun die Frage gestellt, ob eine genetische Interaktion von NOC4 und CRM1 nachweisbar ist. Um dies zu überprüfen, wurde als Ansatz die Methode der synthetischen Letalität gewählt. Hierzu wurde die Leptomycin B-sensitive Mutante *crm1T539C* mit dem temperatur-sensitiven Allel *noc4-8ts* in einem Stamm zusammengebracht. Durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf subletalen Leptomycin B-Konzentrationen und Inkubation auf 30°C sollte das Wachstum überprüft werden. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 17 gezeigt.

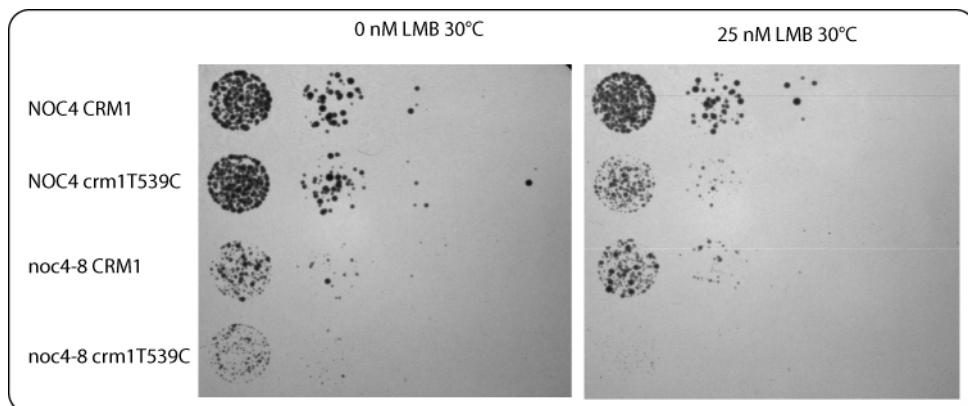


Abbildung 17: Synthetische Letalität von *crm1T539C* und *noc4-8ts*. Um eine genetische Kopplung von NOC4 und CRM1 zu untersuchen wurden Tests auf synthetische Letalität gemacht. Hierzu wurden beide Mutationen in einem Stamm vereint und bei subletalen Bedingungen untersucht. LMB=Leptomycin B.

Ein Wildtypstamm wächst bei 25nM LMB und 30°C unbeeinflusst durch das gering vorhandene Leptomycin B (was ohne die Mutation von T539C sowieso keinen Effekt hat!). Auch die LMB-sensitive Mutante *crm1T539C* kann unter diesen Bedingungen noch wachsen, wenn auch bereits beeinträchtigt (zweite Reihe). Die temperatursensitive Mutante mit CRM1-Wildtyp wächst bereits bei 30°C schlechter als der entsprechende Wildtyp, wird diese Mutation allerdings zusätzlich mit LBM-sensitiven Mutation kombiniert, wird das Wachstum bei 25nM LMB nahezu vollständig verhindert (vierte Reihe).

Dies lässt auf einen genetischen Zusammenhang von NOC4 mit CRM1 schließen, was die Rolle von Noc4p im Kernexport der Prä-40S-Untereinheit unterstreicht. Die temperaturabhängige Mutation in Noc4p könnte zur Folge haben, dass die Interaktion mit der Exportmaschinerie beeinträchtigt ist und somit die Zelle nicht mehr in der Lage ist, Vorläufer der 40S-Untereinheit in ausreichendem Maße zu exportieren.

3.2.1.3 Das mutante Protein Noc4-8p ist bei 37°C im Zytosoma delokalisiert

Aufgrund der Ergebnisse des Exportassays und der genetischen Interaktion stellt Noc4p somit einen potentiellen Exportadapter für die ribosomalen Vorläufer der 40S-Untereinheit dar. Diese sind in der Literatur als Proteine beschrieben, die sowohl physikalisch mit Crm1p, als auch mit der entsprechenden präribosomalen Untereinheit. Bisher beschriebenen Exportadaptoren (Nmd3p und Ltv1p) weisen zudem eine deutliche zytoplasmatische Verteilung (Ho und Johnson, 1999; Seiser et al., 2006). Dies ist für Noc4p in GFP-Lokalisationsstudien bisher nicht beobachtet worden (Milkereit et al., 2003b). Noc4p lokalisierte in diesen Experimenten hauptsächlich nukleolär. Sowohl Nmd3p als auch Ltv1p sind als *Shuttle*-Proteine beschrieben worden, die zwischen Nukleus und Zytosoma pendeln. Interessanterweise halten sie sich aber hauptsächlich im Zytosoma auf, mit anscheinend sehr kurzen Phasen im Nukleus. Es wäre also denkbar, dass Noc4p eine ähnliche Rolle spielt, nur eben mit einer hauptsächlich nukleolären Lokalisation, d.h. mit nur sehr kurzen Phasen im Zytosoma.

Daher wurde nun die Frage gestellt, ob es Bedingungen gibt, unter denen Noc4p nicht im Kern, sondern mit längerer Verweildauer im Zytosoma lokalisiert, weil ein Pendeln des Proteins zurück in den Kern unterbunden wird.

Hierzu wurden deshalb Immunlokalisierungen von Noc4-8p in Hefezellen nach dreistündiger Inkubation auf 37°C durchgeführt. Das mutante Allel noc4-8 verhindert ein Wachstum bei 37°C, da der nukleäre Export der 20S Prä-rRNA blockiert ist, möglicherweise wegen einer gestörten Interaktion mit der Exportmaschinerie. Ein paralleles Experiment wurde mit Wildtyp-Noc4p durchgeführt, um zu testen, ob eine eventuelle Lokalisationsveränderung generell durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur zustande kommt. Um deutliche Veränderungen auch im Bereich Nukleus und Nukleolus unterscheiden zu können, wurde zusätzlich die A43-Untereinheit der RNA-Polymerase I mit dem HA-Epitop fusioniert, die dann zusammen mit dem Protein-A-Epitop am Noc4p nachgewiesen werden kann. Das

Protein Rpa43p ist ein nukleoläres Protein, da die Transkription der rRNA im Nukleolus stattfindet. Durch die Fusionierung mit dem HA-Epitop konnten keine Wachstumsdefizite festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 18 ist das Ergebnis der Immunlokalisierungsexperimente gezeigt.

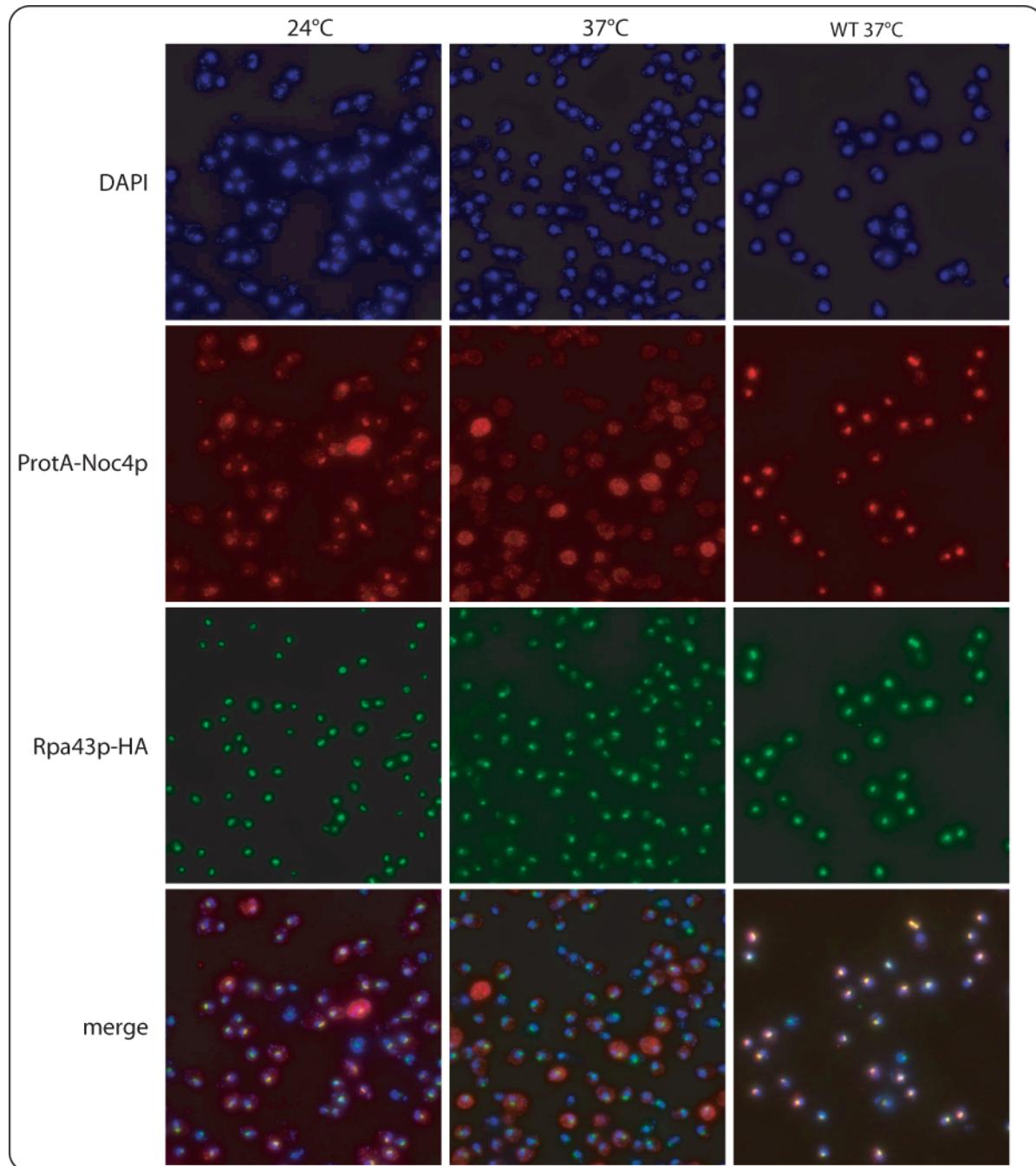


Abbildung 18: Immunlokalisierung von Noc4p verschiedener Allele. Die Lokalisation von Noc4p von verschiedenen Allelen wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse überprüft. Protein-A-Noc4p wurde mit dem primären Protein-A-Antikörper von Sigma detektiert und mit dem Alexa Fluor 594 gekoppelten Zweitantikörper von Molecular Probes visualisiert. Rpa43-HA wurde mit dem primären HA-Antikörper 3F10 von Roche detektiert und mit dem Alexa Fluor 488 gekoppelten Zweitantikörper von Molecular Probes visualisiert. DAPI färbt spezifisch die DNA an. Merge= Überlagerung aller Aufnahmen.

Man erkennt in der Abbildung, dass Noc4-8p bereits bei 24°C einen erhöhten Anteil von zytoplasmatisch lokalisiertem Protein hat im Gegensatz zum Wildtyp. Es ist trotzdem eine deutliche Akkumulation von Noc4-8p im Nukleolus zu sehen, was auch anhand der Co-Lokalisierung von Rpa43p gut zu verfolgen ist. In der Überlagerung der Signale ist dies am Auftreten eines deutlichen gelblich gefärbten Signals (Mischung von rot und grün) zu sehen. Wieso das Protein in der mutierten Version eine zytoplasmatische Lokalisation besitzt, ist nicht klar.

Nach der Inkubation auf 37°C sind im Fall von Noc4-8p deutliche Effekte erkennbar. Es fehlt eine nukleolare Akkumulation von Noc4-8p, auch die Überlagerung mit dem grünen Signal von Rpa43p zeigt weiterhin ein grünes und kein gelbliches Signal, was verdeutlicht, dass Noc4-8p nicht mehr im Nukleolus akkumuliert vorliegt. Dieses gelbliche Signal der Überlagerung ist jedoch in der Wildtyp-Variante bei 37°C immer noch sehr deutlich zu sehen, hier findet offensichtlich keine Relokalisierung des Proteins statt. Die Ergebnisse der Immunlokalisierung erlauben jedoch keine Rückschlüsse darauf, ob sich Noc4-8p überhaupt noch im Zellkern befindet. Hierfür wurde die Verteilung von Noc4-8p mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop überprüft, das eine isolierte Betrachtung des Zellkerns zulässt. Hierbei wurde Noc4-8p immer noch im Nukleus gesehen (Daten nicht gezeigt), es handelt sich bei diesem Phänotyp also nicht um einen nukle(ol)ären Ausschluss, jedoch um eine sehr deutliche Abnahme des Signals im Nukleolus.

Um zu prüfen, wie schnell diese Relokalisierung ins Zytoplasma geschieht wurden Kinetiken erstellt. Für die Durchführung eines Immunfluoreszenzexperimentes werden die Zellen mit Hilfe von Formaldehyd für 30min fixiert. Es wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten bei 37°C gewählt vor der Zugabe von Formaldehyd. Hierbei zeigte sich, dass die Umlokalisierung von Noc4-8p schneller geschieht als die Fixierung, da bei gleichzeitiger Zugabe von Formaldehyd und Beginn der Inkubation auf 37°C das Protein Noc4-8p in ca. 80% der Zellen keine nukleolare Akkumulation mehr aufweist (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten zytoplasmatischen Signalen um Abbauprodukte von Noc4-8p handelt, wurden Hefezellen gleich behandelt, wie für die Immunlokalisation und anschließend in Kern und Zytoplasma fraktioniert. Bei einer anschließenden *Westernblot*-Analyse von Noc4-8p zeigte sich, dass das Protein keiner auffällig starken Degradation unterlegen ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 gezeigt.

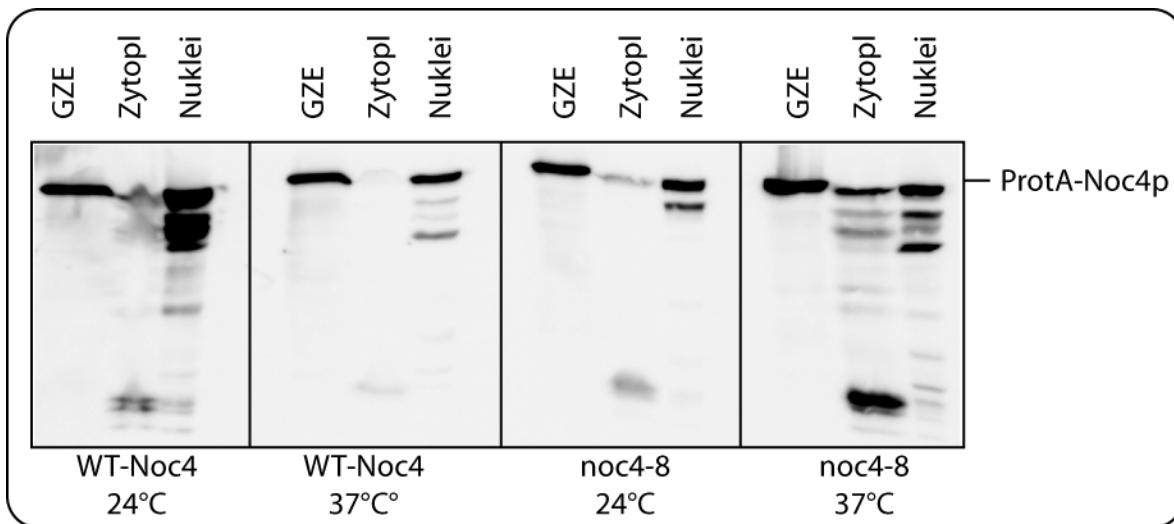


Abbildung 19: Western-Blot verschiedener Stämme nach Fraktionierung in Zytosoma- und Kernfraktion. Die Stämme wurden behandelt wie für die Immunfluoreszenz, anschließend wurde ein Teil der Zellen jedoch in aufgeschlossen (GZE=Gesamtzellextrakt,), der andere Teil wurde in Kern- und Zytosoma (Zytopl=Zytoplasmafraktion) fraktioniert. Protein A-Noc4p wurde mittels PAP-Antikörper nachgewiesen.

Im Gesamtzellextrakt, der parallel hergestellt wurde, war keine Degradation zu sehen, auch nicht im Stamm noc4-8, der bei 37°C inkubiert wurde. Die Fraktionierungen weisen Abbauprodukte auf, die vermutlich während der Durchführung der Fraktionierung entstanden sind. Sie treten auch im Wildtypstamm bei 24°C und 37°C auf, in denen keine Umverteilung von Noc4p in der Immunfluoreszenz zu beobachten ist. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass es sich bei den beobachteten zytoplasmatischen Signalen in der Immunfluoreszenz hauptsächlich um Vollängenprotein handelt.

Um zu testen, ob die Lokalisierung von Nop14p von der Relokalisierung von Noc4-8p ins Zytosoma betroffen ist, wurde das HA-Epitop c-terminal fusioniert und die Lokalisierung von Nop14p nach 3-stündiger Inkubation auf 37°C untersucht. Hierbei konnte keine Veränderung in der Lokalisierung von Nop14p beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurden Enp1p, Rrp5p und Utp15p untersucht. Auch hier konnte kein Effekt nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen weiterer temperatursensitiver Allele von NOC4 zeigten ebenfalls diesen Phänotyp der Relokalisierung ins Zytosoma (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Experimente bestärken die Annahme, dass Noc4p ein mögliches *Shuttle-Protein* ist, das infolge der Mutation nicht mehr in der Lage ist, in den Kern reimportiert zu werden. Möglicherweise wird Noc4p zusammen mit dem reifenden Präribosom aus dem Kern exportiert und anschließend gleich wieder in den Kern reimportiert. Dieser schnelle Reimport in den Nukleus könnte in der Mutante gestört sein, was zu dem beobachteten Phänotyp der zytoplasmatischen Lokalisierung führen würde.

Wenn nun der Export der reifenden 40S-Untereinheit gestoppt würde, könnte man so eventuell den Phänotyp der zytoplasmatischen Lokalisierung von Noc4-8p nach Inkubation auf 37°C verhindern.

Um diese Arbeitshypothese zu testen, wurde wiederum das in Abschnitt 3.2.1.1. beschriebene Allel *crm1T539C* verwendet, das in Gegenwart von LMB inaktiviert wird. Dieses Allel wurde zusammen mit dem temperatursensitiven Allel *noc4-8* in Hefezellen gebracht und die Verteilung von Noc4-8p durch Inhibition des Kernexports von Präribosomen durch Leptomycin B mittels Immunlokalisierung beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass durch die Blockierung des ribosomalen Kernexports mittels Leptomycin B die zytoplasmatische Relokalisierung von Noc4-8p bei 37°C nicht verhindert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Zuge dieser Experimente wurde die Beobachtung gemacht, dass bereits bei 24°C und Leptomycin B-Behandlung eine Umverteilung von Noc4-8p auftritt. In einem Kontrollexperiment, in dem ein Wildtypallel von NOC4 mit *crm1T539C* kombiniert wurde, ist dieser Phänotyp nicht zu beobachten. Hier bleibt Noc4p auch bei 37°C und Leptomycin B-Behandlung weiterhin im Nukleolus (Daten nicht gezeigt).

Durch die Beobachtungen der Umverteilung von Noc4-8p auch ohne Temperaturerhöhung lässt sich die Arbeitshypothese in der postulierten Form nicht halten. Die Blockierung des präribosomalen Kernexports verhindert nicht die Umlagerung von Noc4-8p ins Zytosoma, vielmehr tritt dieser Effekt nun schon bei 24°C auf. Über die Gründe dieses Phänotyps kann nur spekuliert werden.

In der Mutante *noc4-8* erscheinen die Funktion von Noc4p am Präribosom und sein Export ins Zytosoma voneinander unabhängig, da sich das mutante Protein durch den Kernexportblock mit LMB nicht im Kern anhäuft. Die Rolle von Noc4-8p im nukleären Export von 20S wird bei 24°C immer noch wahrgenommen, wie in 2.1.1. gezeigt werden konnte. Wird nun jedoch der Kernexport auf anderem Wege bei dieser Temperatur blockiert, tritt der Phänotyp der zytoplasmatischen Verteilung auch ohne Temperaturerhöhung auf, d.h. dass der Defekt von Noc4-8p möglicherweise im Reimport in den Nukleus zu suchen ist. Daher wäre als mögliche Erklärung denkbar, dass Noc4p mit Hilfe von kernständigen Faktoren, die ebenfalls mit Präribosomen aus dem Kern geschleust werden, in den Kern reimportiert wird. Wird nun der Kernexport von Präribosomen durch LMB blockiert, könnten diese Faktoren nicht mehr in ausreichendem Maße Noc4p in den Kern reimportieren, da sie selber im Nukleus gehalten werden.

3.2.2 Noc4p wird vermutlich unabhängig von Nop14p in den Zellkern importiert

Die Ergebnisse der vorangegangen Experimente zeigen unter anderem, dass Noc4p hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert ist, mit einer möglicherweise direkten Rolle im nukleären Export präribosomaler Partikel. Im Falle der temperatursensitiven Mutante Noc4-8p scheint der Reimport in den Nukleus gestört. Daher wurde die Frage gestellt, wie Noc4p generell in den Nukleolus gelangt, da durch computerbasierte Untersuchungen an der Primärsequenz von Noc4p (unter <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>) nach einer NLS (Kernimportsequenz) für Noc4p kein NLS-Motiv gefunden werden konnte. Die Größe von Noc4p lässt eine passive Diffusion durch die Kernporen nicht zu, Noc4p muss also aktiv in den Kern transportiert werden und hierzu mit der Importmaschinerie interagieren.

Da Nop14p der direkte Interaktionspartner von Noc4p ist, wurde dieselbe Analyse für Nop14p durchgeführt. Die Berechnung ergibt eine putative NLS im C-terminalen Bereich von Nop14p mit dem Motiv LKKERKF.

Für Nop14p wurde bereits publiziert, dass es für den Kernimport von eines seiner Bindungspartner verantwortlich ist. Das kernständige Protein Emg1p scheint mit Hilfe von Nop14p in den Nukleus zu gelangen (Liu und Thiele, 2001). Dies wurde durch eine biochemische Fraktionierung in Kern und Zytoplasma nach 10-stündiger Nop14p-Depletion gezeigt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur Emg1p mit durch die Interaktion mit Nop14p in den Zellkern gelangt, sondern ebenso auch Noc4p.

Diese Hypothese sollte mit Hilfe von Immunlokalisationsexperimenten von Noc4p überprüft werden. Dazu wurde der oben beschriebene Stamm verwendet, der kein chromosomalles Allel von Nop14p besitzt, sondern dies auf einem Plasmid unter dem GAL-Promoter erhält. Dieser Stamm enthält eine Epitopmarkierung (TAP) an der chromosomalen Kopie von NOC4, um die Lokalisation von Noc4p intrazellulär durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie zu verfolgen. Durch Umsetzen der Zellen auf glukosehaltiges Medium wird die Expression von Nop14p abgeschaltet. Nun wurde zu verschiedenen Zeiten der Depletion von Nop14p eine Immunlokalisation von Noc4p durchgeführt, um zu prüfen, ob die Lokalisation von Noc4p durch die Depletion beeinflusst ist. Die Inkubation in glucosehaltigem Medium wurde maximal für 6h durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde aufgrund der veröffentlichten Depletionskinetik (Liu und Thiele, 2001) als ausreichend angesehen. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 20 gezeigt.

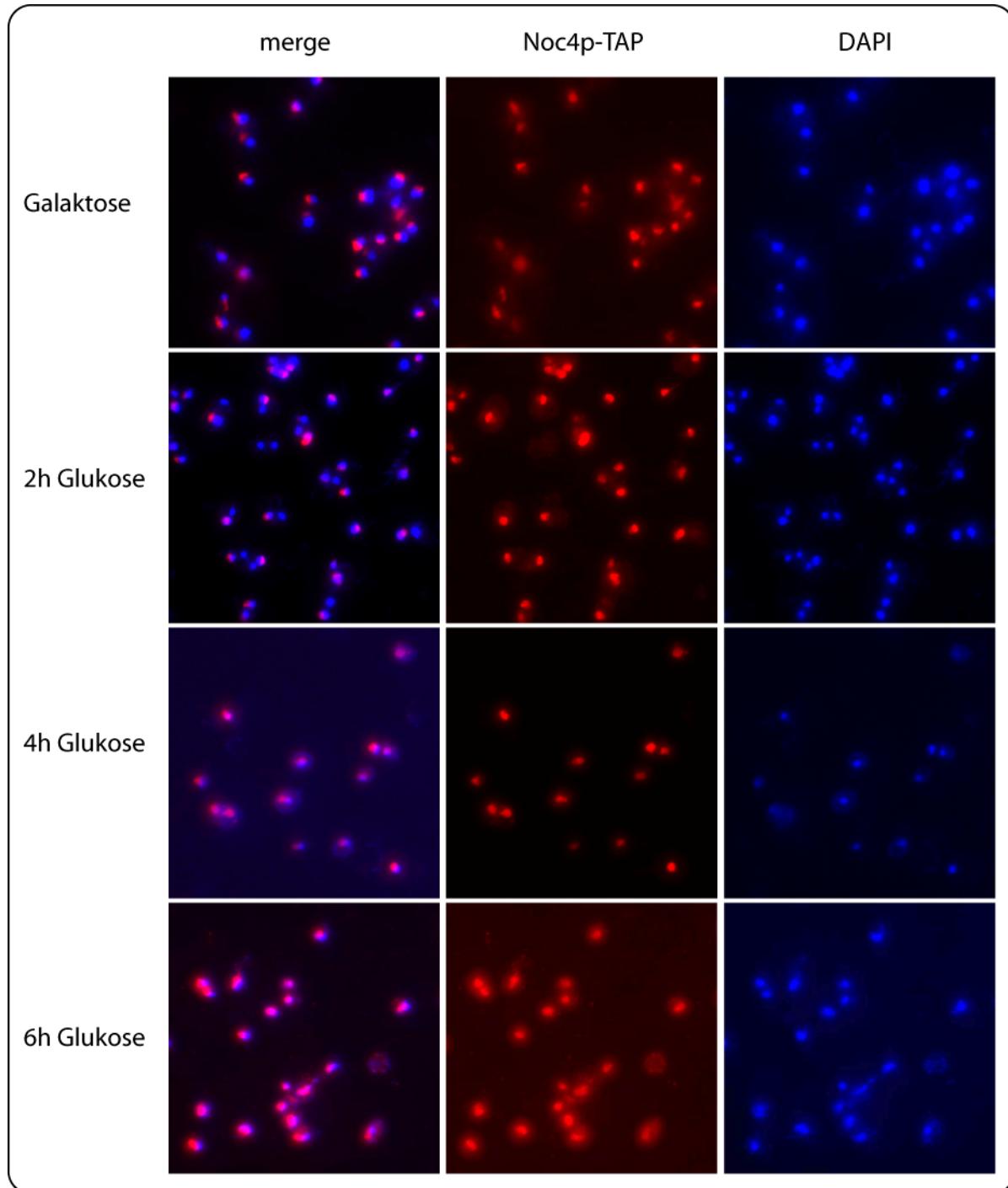


Abbildung 20: Immunlokalisierung von Noc4p nach Abreicherung von Nop14p. Die Lokalisierung von Noc4p-TAP im Stamm pGalNOP14, der ein induzierbares Allel von NOP14 besitzt, wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in glukosehaltigem Medium mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Wie in den Abbildungen ersichtlich, ist Noc4p in der Wildtypsituation deutlich im Nukleolus lokalisiert, mit einem sehr schwachen Signal im Nukleus und keinem nachweisbaren zytoplasmatischen Signal. Durch die Depletion von Nop14p ändert sich nach 2h noch nichts an dieser Verteilung, nach vier Stunden ist eine leichte Umverteilung von Noc4p ins Kernplasma beobachtbar, die sich nach 6h noch weiter verstärkt. Dies kann man an der Überlagerung des roten und blauen Signals ablesen, welches sich dann zu einem lila farbenen

Ton vermischt. Vergleicht man die Signale auf Galaktose mit denen nach 6h Stunden Depletion, so erkennt man, dass bei Wachstum auf Galaktose beide Signale deutlich voneinander abgetrennt sind, während durch die Nop14p Abreicherung der Anteil des lilafarbenen Signals deutlich zunimmt.

Eine Überverteilung des Signals ins Zytoplasma wurde allerdings bei diesen Zeitwerten nicht beobachtet, vermutlich weil die Zeit der Depletion nicht ausreichend war. Aus technischen Gründen war keine Immunlokalisierung nach 16h und mehr möglich.

Da allerdings nach 6h Depletion keine Tendenz der Umverteilung ins Zytoplasma beobachtet werden konnte, wird der Schluss gezogen, dass Noc4p nicht im Komplex mit Nop14p in den Nukleolus gelangt, sondern auf anderem Wege in den Zellkern gelangen muss, durch Nop14p aber vermutlich im Nukleolus gehalten wird.

3.3 Der Noc4p-Nop14p-Komplex im Netzwerk präribosomaler Biogenesefaktoren

Wie in der Einleitung beschrieben, sind an der Produktion reifer Ribosomen in der Hefezelle viele Biogenesefaktoren beteiligt, von denen bisher nur wenige in ihrer Funktion genauer charakterisiert wurden. Mit Hilfe genomweiter Analysen von Proteinkomplexen durch Affinitätsreinigungen und nachfolgender massenspektrometrischer Identifikation der kogereinigten Komponenten (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002) wurden zahlreiche weitere potentielle Biogenesefaktoren gefunden. In diesen systematischen, genomweiten Analysen wurden zahlreiche Komplexe beschrieben, die eine Vielzahl der unterschiedlichen Biogenesefaktoren enthalten. Es handelt sich dabei um sowohl Prä-40S-Komplexe, als auch Prä-60S-Komplexe.

Auch Noc4p und Nop14p wurden im Zuge dieser Analysen mehrfach identifiziert. Die Auswertung dieser Komplexe gestaltet sich recht mühsam und unübersichtlich, wenn man gezielt nach Faktoren sucht, da den Veröffentlichungen lediglich Listen angehängt sind, in denen die gereinigten Proteine zusammen mit allen identifizierten kogereinigten Faktoren verzeichnet sind.

Um Informationen über Noc4p und Nop14p aus diesen Listen zu ziehen, müssen diese komplett durchsucht werden. Weder Noc4p noch Nop14p wurden in den Analysen als Anker für eine Reinigung eingesetzt, sie tauchen also nur als kogereinigte Faktoren unter vielen anderen auf. Anhand von Vergleichen der Komplexe, die Noc4p und Nop14p enthalten, lässt sich nun unter Zu-Hilfenahme weiterer Informationen über die anderen kogereinigten Faktoren möglicherweise etwas über die Noc4p und Nop14p enthaltenden Komplexe aussagen.

Allerdings treten bei diesen genomweiten Analysen auch Probleme auf, die in der Auswertung berücksichtigt werden müssen. Durch die Aufreinigung mit epitopmarkierten Proteinen können verschiedene Komplexe gleichzeitig aufgereinigt werden, die jeweils die epitopmarkierte Komponente enthalten. Es kann Unterschiede in der Effizienz der Aufreinigung jeder dieser Komplexe geben, da möglicherweise das markierte Protein unter physiologischen Bedingungen unterschiedlich zugänglich ist. Manche der kogereinigten Proteine können auch nicht in den gewählten Bedingungen über Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Gavin et al. geben auch an, dass gleiche Reinigungen in wiederholt durchgeführten Experimenten unter denselben Bedingungen nur eine 70%ige Übereinstimmung der Proteinkomposition zeigten.

Diesen Unsicherheiten in den einzelnen Reinigungen kann daher nur auf statistischem Wege begegnet werden, indem so viele unterschiedliche Experimente wie möglich in die Auswertung mit einbezogen werden. Je öfter eine Proteinkomponente in unterschiedlichen Aufreinigungen auftaucht, umso wahrscheinlicher handelt es sich tatsächlich um einen wichtigen Faktor, der in der Biogenese von Ribosomen eine Rolle spielt. Allerdings gibt es von den Autoren der genomweiten Analysen ausgeschlossene Verunreinigungen. Zu ihnen zählen die ribosomalen Proteine per se und die Hitzeschockproteine. Eine solche Auswertung ist daher in Form der veröffentlichten Listen nicht mehr möglich.

Es wurde daher nach einer Möglichkeit gesucht, die Informationen in einer Weise zu verarbeiten, die Aussagen über die Komplexe zulässt. Anhand der publizierten Analysen wurde nun in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Milkereit eine Auswertung der gefundenen Faktoren in Bezug auf eine potentielle Beteiligung an der Ribosomenbiogenese durchgeführt. Hierzu wurden 49 Komplexe ausgewählt, die in den kogereinigten Faktoren bereits in der Ribosomenbiogenese beschriebene Proteine enthielten. Zu dieser Auswahl an Komplexen wurden noch fünf weitere isolierte Multiproteinkomplexe hinzugefügt, die als Komplexe der Ribosomenbiogenese in der Literatur beschrieben wurden (Baßler et al., 2001; Dragon et al., 2002; Fatica et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Saveanu et al., 2001). Insgesamt wurden in den Komplexen 387 Proteine gereinigt. Aus den ursprünglichen 49 Komplexen wurden solche Proteine ausgewählt, die mit einer statistischen Häufigkeit von 20% und darüber auftraten (die potentiellen Verunreinigungen waren von den Autoren ja bereits ausgeschlossen worden) und die im Folgenden als Markerproteine definiert wurden. Die Komplexe wurden nun in Bezug auf die Markerproteine verglichen, indem bestimmt wurde, welche der Marker zusammen mit anderen auftreten. Durch diesen rein statistischen Vergleich konnten zwei Klassen von Markern definiert werden: Klasse A und Klasse B. Über

diese Marker war eine Einteilung der Komplexe in sechs verschiedene Gruppen möglich, nämlich entsprechend dem Auftreten der beiden Markerklassen. Diese Art des Vergleichs von Komplexen über Markerproteine erleichtert eine Einteilung in unterschiedliche Gruppen, unabhängig von der exakten Reproduzierbarkeit der Einzelexperimente, sondern gestützt auf statistisch häufig auftretende Proteine. Diese Gruppen sind in Abbildung 21 dargestellt.

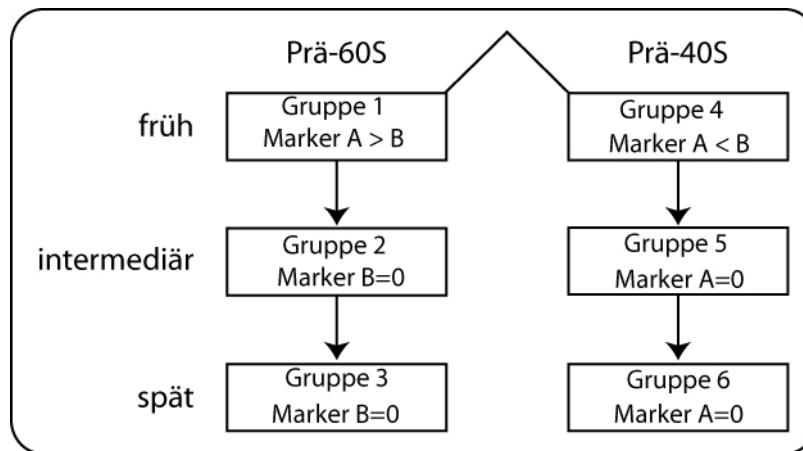


Abbildung 21: Die Einteilung in Gruppen gemäß dem Auftreten von Markerproteinen. Eine Einteilung in diese Gruppen wurde durch die Definition von Markerproteinen ermöglicht, die wiederum in zwei Klassen (Klasse A und Klasse B) eingeteilt wurden, entsprechend ihrem Auftauchen miteinander.

Es fanden sich solche Komplexe, die ausschließlich Marker der Klasse A beinhalteten (Gruppe 2), während andere nur Klasse B-Marker enthalten (Gruppe 5). Wurde nun noch die Information über die Funktion bekannter Komponenten mit einbezogen, so stellte sich heraus, dass die Komplexe der Gruppe 2 solche des 60S-Biogeneseweges waren, während die Komplexe der Gruppe 5 solche des 40S-Weges waren. Die rein statistische Auswertung der Markerproteine korreliert also mit den in der Literatur beschriebenen, von einander unabhängigen Biogenesewegen der Untereinheiten für 40S und 60S.

Zwei Gruppen von Komplexen beinhalten Komplexe mit beiden Markern A und B (Gruppe 1 und 4): Gruppe 1 enthält mehr Klasse A-Marker während Gruppe 4 mehr Klasse B-Marker enthält. Die übrigen Gruppen (Gruppe 3 und 6) enthalten Komplexe, in denen nur wenige der Markerproteine gefunden wurden. Die Komplexe in Gruppe 1 und 4, 2 und 5, 3 und 6 können als frühe, intermediäre und späte Komplexe gruppiert werden. Die Gruppen 1 und 4 können auch als gemischte Gruppe angesehen werden, in denen 40S und 60S noch nicht deutlich voneinander getrennt sind. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Klassifikation der Komplexe zusammengefasst.

Gruppe 1	NOP4	NOP15	NOC1	FYV14	CKA1	NOP2	TIF6	ELA1	BUD20	NOP2	NSA3	NOP7	APM1
Marker A	86	66	60	60	60	53	46	40	40	33	26	26	26
Marker B	57	14	42	57	42	28	14	42	14	28	14	14	14
Gruppe 2	RPF2	ERB1	SSF1	SSF1	NUG1	NOP7	MAK5	NSA2	ERB1	NOP7	SDA1	NOP13	
Marker A	86	73	66	66	66	53	53	46	46	40	33	33	
Marker B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gruppe 3	RPL2A	MAK11	ERP2	RPL23A	NMD3	KRE35							
Marker A	26	20	13	6	6	6							
Marker B	0	0	0	0	0	0							
Gruppe 4	YGR090W	NHP2	CBF5	DBP4	YLR427W	MUS81	GAR1	YIF2	SPT2	DIA2	TSR1		
Marker A	13	20	20	6	20	13	13	6	6	6	6		
Marker B	71	42	42	42	28	28	28	28	28	28	0		
Gruppe 5	PWP2	UTP7	ENP1	KRR1	YJL069C	NOP5	CBF5	YJL069C					
Marker A	0	0	0	0	0	0	0	0					
Marker B	100	85	71	71	71	42	28	28					
Gruppe 6	YBL032W	KRE33	RIO2	NOB1	TSR1								
Marker A	0	0	0	0	0								
Marker B	14	14	0	0	0								

Tabelle 1: Präribosomale Komplexe können in sechs Gruppen sortiert werden. Die Zugehörigkeit zu den Gruppen wird über den Prozentsatz kogereinigter Markerproteine definiert (Anteil an allen Markerproteinen einer Klasse). Gruppen 1-3 beschreiben Komplexe des 60S-Biogeneseweges, Gruppen 4-6 solche des 40S-Biogeneseweges. Folgende Proteine wurden mehrfach in unterschiedlichen Experimenten gereinigt: Erb1p, Nop7p, Ssf1p, Cbf5p, Nop2p und Tsr1p. In Gruppe 6 finden sich drei Komplexe ohne Marker, diese wurden gemäß bereits publizierter Daten dem 40S-Biogeneseweg zugeschrieben.

Mit Hilfe eines von Dr. Philipp Milkereit erstellten Pascal-Programms war es möglich, die Daten der gereinigten Ankerproteine und die kogereinigten Komponenten dieser Komplexe einzulesen und nach den oben beschriebenen Kriterien zu sortieren. Die Ausgabe erfolgte in eine Datenbank, die Auskunft über die Zusammensetzung der Komplexe mit ihren Proteinkomponenten gibt, sowie die Berechnung der Anteile an kogereinigten Markerproteinen. Die Komplexe wurden auch bezogen auf ihre Zusammensetzung miteinander verglichen und Ähnlichkeiten zu anderen Komplexen angegeben. Auf die Datenbank kann über das Internet unter <http://www.pre-ribosome.de> zugegriffen werden. Es ist möglich, die detaillierte Zusammensetzung der Komplexe zu studieren, man kann aber auch nach kogereinigten Komponenten suchen.

Mit Hilfe der Datenbank ist es nun möglich, Noc4p und Nop14p im Kontext der systematischen Analysen unter Einbeziehung der statistischen Aspekte zu untersuchen. Noc4p tauchte vier Mal als kogereinigter Faktor in unterschiedlichen Komplexen auf. Es wurde in den systematischen Analysen, die für die Datenbank ausgewertet wurden jedoch nie direkt gereinigt. Es wird mit folgenden Proteinen als Anker kogereinigt: Utp22p, Enp1p, Krr1p und Pwp2p. Der Komplex Utp22p ist ein Komplex der Gruppe 4, d.h. ein sehr früher 40S, möglicherweise ein 90S-Komplex. Enp1p, Krr1p und Pwp2 sind jeweils Komplexe der Gruppe 5, also deutliche Komplexe des 40S-Biogeneseweges, in denen keine Marker des 60S-Wegs gefunden werden. Folgende Faktoren werden in allen Komplexen mit Noc4p kogereinigt: Kre33p, Utp20p, Nop1p, Enp1p, Dhr1p, Emg1p, Imp3p, Utp7p, Mpp10p, Nop14p, Utp6p. Viele weitere Faktoren tauchen nur in drei oder weniger der vier Komplexe auf. Diese Komponenten überwiegen wiederum in Komplexen der Gruppe 5. Noc4p taucht

nicht in späten 40S-Komplexen auf. Dies wären entsprechend ihrer Zusammensetzung präribosomale 40S-Komplexe kurz vor oder kurz nach dem Transport durch die Kernpore.

Das Protein Nop14p wurde insgesamt fünf Mal in diesen Analysen identifiziert und ebenfalls nicht als Anker eingesetzt. Es findet sich als Komponente im Utp22p-Komplex der Gruppe 4 (wie Noc4p) und in den Komplexen der Gruppe 5: Enp1p, Krr1p, Pwp2p und Nop5p. Man erkennt hier bereits die Überschneidung zu Noc4p, da beide Proteine in denselben Komplexen gefunden wurden. Nop14p wurde noch in einem weiteren Komplex aufgereinigt. Folglich taucht Nop14p nicht zu 100% mit Noc4p auf (wie umgekehrt), sondern nur in vier der fünf Komplexe (80%). Es gibt aber Überschneidungen mit kogereinigten Proteinen, die in allen Fällen mit Nop14p kogereinigt werden, die auch in allen Noc4p-enthaltenden Komplexen vorhanden sind. Dies sind: Nop1p, Dhr1p, Imp3p, Utp7p, Mpp10p und Utp6p. Ebenso wie Noc4p wurde auch Nop14p nie in späten Komplexen des 40S-Biogenesewegs aufgereinigt. Die große Parallelität zwischen beiden Proteinen wird hierdurch verdeutlicht.

Mit Hilfe dieser Datenbank (Milkereit et al., 2003a) gelingt es insgesamt, die große Datenmenge der systematischen Analysen gezielt auszuwerten und Informationen über kogereinigte Proteine zu erhalten.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Funktionelle Domänen von Noc4p

Für die Biogenese der ribosomalen 40S-Untereinheit sind die Proteine Noc4p und Nop14p von essentieller Bedeutung. Sie bilden einen heterodimeren Komplex, der auch bei stringenten Reinigungsbedingungen erhalten bleibt (Milkereit et al., 2003b).

In dieser Arbeit wurde versucht, wichtige Interaktionsdomänen von Noc4p zu charakterisieren, indem Deletionskonstrukte von Noc4p *ex vivo* auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Nop14p und RNA untersucht wurden. Es stellte sich hierbei heraus, dass die drei C-terminalen Domänen für eine Interaktion mit Nop14p ausreichend sind. Fehlt eine oder mehrere dieser Domänen, kann Noc4p nicht mehr mit Nop14p interagieren. Die Interaktion von Deletionskonstrukten von Noc4p mit Vorläufer-rRNA und U3 snoRNA korreliert mit der Bindung an Nop14p. Für die N-terminalen Domänen konnten keine spezifischen Funktionen gefunden werden, sie scheinen aber für eine effiziente Interaktion von Noc4p mit rRNA notwendig zu sein. Diese N-terminalen Domänen spielen aber eventuell weitere wichtige Rollen, da ihre Deletion bis auf die erste N-terminale Domäne letal ist. Weitere Funktionen dieser N-terminalen Domänen könnte man beispielsweise mit einer Suche nach Suppressoren herausfinden, indem eine Genbank des Hefegenoms zusammen mit je einem N-terminalen Deletionskonstrukt in Hefe exprimiert wird. Durch eine Überexpression von potentiellen Interaktionspartnern durch die Genbank könnten solche Proteine identifiziert werden, die eine Deletion von Noc4p-Domänen ausgleichen.

Der Bereich der Interaktionsdomänen von Noc4p mit Nop14p umfasst den Bereich der so genannten Noc-Domäne, die auch in den Noc-Proteinen Noc1p und Noc3p gefunden werden. Noc1p und Noc3p werden für die Biogenese der 60S-Untereinheit benötigt. Ein Austausch der Noc-Domäne von Noc4p durch die Noc-Domänen von Noc1p und Noc3p ist nicht möglich. Die zur Noc4p-Noc-Domäne homologe Domäne aus *H. sapiens* ist hingegen in der Lage, die essentielle Funktion der Noc-Domäne in Noc4p zu übernehmen. Durch Aminosäureaustausche in der Sequenz eines Hybridkonstrukt aus Noc4p und Noc1p-Noc-Domäne konnte eine Sequenz erstellt werden, die ebenfalls die essentielle Funktion von der Domäne wiederherstellt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstreichen die Wichtigkeit der Noc-Domäne für die Funktion von Noc4p. Sie ist für die Interaktion mit dem Bindungspartner Nop14p von Bedeutung, allerdings werden hierfür die beiden flankierenden Domänen benötigt.

Möglicherweise bildet dieser Bereich des Proteins eine besondere Struktur aus, deren Vorhandensein für die Funktion von Noc4p von maßgeblicher Bedeutung ist.

Hinweise auf eine mögliche α -helikale Struktur geben CD-Spektren des C-terminalen Bereichs (in etwa die Nop14p-Interaktionsdomänen). In computerbasierten Berechnungen wurden für den Bereich einer erweiterten Noc4p-Noc-Domäne drei α -Helices vorhergesagt, die sich in ihrer Ausbildung gegenseitig beeinflussen könnten (Daten nicht gezeigt, unveröffentlichte Kommunikation mit J. Grötzinger, Kiel). Weitere computerbasierte Strukturvorhersagen für Noc4p legen eine superhelikale Faltung von Noc4p in HEAT-Repeats nahe (Dlakic und Tollervey, 2004), die sich mit den Beobachtungen im CD-Spektrum decken könnten.

Möglicherweise wurden durch den gezielten Austausch von Aminosäuren in der Sequenz des Hybridkonstruktes von Noc4p und Noc1p-Noc-Domäne solche für die Ausbildung der Struktur wichtigen Aminosäuren ausgetauscht.

Eine Strukturaufklärung von Noc4p mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder NMR würde an dieser Stelle weiterhelfen, um die Richtigkeit der Vermutungen zu überprüfen. Dadurch könnten auch die bisher nur aufgrund von Computermodellen postulierten HEAT-Repeats bestätigt werden. Es wäre dadurch ebenfalls möglich, die Bedeutung der Aminosäureaustausche besser nachzuvollziehen.

4.2 Die Interaktion von Noc4p mit RNA

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass die Interaktion von Noc4p mit der RNA (sowohl Vorläufer-rRNA, als auch U3 snoRNA) mit der Bindung an Nop14p zu korrelieren scheint. Dies führte zu der Annahme, dass Noc4p alleine *ex vivo* nicht in der Lage ist, RNA zu binden, sondern dies wahrscheinlich im Komplex mit Nop14p geschieht. Diese Annahme wurde durch Depletionsexperimente von Nop14p und anschließender Immunpräzipitation von Noc4p überprüft. Auch hier scheint sich die Hypothese zu bestätigen, da durch die Depletion der von Nop14p die Interaktion von Noc4p mit der rRNA deutlich beeinflusst wird. Umgekehrt wurde kein solcher Einfluss beobachtet. Um diesen Befund auf eine andere experimentelle Weise abzusichern, wurden Immunpräzipitationen mit den temperatursensitiven Proteinen Nop14-2p und Noc4-8p nach Inkubation der Zellen bei 37°C gemacht. Hier zeigte sich, dass die Interaktion von Nop14-2p mit rRNA weniger beeinflusst wird, als im vergleichbaren Experiment mit Noc4-8p. Nop14-2p kopräzipitiert auch unter diesen Bedingungen weiterhin Nop4p, wohingegen das bei Noc4-8p und Nop14p nicht mehr der Fall zu sein scheint. Das Expressionsniveau von Nop14p ist zwar deutlich reduziert,

trotzdem war keine Anreicherung von Nop14p nachweisbar. Dies macht wiederum deutlich, dass die Interaktion von Noc4p mit RNA von einer Bindung an Nop14p abzuhängen scheint. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Verlust der Interaktion von Noc4p zu Nop14p könnte der Lokalisationsphänotyp von Noc4-8p sein. Bereits nach einer kurzen Inkubation von Zellen mit dem Allel *noc4-8* bei 37°C ist keine nukleoläre Akkumulation von Noc4-8p zu beobachten, sondern eine zytoplasmatische Verteilung. Somit ist Noc4-8p vermutlich nicht mehr in der Lage, einen Komplex mit Nop14p einzugehen.

Für die Interaktion von Noc4p mit RNA gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Falls Noc4p direkt mit RNA interagiert, muss gemäß der vorgelegten Daten im Komplex mit Nop14p vorliegen. Andernfalls wäre auch denkbar, dass Noc4p gar nicht selber mit RNA interagiert, sondern dies nur indirekt über Nop14p (und möglicherweise weitere Proteine) geschieht. Um eine dieser beiden Hypothesen zu bestätigen, könnte man *in vitro* Bindungsstudien mit rekombinantem Noc4p und Nop14p sowie RNA durchführen. Hierdurch könnte geklärt werden, ob Noc4p in der Lage ist, RNA zu binden. Für Noc4p alleine wäre keine Bindung an RNA zu erwarten, weil dies ja gemäß den vorgestellten Daten nur im Komplex mit Nop14p effizient möglich ist.

4.3 Der Noc4p-Nop14p-Komplex im SSU-Prozessom

Aus den Ergebnissen der Notwendigkeit eines Komplexes von Noc4p mit Nop14p für eine RNA-Interaktion resultiert ein interessanter Aspekt bezüglich der Funktion von Noc4p im SSU-Prozessom. Das SSU-Prozessom wird als ein multiheteromerer Komplex beschrieben, der bereits kotranskriptionell an die naszierende rRNA bindet und diese an den Stellen A₀, A₁ und A₂ im Nukleolus prozessiert, was die Bildung von 20S-rRNA zur Folge hat (siehe Einleitung 1.2.1 und 1.2.4). Die Komponenten des SSU-Prozessoms werden charakterisiert durch die Kopräzipitation von Mpp10p, Nop58p und U3 snoRNA (Dragon et al., 2002). Das heißt, dass die Komponenten mit der rRNA und U3 snoRNA interagieren müssen. Auch Noc4p wurde als Komponente des SSU-Prozessoms beschrieben (Bernstein et al., 2004), ebenso wie Nop14p (Dragon et al., 2002).

Da ja Noc4p möglicherweise nur im Komplex mit Nop14p an RNA bindet, wäre es also denkbar, dass es durch die Interaktion mit Nop14p zum SSU-Prozessom rekrutiert wird. Eine solche Rekrutierung eines Faktors zum SSU-Prozessom ist bereits in der Literatur beschrieben (Wehner et al., 2002). Hier wurde eine gegenseitige Abhängigkeit der Proteine Imp3p, Imp4p und Mpp10p hinsichtlich ihrer Stabilität und der Interaktion mit U3 snoRNA

beobachtet. Während Imp3p für die Interaktion von Mpp10p und Imp4p mit U3 snoRNA benötigt wird, stabilisiert Mpp10p den Imp3p-Imp4p-Komplex.

Die Funktion, die der Noc4p-Nop14p-Komplex im SSU-Prozessom ausüben könnte, ist unklar. Nach Depletion oder Inaktivierung dieser beiden Faktoren werden Prozessierungsdefekte an den Stellen A₀, A₁ und A₂ beobachtet, wie dies für weitere SSU-Prozessom-Komponenten ebenfalls der Fall ist. Allerdings ist generell nicht klar, wie das SSU-Prozessom diese Prozessierungen beeinflusst. Es wird angenommen, dass die Prozessierungen an den Stellen A₀, A₁ und A₂ durch Endonukleasen durchgeführt werden (Venema und Tollervey, 1999). In den Aufreinigungen von 90S/SSU-Prozessom-Patrikeln wurden bisher jedoch weder bekannte Endo- und Exonukleasen (Rnt1p, RNase MRP, Exosome), noch Proteine gefunden, die Ähnlichkeiten zu ihnen besitzen (siehe hierzu auch die Datenbank präribosomaler Biogenesefaktoren). Möglicherweise liegt dies aber an einer schwachen oder zeitlich sehr begrenzten Interaktion mit den präribosomalen Komplexen, weshalb sie in diesen Analysen nicht identifiziert wurden.

In einer Hypothese, die aus dem Fehlen der Endo- und Exonukleasen resultierte, wurde nun vermutet, dass die Prozessierungsschritte A₀, A₁ und A₂ durch Ribozymstrukturen der Prä-rRNA durchgeführt werden. Diese Strukturen sollen sich entweder durch intramolekulare Wechselwirkungen der rRNA bilden, oder durch snoRNA-prä-rRNA-Duplexe (Granneman und Baserga, 2004). In diesem Zusammenhang wäre dann das 90S/SSU-Prozessom ein großes RNA-Chaperon, das als Faltungshelfer für die RNA fungiert. Hierbei wäre denkbar, dass das Fehlen des Noc4p-Nop14p-Komplexes zur Folge hat, dass diese Chaperonfunktion nicht mehr vollständig möglich wäre und daher die Prozessierungsdefekte beobachtet werden. Verglichen mit anderen Utps des SSU-Prozessoms stellen Noc4p und Nop14p eher eine Ausnahme dar. Auch wenn generell die Depletion von SSU-Prozessom-Komponenten 18S-rRNA-Reduktion im Zytosol zur Folge hat, so sind die Komponenten des SSU-Prozessoms doch eine heterogene Population an Biogenesefaktoren, da sich die Depletionsphänotypen in Bezug auf Vorläufer-rRNA voneinander unterscheiden. Ein Großteil der Utps zeigt nach Depletion eine deutliche Reduktion von 20S-rRNA. Teilweise wird bei einigen eine Akkumulation von 23S beobachtet, manche akkumulieren auch etwas 35S. Die Komponenten einer Subpopulation der Utps – die als t-Utps bezeichneten Proteine Utp4p, Utp5p Utp8p, Utp9p, Utp10p, Utp15p und Utp17p - können sogar als Transkriptionsfaktoren betrachtet werden, da ihre Depletion zu einem nahezu vollständigen Transkriptionsblock führt (Gallagher et al., 2004).

Aus diesen beiden Gruppen von Utps fallen Noc4p und Nop14p heraus, denn nach ihrer Depletion ist 20S noch nachweisbar. Diese ist zwar deutlich reduziert, aber verglichen mit den anderen Utps noch zu sehen (vgl. Abb. 13 dieser Arbeit mit Gallagher et al., 2004 und Bernstein et al., 2004). Die Bildung von 20S-rRNA bei Depletion von Noc4p und Nop14p liegt entweder an einer unvollständigen Depletion, oder die Depletion der beiden Faktoren führt nur zu einer verzögerten Prozessierung an A₀, A₁ und A₂. Oder Noc4p und Nop14p nehmen eine Sonderrolle im 90S/SSU-Prozessom ein.

Eine Bestätigung dieser Sonderrolle könnte durch die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Arbeit geliefert werden. Hier wurde der Versuch unternommen, die wechselseitigen Beziehungen der 90S-Komponenten durch die Kombination von biochemischen, Analysen mit bioinformatischen Studien zu untersuchen, um ein vollständiges Bild des 90S-Komplexes zu erhalten (Perez-Fernandez et al., 2007). Es gelang, im 90S-Partikel bestimmte Untereinheiten und deren Hierarchie in der Assemblierung an der 35S-rRNA zu charakterisieren. Als ein Ergebnis bezogen auf Noc4p und Nop14p zeigte sich, dass diese beiden Proteine keinem der gefundenen 90S-Module zugeordnet werden können. Sie scheinen unabhängig von diesen zusammen mit einigen anderen Proteinen an den 90S-Partikel zu assemblieren. Hieraus kann eine Sonderrolle im Vergleich zu den übrigen Utps abgeleitet werden. Zwar wird der Noc4p-Nop14p-Komplex assoziiert an 90S-Partikel gefunden, aber möglicherweise hat dieser Subkomplex innerhalb des SSU-Prozessoms eine andere Funktion inne. Dies wird im Folgenden diskutiert.

4.4 Die Funktion von Noc4p im Kernexport von Prä-40S-Untereinheiten

Der nukleäre Export der beiden ribosomalen Untereinheiten wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Ein Problem bei der Aufklärung dieses Prozesses liegt in der engen Verknüpfung der Prozessierung der rRNA mit dem Exportprozess. Aufgrund der Überlappung der für beide Prozesse benötigten Biogenesefaktoren kann die Mutation eines Prozessierungsfaktors auch den Kernexport der Untereinheiten beeinträchtigen und umgekehrt. Dies macht es generell schwierig zu unterscheiden, ob ein Faktor Funktionen im Kernexportprozess wahrnimmt, oder ob er nur dazu beiträgt, dass die Vorläufer der ribosomalen Untereinheiten exportkompetent gemacht werden. Für den Kernexport werden neben der Crm1p-abhängigen Exportmaschinerie auch Exportadapter benötigt, die sowohl an präribosomale Untereinheiten binden, als auch mit Crm1p interagieren und für den Kernexport der präribosomalen Untereinheiten essentiell sind.

Bisherige Analysen von Noc4p gabern bereits erste Hinweise auf eine Funktion von Noc4p im Kernexport der Prä-40S-Untereinheiten (Milkereit et al., 2003b). Diese wurden mit Hilfe eines indirekten Assays gewonnen, indem die Lokalisierung eines Reporterkonstrukts (Rps2p-GFP) in temperatursensitiven Mutanten von Noc4p untersucht wurde. Es wurde beobachtet, dass in den temperatursensitiven Mutanten *noc4-1p* und *noc4-2p* das Reporterkonstrukt Rps2p-GFP nach 5h Inkubation auf 37°C kein ausgeprägtes zytoplasmatisches Signal mehr aufweist, sondern eine nukleäre Akkumulation zeigt. Temperatursensitive Allele von NOC1, NOC2 und NOC3 hingegen zeigten keine veränderte Lokalisation von Rps2-GFP nach 5h Inkubation bei 37°C. Hieraus wurde für Noc4p eine Funktion im Kernexport der Prä-40S-Untereinheit abgeleitet. In anderen Experimenten derselben Publikation konnte zudem gezeigt werden, dass die Produktion von 20S -rRNA bei Verwendung des temperatursensitiven Allels *noc4-1* bereits nach einer 4-stündigen Inkubation auf 37°C auf ca. 20% abfällt. Auf Basis dieser Ergebnisse kann die Frage gestellt werden, ob die nukleäre Akkumulation von Rps2p-GFP tatsächlich ein präribosomales Partikel repräsentiert, das aufgrund einer Fehlfunktion von Noc4-8p im Nukleus zurückgehalten wird.

Mit Hilfe des von Dr. P. Milkereit entwickelten Assays der Zellfraktionierung nach radioaktiver Pulsmarkierung neu transkribierter RNA (Leger-Silvestre et al., 2004) war es in der vorgelegten Arbeit nun möglich, genauere Aussagen über die Funktion von Noc4p im Kernexport der Prä-40S-Untereinheiten zu treffen. Es zeigte sich, dass bei Verwendung des temperatursensitiven Allels *noc4-8* kein Kernexport von 20S-rRNA ins Zytosol mehr stattfindet und daher keine reife 18S in der Zelle mehr hergestellt werden kann, da die Konversion von 20S- zu 18S-rRNA im Zytosol stattfindet. 20S-Prä-rRNA akkumuliert stattdessen im Nukleus und wird nicht mehr exportiert. Es handelt sich hierbei um eine Blockierung des Kernexports von Prä-40S-Partikeln, wie er auch bei Verwendung der Leptomycin B-sensitiven Mutante *crm1T539C* nach Behandlung mit LMB beobachtet wurde (Leger-Silvestre et al., 2004). Die Inhibition von *crm1p* durch LMB hat allerdings auch die Blockierung des Kernexports der Prä-60S-Untereinheiten zur Folge, was im Fall von *noc4-8* nicht beobachtet wurde.

Der Vorteil dieses Versuchsansatzes gegenüber dem des Reporterkonstrukts liegt zum einen in den sehr kurzen Inkubationszeiten. So kann die Fraktionierungsanalyse der temperatursensitiven Mutante mit Pulsmarkierung nach nur 15 min Inkubation auf 37°C durchgeführt werden. Andererseits können die unmittelbaren Auswirkungen auf die neu transkribierte rRNA beobachtet werden, indem der Prozessierungsstatus und der Zustand des Kernexports der Prä-rRNA mittels *Northern-Blot* untersucht werden kann. Dies sind klare

Vorteile gegenüber der über 5-stündigen Inkubation des indirekten Reporterassays, bei dem die Auswirkungen auf die zellulären Prozesse durch die gestörte Ribosomenbiogenese in dieser langen Zeitperiode nicht überschaubar sind.

Mit Hilfe dieses Assays ist es also möglich zu zeigen, dass die Prozessierung 35S-Prä-rRNA bis zur Bildung von 20S-rRNA im Stamm *noc4-8* immer noch funktioniert, diese dann aber nicht mehr ins Zytoplasma gelangt. Der Biogenesedefekt, der durch die temperatursensitive Mutation von Noc4-8p hervorgerufen wird, ist also nicht primär in einer defekten Prozessierung zu suchen, sondern tatsächlich im mangelnden Kernexport der 20S-rRNA ins Zytoplasma. Durch diese Ergebnisse kann also ausgesagt werden, dass Noc4p eine eindeutige Funktion im Kernexport der Prä-40S-Untereinheit hat.

In dieser Arbeit wurden in genetischen Analysen mittels synthetischer Letalität außerdem ein genetischer Zusammenhang zwischen NOC4 und CRM1 gefunden. Dies gibt Hinweise auf eine mögliche physikalische Interaktion der beiden Proteine. Das kann aber allein auf Grundlage dieser Versuche nicht eindeutig geklärt werden, da sowohl Crm1p als auch Noc4p in den Prozess des Kernexports von Prä-40S-Untereinheiten involviert sind und daher auch deshalb eine synthetische Letalität zeigen könnten, ohne eine direkte physikalische Interaktion. Diesen Hinweisen müsste weiter nachgegangen werden, beispielsweise indem beide Proteine rekombinant exprimiert würden und versucht würde, eine physikalische Interaktion *in vitro* nachzuweisen.

Eine direkte Interaktion von Noc4p mit dem Exportin Crm1p ist aus folgendem Grund nicht unwahrscheinlich: Jedes Protein, das mit Hilfe der Exportmaschinerie aktiv aus dem Kern transportiert wird besitzt eine Exportsequenz, an die das Exportin bindet. Im Falle von Noc4p konnte computergestützt eine solche Sequenz vorhergesagt werden, die mit einiger Wahrscheinlichkeit eine solche ist. Diese NES liegt im Bereich der Domäne 6. Man könnte diese Domäne nun an ein Reporterkonstrukt fusionieren, das neben GFP eine NLS (nukleäre Importsequenz) enthält. So könnte man in Hefezellen die Lokalisation dieses Konstrukts beobachten und sie vergleichen mit einem Konstrukt, das eine bekannte NES eines Proteins (z.B. PKI) enthält, das Crm1p-abhängig exportiert wird. Das Kontrollkonstrukt weist trotz der NLS eine zytoplasmatische Lokalisierung auf, da der Export sehr effizient funktioniert (Neville und Rosbash, 1999; Taura et al., 1997). Wäre die putative Sequenz in Domäne 6 tatsächlich eine NES würde das Reporterkonstrukt eine ähnliche Lokalisation aufweisen müssen.

Ebenfalls interessant wären Bindungsstudien von Noc4p und Kernporenproteinen, insbesondere solche, die die in der Einleitung beschriebenen FG-Repeats aufweisen. Da für

Noc4p mit Hilfe von Computerberechnungen HEAT-Repeats vorgeschlagen wurden, ist es möglich, dass Noc4p im Zuge des Kernexports der prä-40S-Untereinheit mit den Kernporenproteinen direkt interagiert.

Könnte gezeigt werden, dass Noc4p physikalisch mit der Exportmaschinerie interagiert, käme es als ein potentieller Exportadapter in Frage, der eine wichtige Rolle im nukleären Export von prä-40S-Untereinheiten spielen würde. Als Exportadapter würde Noc4p die Verbindung zwischen der Prä-40S-Untereinheit und der Exportmaschinerie herstellen. Ein Beispiel eines solchen Adapters für die Prä-60S-Untereinheit wäre Nmd3p. Im Bereich des Prä-40S-Kernexports sind bisher keine Adapter vergleichbar zu Nmd3p gefunden worden (siehe Einleitung). Jedoch wurden einige Faktoren in dieser Hinsicht diskutiert (Leger-Silvestre et al., 2004; Oeffinger et al., 2004; Seiser et al., 2006).

Bisher beschriebene Exportfaktoren wie Nmd3p und Ltv1p wurden als so genannte *Shuttle*-Proteine beschrieben, die bedingt durch ihre Aufgabe im Kernexport der ribosomalen Untereinheiten zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln. Diese Faktoren begleiten ihr Frachtgut durch die Pore, dissoziieren im Zytoplasma ab und kehren in den Nukleus zurück, wo sie erneut an Frachtgut binden können. Noc4p ist allerdings in der Wildtypsituation nicht im Zytoplasma, sondern hauptsächlich nukleolär lokalisiert. Es wäre aufgrund der hier gezeigten Daten trotzdem denkbar, dass Noc4p ebenfalls ein *Shuttle*-Protein ist, da das mutante Protein Noc4-8p bei 37°C im Zytoplasma nachweisbar ist.

Für eine Klärung der Frage, ob Noc4p auch in der Wildtypsituation zwischen Kern und Zytoplasma pendelt würden sich Experimente mit einem Heterokaryon-Assay anbieten. Hintergrund dieses Assays ist, dass man zwei Hefezellen miteinander fusioniert. Die eine Zelle hat eine Mutation in einem Gen, das die Fusion der Kerne miteinander bewirkt. So bleiben trotz des Matings zwei Kerne in der fusionierten Zelle erhalten. Die andere Zelle bringt ein mit dem GFP-Epitop fusioniertes Allel von Noc4p mit, das normalerweise im Nukleolus der Ausgangszelle zu finden ist. Wenn man nun diese Zellen fusioniert und es sich tatsächlich bei Noc4p um ein *Shuttle*-Protein handeln sollte, dann wird das Fluoreszenzsignal nach kurzer Zeit auch in dem zweiten Nukleolus zu finden sein, da es durch das Zytoplasma auch zu dem anderen Kern gelangen und dort importiert werden müsste. Die erfolgreiche Anwendung dieses Assays bei anderen Biogenesefaktoren ist bereits in der Literatur beschrieben (Hung und Johnson, 2006; Oeffinger et al., 2004; Thomson und Tollervey, 2005).

4.5 Wird Noc4p für die Assemblierung ribosomaler Proteine benötigt?

Der korrekte Zusammenbau eines Ribosoms aus rRNA und den r-Proteinen ist die Grundlage für die spätere fehlerfreie Funktion des Ribosoms. Die Assemblierung der r-Proteine im präribosomalen Partikel und dadurch die Prozessierung der rRNA stellt die Voraussetzung für den Export des reifenden Partikels ins Zytoplasma dar (Ferreira-Cerca et al., 2005). Die Depletion ribosomaler Proteine *in vivo* blockiert die Biosynthese sehr spezifisch an unterschiedlichen Stellen, je nach depletiertem r-Protein. Das deutet auf eine direkte Rolle der r-Proteine in bestimmten Schritten der Prozessierung hin und spricht gegen einen generellen Effekt in der Biogenese, sobald eines der ribosomalen Proteine fehlt. In diesen Depletionsexperimenten können ähnliche Phänotypen beobachtet werden, wie die bereits durch Depletionen vieler Biogenesefaktoren in der Literatur beschriebenen. Dies kann darauf hindeuten, dass die Biogenesefaktoren als Plattform für die Wirkungsweise der ribosomalen Proteine in der Reifung des Präribosoms benötigt werden. Fehlen sie, können in Folge die ribosomalen Proteine möglicherweise nicht korrekt in das Ribosom eingebaut werden und dort ihre Aufgabe am Vorläufer nicht korrekt ausführen.

Wenn man den Phänotyp einer Noc4p-Inaktivierung mit den Phänotypen von Depletionen ribosomaler Proteine vergleicht (Ferreira-Cerca et al., 2005), dann erkennt man, dass es in einem Fall deutliche Ähnlichkeiten gibt. Das r-Protein Rps5p weist in seinem Depletions-Phänotyp – wie im Fall von Noc4p – eine Reduktion des *steady-state* Niveaus von 20S-rRNA auf bei gleichzeitiger Akkumulation von 23S- und 35S-rRNA. Der nukleo-zytoplasmatische Transport neu synthetisierter, radioaktiv markierter rRNA nach Rps5p-Depletion wurde ebenfalls in Fraktionierungsanalysen von Hefezellen untersucht. Hierbei wurde wiederum eine Akkumulation von 20S-rRNA im Nukleus beobachtet, mit einer vollständigen Exportblockierung von 20S-rRNA im Nukleus. Aus diesen Daten wurde der Schluss gezogen, dass Rps5p entweder an Vorgängen am 40S-Präribosom beteiligt ist, die dieses exportkompetent macht. Oder das Protein ist in eine Art Qualitätskontrolle involviert, die benötigt wird, damit ein positives Signal für den Kernexport gegeben wird. Diese Qualitätskontrolle findet vermutlich an 20S-rRNA-enthaltenden Partikeln statt, weil 20S-rRNA weiterhin auf niedrigem Niveau produziert wird. Es wurde daher vorgeschlagen, dass in den Fällen mit vollständiger 20S-rRNA-Exportblockierung (hierunter fallen weitere r-Proteine, die allerdings andere Phänotypen wie Noc4p-Inaktivierung haben) das heranreifende Partikel nicht mehr mit der Exportmaschinerie kooperieren kann, was den Abbau des im Kern blockierten Partikels zur Folge hat.

Da sich der Phänotyp einer Noc4p-Inaktivierung und der einer Rps5p-Depletion ziemlich gleichen, könnte man nun spekulieren, dass Noc4p als ein Assemblierungsfaktor für Rps5p, wirken könnte. Durch eine Inaktivierung von Noc4p könnte das Protein möglicherweise nicht mehr korrekt in das reifende Partikel eingebaut werden, was die beobachteten Auswirkungen zur Folge hat. Es wäre also denkbar, dass die Prozessierungsschritte A₀, A₁ und A₂ von der korrekten Assemblierung ribosomaler Proteine beeinflusst werden, die durch die Aktivität des SSU-Prozessoms in den 40S-Vorläufer eingebaut werden. Eine Blockierung dieser wichtigen Assemblierungsschritte resultiert im Pulseexperiment zunächst in einer Akkumulation von nukleärer 20S prä-rRNA, da ein weiterer Zusammenbau des Präribosoms nun nicht mehr möglich ist. Langfristig gesehen führt dies in der *steady-state* Analyse der rRNA zu einer 20S-rRNA-Reduktion, weil sich das reifende Partikel durch die fehlende Assemblierung in einer Sackgasse befindet, die dann die Degradation der reifenden Untereinheit zur Folge hat. Dies wäre mit anderen Biogenesefaktoren nicht der Fall, die weiterhin 20S-rRNA produzieren, aber bei denen spätere Schritte blockiert sind, bzw. deren Fehlen oder Inaktivierung zu einer Verzögerung im Kernexport der ribosomalen Untereinheit führt.

Aus Studien in *E. coli* war eine hierarchisch strukturierte Assemblierung der r-Proteine bereits bekannt, daher wurde versucht, ein ähnliches Modell der Hierarchie für Eukaryonten abzuleiten (Ferreira-Cerca et al., 2007, zur Veröffentlichung eingereicht). Es konnte beobachtet werden, dass homologe Proteine zu den als *primary binder* bezeichneten Proteinen in *E. coli* ebenfalls zuerst an die rRNA binden, damit die Bindung weiterer r-Proteine ermöglichen und so die Ausbildung ganzer Bereiche des Ribosoms beeinflussen. Dies wiederum hat Auswirkungen auf die Prozessierung und den Transport des präribosomalen Partikels. Als ein weiteres Beispiel für den Zusammenhang zwischen Strukturelementen am Ribosom und der Assemblierung ribosomaler Proteine können die Beobachtungen angeführt werden, die im Labor Hurt gemacht wurden (Schafer et al., 2006). Hier wird beschrieben, wie die Kinase Hrr25p die Assemblierung von Rps3p im Prä-40S-Partikel beeinflusst und die Auswirkungen dieser Assemblierung auf die Ausbildung der *beak*-ähnlichen Struktur.

Ähnlich wie die in Prokaryonten beschriebenen Hierarchieverhältnisse beim Einbau der ribosomalen Proteine wäre es denkbar, dass in Eukaryonten der Einbau ribosomaler Proteine vom Vorhandensein bestimmter Biogenesefaktoren abhängt.

Um die Hypothese zu testen, dass Noc4p als Assemblierungsfaktor in der Ribosomenbiogenese wirkt, könnte man beispielsweise mit dem temperatursensitiven Allel *noc4-8* arbeiten, das bereits nach kurzer Zeit (15 min) der Inkubation bei 37°C bereits einen Phänotyp im Kernexport von 20S-rRNA aufweist. Man könnte nun in diesem Stamm nach

einer Inkubation auf 37°C ein ribosomales Protein der kleinen Untereinheit mittels Immunpräzipitation anreichern und überprüfen, ob es mit Vorläufer-rRNA assoziiert vorliegt. Dies lässt dann Rückschlüsse darauf zu, ob Noc4p einen Einfluss auf die Assemblierung des ribosomalen Proteins in das reifende Partikel ausübt oder nicht.

4.6 Noc4p im Netzwerk präribosomaler Biogenesefaktoren

Die Ribosomenbiogenese beginnt mit der Transkription der rRNA im Nukleolus. Die ersten Biogenesefaktoren binden bereits kotranskriptionell an die nascierende RNA und führen fröhe Prozessierungsschritte durch (siehe hierzu Einleitung). Im Zuge der Reifung der Untereinheiten binden weitere Biogenesefaktoren an den Vorläufer, andere verlassen das reifende Partikel wieder. Die reifenden Untereinheiten werden vom Nukleolus über den Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Im Falle der prä-40S-Untereinheit folgt als ein später Schritt der Kernexport des Partikels ins Zytoplasma und dort als letzter Schritt der Reifung die Konvertierung von 20S- in 18S-rRNA durch die Prozessierung an der Stelle D.

Zu den Ergebnissen dieser Arbeit zählt eine Datenbank präribosomaler Biogenesefaktoren, die über das Internet abgefragt werden kann. Diese Datenbank ermöglicht die gezielte Auswertung von Komplexen, die für die Ribosomenbiogenese von Bedeutung sind. Die Datenbank wurde aus den Ergebnissen von systematisch angelegten, genomweiten Analysen von Protein-Protein-Interaktionen erstellt und stellt eine statistische Auswertung der kogereinigten Proteine dar. Zudem werden die Komplexe in ein grobes zeitliches Raster geordnet entsprechend dem Reifungszustand der Präpartikel.

Mit Hilfe der Datenbank können nun gezielte Abfragen durchgeführt werden. Die experimentellen Befunde legen nahe, dass Noc4p durch seine Funktion als UTP bereits im 90S-Präpartikel enthalten ist. Eine Suche von Noc4p in der Datenbank bestätigt dies: Noc4p wird in vier Komplexen gefunden. Einmal im Utp22p-Komplex, einem Komplex der Gruppe 4 und dreimal in Komplexen der Gruppe 5, also Komplexen des SSU-Prozessoms. Diese Noc4p-enthaltenden Komplexe der Gruppe 5 sind Enp1, Krr1p und Pwp2p. Interessant ist, dass Noc4p also nicht in späten Komplexen gefunden wurde, obwohl die hier vorgelegten Daten für Noc4p eine Funktion im späten Kernexport aufzeigen.

Die Funktionen der Datenbank ermöglichen es nun, eine Suche nach Biogenesefaktoren durchzuführen, die sich wie Noc4p verhalten, also bereits früh an das 90S-Partikel zu binden und den reifenden 40S-Vorläufer bis kurz vor oder auch während dem Transport ins Zytoplasma zu begleiten. Dazu wurde nach Faktoren gesucht, die in frühen, prä-40S und

späten 40S Schritten benötigt werden, aber nicht mit frühen 60S-Schritten zusammenhängen. Hier finden sich Enp1p, Nob1p und Dim2p.

Das Protein Nob1p ist als ein Biogenesefaktor in der Literatur beschrieben (Fatica et al., 2003; Fatica et al., 2004), allerdings ist der beschriebene Phänotyp der rRNA-Prozessierung anders, als für Noc4p beobachtet. So führt eine Depletion von Nob1p zu einer Akkumulation von 20S, es akkumulieren aber sonst keine Vorläufer-rRNAs. Dies spricht dafür, dass Nob1p für späte Schritte in der Prozessierung benötigt wird, bei denen die Prozessierung der rRNA soweit fortgeschritten ist, dass ein mehr oder weniger stabiles Intermediat auftritt, der einen verzögerten Kernexport der prä-40S-Untereinheit zur Folge hat. Dies ist ein anderer Phänotyp, als der für Noc4p beschriebene, bei dem die *steady-state* Niveaus an 20S-rRNA im Depletionsexperiment deutlich reduziert werden, was für eine Degradation der unfertigen Untereinheit spricht.

Dim2p ist ein Protein, das als *Shuttle*-Protein beschrieben ist und als solches zwischen Zytoplasma und Nukleus pendelt. Dim2p bildet einen Komplex mit Dim1p und wird für die spezielle Dimethylierung der zytoplasmatischen 20S-Prä-rRNA benötigt (siehe Einleitung). Inaktivierung von Dim2p führt zu einem starken Prä-rRNA-Prozessierungsdefekt an den Stellen A₁ und A₂, der zu einem Verlust von 20S- und 27SA₂-Prä-rRNAs führt. Daraus resultiert ebenfalls ein Verlust von reifer 18S-rRNA im Zytoplasma (Vanrobays et al., 2004). Obwohl hier eine 20S-Reduktion wie bei Noc4p beobachtet wird, liegt der Prozessierungsdefekt konkret an A₂, was für Noc4p in dieser Form nicht beobachtet wurde, da keine 27SA₂-Spezies akkumuliert.

Enp1p ist ein Faktor, der sowohl in 90S-Partikeln zusammen mit ca. 30 nicht-ribosomalen Prozessierungs- und Assemblierungsfaktoren gefunden wird, als auch in späteren prä-40S-Partikeln, der wesentlich weniger nicht-ribosomale Faktoren, dafür aber mehr ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit enthält (Schafer et al., 2003). Wenngleich in einigen der aufgereinigten Enp1p-Komplexe kein Noc4p identifiziert werden konnte (Grandi et al., 2002; Schafer et al., 2003), so wurde es dennoch in anderen Publikationen im Komplex mit Enp1p gefunden (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002; Leger-Silvestre et al., 2004). RNA-Immunpräzipitationen von epitopmarkiertem Enp1p (Enp1p-TAP) zeigen, dass Enp1p-TAP dieselben Prä-RNA-Spezies präzipitiert, wie Noc4p-TAP (Chen et al., 2003; Leger-Silvestre et al., 2005). RNA-Analysen mit der temperatursensitiven Mutante enp1-1 (Chen et al., 2003) zeigen einen Phänotyp ähnlich zu temperatursensitiven Mutanten von Noc4p, allerdings akkumuliert bei enp1-1 21S. Die Analysen machen deutlich, dass Enp1p für die endonukleolytischen Schnitte der prä-rRNA an den Stellen A₀, A₁ und A₂ benötigt wird. Die

Akkumulation von 21S lässt vermuten, dass der Schnitt bei A₂ nicht mehr effizient durchgeführt wird. Eine Depletion von Enp1p führt zu einem vergleichbaren Phänotyp, wie die temperatursensitive Mutante *enp1-1* mit einer deutlichen 21S-Akkumulation (Bernstein et al., 2004). Bei Beeinträchtigung der Funktion von Enp1p entsteht ein aberantes prä-40S-Partikel, das nicht mehr weiter reifen kann und daher abgebaut wird, was sich in 20S- und 18S-rRNA-Reduktion manifestiert. Dieser Phänotyp der 21S-rRNA-Akkumulation ist nach Depletion von Noc4p nicht zu beobachten, allerdings führt die Depletion in beiden Fällen zu einer 20S-rRNA-Reduktion und in Folge dessen zu einer Abnahme von reifer 18S-rRNA im Zytoplasma.

Am Beispiel von Enp1p kann man jedenfalls erkennen, dass es Biogenesefaktoren zu geben scheint, die bereits früh an das reifende Partikel gelangen (90S) und dieses bis zu den späten Schritten des Exports durch die Kernpore, möglicherweise bis ins Zytoplasma begleiten. Für Noc4p scheint eine solche Rolle jedenfalls nicht ausgeschlossen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Verbrauchsmaterialien:

Filterpapier 3MM	Whatman
Glasperlen 0,75-1mm	Roth
Immobilon TM-PSQ 0,2µm Membran	Millipore
Pasteur-Pipetten Glas 230mm	VWR International
Plastikküvetten 10x45x45mm	Sarstedt
Positive TM Membran	Qbiogen
Sterilfilter 0,22µm	Millipore
Poly-Prep® Chromatography columns	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten (0,2cm)	Bio-Rad
Deckgläschen (Ø 15 mm)	Roth

5.1.2 Geräte:

Phospho-Imager BAS 1000	Fuji
BAS Cassette 2040	Fuji
BAS-III Imaging Plate	Fuji
Fluoreszenz-Image Reader LAS 3000	Fuji
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M	Carl Zeiss
Hybridisierungsröhren	Hybaid, Bachofer, Rettberg
Liquid Scintillation analyser 1600 TR	Packard
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
SDS-Minigelapparatur	peqLAB
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad
Thermomixer compact	Eppendorf
Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell	Bio-Rad
UV/visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences
Vacuum Regulator	Bio-Rad
Vibrax VXR basic	IKA
Zentrifuge Centrikon T-324	Kontron Instruments
Elektroporator Micro Pulser	Bio-Rad
Doucer, 25-75µm clearance	Wheaton

5.1.3 Kits:

BM Chemilumineszenz Blotting Substrate (POD)	Roche
FastPlasmid™ Mini Kit	Eppendorf
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
MicroBiospin® 6 Chromatography columns	Bio-Rad
PureLink™ PCR Purification Kit	Invitrogen
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen

5.1.4 Chemikalien :

5-fluorouracil-6-carboxylic acid (5-FOA)	Toronto Research Products
Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	Merck, Roth, Sigma, Serva, etc.
APS (Ammoniumperoxydisulfat)	Fluka
Ampicillin (Na-Salz)	Roth
Adenin Hemisulfat-Salz	Sigma
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Bacto™ Peptone	BD Biosciences
Bacto™ Tryptone	BD Biosciences
Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences
Benzamidine hydrochloride hydrate	Sigma
Blocking reagent (10x Lösung)	Roche
Bovines Serum-Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma
CDP-Star (25mM) Chemiluminszenz Substrat	Roche
4',6-Diamino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
CSM (complete supplement medium)	Qbiogen, Bio101®Systems
Dig RNA-labeling mix	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Merck
D(+) -Galactose (Gal)	Merck
D(+) -Glucose monohydrate (Glu)	Merck
dNTP-Mix (10mM je Nukleotid)	New Englund BioLabs
Deoxycholic acid sodium salt (DOC)	Serva
Ethidiumbromid 10/mg/ml	Roth
Ficoll® (Typ 400)	Pharmacia
Formaledhyd 37%	Merck
γ ³² P-ATP (10μCi/μl)	Amersham
γ ³² P-ATP (Redivue) (10μCi/μl)	Hartmann Analytik
Glycerol ca. 87%	Merck
Glycogen (10mg/ml)	Ambion
IgG Sepharose® 6 Fast Flow	Amersham Biosciences
Lachssperma DNA (10mg/ml)	Invitrogen
L-Histidine (Monohydrate, Monohydrochloride)	Bio101®Systems
L-Leucine	Sigma
β-Mercaptoethanol (14,3M)	Sigma
Magermilchpulver	Sucofin
Malzextrakt	Fluka
Mannitol	Fluka
MOWIOL® 4-88	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth
Nonidet NP-40 Alternative	Calbiochem
Paraformaldehyde 16%, EM Grade	Electron Microscopy Sciences
peqGold Universal Agarose	peqLAB
Polyethylenglykol PEG3350	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Poly-L-Lysine (0,1% (w/v))	Sigma Diagnostics
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Sigma
Protein G Sepharose® 4 Fast Flow	Pharmacia Biotech
Ribonucleoside Vanadyl Complex (VRC)	New England BioLabs
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Roti®Aqua Phenol	Roth

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 125:24:1	Amersham
Protein Assay (Bradfordreagenz)	Bio-Rad
RNAse Inhibitor RNAsin® (40U/µl)	Promega
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Triton® X-100	Serva
Tween-20	Serva
Uracil	Sigma
5',6' ³ H-Uracil	Amersham
Yeast genomic DNA	Invitrogen
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Sunrise Science Products

5.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
T4 Polynukleotidkinase (10 U/µ)	New England BioLabs
T4 DNA Ligase (400 U/µl)	New England BioLabs
T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	Fermentas
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	New England BioLabs
Zymolyase 100T	Seikagaku
Zymolyase 20T	Seikagaku
Proteinase K	Sigma

5.1.6 Standards :

Prestained Protein-Marker Broad Range	New England BioLabs
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs

5.1.7 Antikörper :

Monoklonaler Noc4-Antikörper (3C2) Ratte	Dr. Kremmer, GSF München
Monoklonaler Noc4-Antikörper (2D12) Ratte	Dr. Kremmer, GSF München
Goat anti-mouse (Peroxidase-konjugiert) IgG+IgM	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-rabbit (Peroxidase-konjugiert) IgG+IgM	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-rat (Peroxidase-konjugiert) IgG+IgM	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 goat anti rat IgG (H+L)	Molecular Probes
Anti-DIG alkalische Phosphatase Konjugat, Fab	Roche
Monoklonaler mouse anti-HA (16B12)	Covance
Monoklonaler rat anti-HA (3F10)	Roche
PAP, rabbit polyclonal	DakoCytomation
Polyclonaer rabbit anti-Protein A	Sigma
Donkey anti-rabbit (Cy TM 3-konjugiert)	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-mouse (Cy TM 5-konjugiert)	Jackson ImmunoResearch
Mouse anti-PGK (Phosphoglycerat-Kinase)	Molecular Probes

5.1.8 Aminosäurestocklösungen und Endkonzentrationen im Medium

	<u>Stocklösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Adenin (Ade)	0,5mg/ml	10mg/L
Leucin (Leu)	5mg/ml	100mg/L
Lysin (Lys)	2,5mg/ml	50mg/L
Tryptophan (Trp)	2,5mg/ml	50mg/L
Histidin (His)	1mg/ml	20mg/L
Threonin (Thr)	6,5mg/ml	130mg/L
Methionin (Met)	5mg/ml	100mg/L

5.1.9 Verwendete synthetische Oligonukleotide:

Klonierung des NOC4-ORF

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| #585: Noc4- <u>Sal1</u> -FP | GGGGGGGTCGACATGGTATTGCTTATATCAGAA |
| #586: Noc4- <u>Not1</u> -RP | TTTTTGCGGCCGCTACCATGCTACCC |

Klonierung des NOP14-ORF

- | | |
|--------------------|-----------------------------|
| #577: Noc5-NcoI-FP | GGGGGGCCATGGATGGCCGGTTCACAA |
| #578: Noc5-SacI-RP | GGGGGGGAGCTCTTATTCTTCCGCCAC |

Mutagenese von NOC4 (Aminosäure-Austausche)

- | | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| #976: SOE_Nt_for | ACACCTGACCAAGTGGCGAACTTGAAA |
| #971: SOE_Ct_rev | TAAGAAATCTCCATGTTATAACTTAGCTT |
| #972: SOE_D460K_rev | TTCCCATAAAGAAGACTTAGAGCATGGCGAAC |
| #973: SOE_L459E_rev | TTCCCATAAAGAAGAGTCTTCAGCATTGGCGAAC |
| #974: SOE_L466I_for | TCTTCTTATGGGAAATCAACAACCTCATCAATCATTAT
CATCCTACTGT |
| #975: SOE_L469F_for | TCTTCTTATGGGAACTCAACAACCTCATCAATCATTAT
CATCCTACTGT |
| #977: SOE_Y473F_for | TCTTCTTATGGGAACTCAACAACCTCATCAATCATTTC
CA
TCCTACTGT |
| #1138: Mut6_SOE_for | CATCCTACTGTGAAGACGTTGGCGAAG |
| #1139: Mut6_SOE_rev | CTTCGCCAACGTCTCACAGTAGGATG |

Chromosomal Integration des TAP-Epitops im NOC4-ORF (Seraphin et al)

- | | |
|-------------------|----------------------------------------|
| #189: Noc4-forTAP | AGCGAAGCGTCATCCCAAGGTAACGTCTACTTGCCTGG |
|-------------------|----------------------------------------|

	GGTAGCATGGTCCATGGAAAAGAGAAG
#190: Noc4-revTAP	TAAATGTATATACACACTTTAAAACCTCGTTGTTCA
	TCTTCGCTTACGACTCACTATAGGG

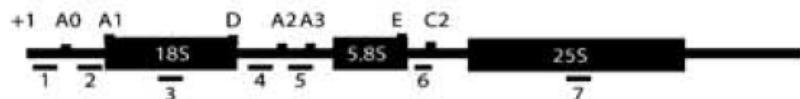
Chromosomal Integration von Epitopmarkierungen am 3'-Ende von NOC4 (Knop et al., 1999)

#269: Noc4-S2	TAAATGTATATACACACTTTAAAACCTCGTTGTTCA
	TCTTCGCTTATCGATGAATTGAGCTCG
#270: Noc4-S3	AGCGAACGCGTCATCCCAAGGTAACGTCTACTGCCTGG
	GGTAGCATGGCGTACGCTGCAGGTCGAC

Digoxigenin -Markierung von Oligonukleotid für ITS1-Detektion:

#441: ITS1 (DIG)	TAATACGACTCACTATAAGGTGTATTGAAACGGTTTAA
	TTGTCC
#378 ITS1 (DIG)	GTTTGCGCAAGAGCATGAGAGC

5.1.10 Sonden (Oligonukleotide für *Northernblots*)



rDNA Wiederholung (modifiziert nach Ferreira-Cerca et al., 2005)

Sonden wurden verwendet, wie in Ferreira-Cerca et al., 2005 beschrieben

ITS1: Digoxigenin markiertes Oligonukleotid; zwischen Stelle D und A2, erkennt 35S, 32S/33S, 23S, 21S/22S und 20S prä-rRNA

ITS2: radioaktiv markiertes Oligonukleotid; zwischen Stelle E und C2, erkennt 35S, 32S/33S und 27S prä-rRNA

5'-GGCCAGCAATTCAAGTTA-3'

18S: radioaktiv markiertes Oligonukleotid, erkennt 18S rRNA
5'-CATGGCTTAATCTTGAGAC-3'

25S: radioaktiv markiertes Oligonukleotid, erkennt 25S rRNA
5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3'

5.1.11 Häufig verwendete Puffer

PBS:	1,37M NaCl 27mM KCl 20mM KH ₂ PO ₄ 10mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
10x TBS	1,36M NaCl 2,7mM KCL 125mM Tris pH 7,4
AE-Puffer	50mM Natrium-Azetat pH 5,3 10mM EDTA
20x SSC (<i>Northernblot</i>)	3M NaCl 0,3M Natrim-Citrat Trihydrat pH 7,0
50x Denhards (<i>Northernblot</i>):	10mg/ml Ficoll (Typ400) 10mg/ml Polyvinylpyrrolidone 10mg/ml BSA (Fraction V)
10x Northern Laufpuffer	20mM Natrium Azetat 0,2M MOPS 10mM EDTA pH 8,0 pH 7,0 mit 2N NaOH einstellen
5x MaBS	0,5M Maleinsäure 0,75M NaCl pH 7,5 mit NaOH (ca. 40g Plättchen)
RNA-Solubilisierungspuffer	50% (v/v) Formamid Bromphenolblau
Transferpuffer (<i>Westernblot</i>)	25mM Tris 190mM Glycin 20% Methanol pH 8,3 mit HCl
Puffer A200 (RNA-IP)	200mM KCl 20mM Tris pH 8,0 5mM MgAc 1mM DTT 1mM PMSF 2mM Benzamidin 0,2% Triton X-100
Puffer PKi pH 7,4 (Immunfluoreszenz)	0,1M KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 7,4 mit 1M K ₂ HPO ₄
Aufschlusspuffer Niedrigsalz:	20% Glycerin

	100mM Tris pH 8,3 5mM β -Mercaptoethanol
Aufschlusspuffer Hochsalz	20% Glycerin 150mM Hepes pH 7,6 10mM MgCl ₂ 400mM NH ₃ SO ₄ 5mM β -Mercaptoethanol

5.1.12 Nährmedien:

YPD	1% Yeast extract 2% Bacto peptone 2% Glukose 2% Agar (für Platten)
YPG	1% Yeast extract 2% Bacto peptone 2% Galaktose 2% Agar (für Platten)
CSM (complete supplement mixture)	6,7g/L YNB (yeast nitrogen base) 2% Kohlenstoffquelle (Zucker) CSM-dropout nach Herstellerangabe Eventuell fehlende Aminosäuren zugeben
LB	1% Bacto Tryptone 0,5% Bacto yeast extract 1% NaCl 2% Agar (für Platten)
LB _{amp}	LB + 100mg/ml Ampicillin

Alle Medien werden 20 min bei 110°C autoklaviert und bei 4°C gelagert

5.2 Methoden

5.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

5.2.1.1 Extraktion von RNA

RNA kann durch Ausschütteln mit Phenol und Chlorform aus einem Gemisch (Gesamtzellextrakt oder ähnliches) extrahiert werden. Hierzu gibt man zu einer Probe (oder auch ganzen Zellen) ad 500 μ l AE-Puffer, 50 μ l 10% SDS und 500 μ l Phenol. Man inkubiert für 5 min unter starkem Schütteln bei 65°C. Nach 1 min Abkühlen auf Eis wird für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Man überführt 3x 150 μ l des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 μ l Phenol. Nach kräftigem Vortexen wird erneut abzentrifugiert (siehe

oben) und 3x 125 μ l in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 μ l Chloroform überführt. Nach kräftigem Vortexen wird erneut abzentrifugiert (siehe oben). Nun überführt man 3x 100 μ l wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß, um die RNA zu fällen. Hierzu gibt man 2,5x Volumen Ethanol p.a. und 30 μ l NaAc 3M pH 5,3 hinzu, mischt gründlich und inkubiert für >20 min bei -20°C. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C nimmt man den Überstand sorgfältig ab. Der Niederschlag wird in einem gewünschten Volumen RNA-Solubilisierungspuffer (50% Formamid plus Bromphenolblau) aufgenommen und die RNA bei 65°C unter Schütteln für 15 min solubilisiert. Die RNA wird bei -20°C gelagert.

5.2.1.2 Immunpräzipitation von RNA:

200ml Hefekultur (Stamm mit einem Protein A-Fusionsprotein) werden bis zu einer OD₆₀₀ 0,7-1 wachsen gelassen, dann bei Raumtemperatur abzentrifugiert (ca. 4000xg). Das Zellsediment wird mit 10 ml eiskaltem H₂O gewaschen, nochmals abzentrifugiert und die Zellen anschließend bei -20°C einfroren.

Der Aufschluss der Zellen erfolgt mit Hilfe von Glasperlen (0,75-1mm) im Puffer A 200-Aufschlusspuffer (200mM KCl; 20mM Tris pH 8,0; 5mM MgAc; 1mM DTT; 1 U/ μ l RNAsin; 1mM PMSF; 2mM Benzamidin) auf einem Vibrax bei 4°C für 30-45 min. Das Lysat wird anschließend für 10 min bei 15000xg, 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Vom Gesamtzellextrakt wird ein *Bradfordtest* zur Konzentrationsbestimmung der Proteine durchgeführt.

30 μ l IgG Sepharose werden 1x mit 10ml H₂O, dann mit 2x 10ml A200 gewaschen. Die Sepharose wird nun mit 10mg Proteinextrakt für >1h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert.

Vom Gesamtzellextrakt werden 200 μ g für den *Input* zur Analyse der enthaltenen RNA-Spezies abgenommen, ebenso wird eine Probe für eine anschließende Analyse der Proteine mittels *Westernblot* (siehe Abschnitt 5.2.2.5) abgenommen. Ebenso verfährt man mit dem Überstand der Sepharose nach der Inkubationszeit auf dem Drehrad (*Flowthrough*). Die Sepharose wird anschließend in eine 10ml Säule (Bio-Rad) überführt und mit dem Puffer A200 gewaschen: 1x 1ml, 5x 2ml und 1x 10ml. Die IgG-Sepharose wird nun in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 20% für eine Proteinanalyse abgenommen (*Beads*).

Die RNA wird nun von der IgG-Sepharose sowie den 200 μ g *Input* extrahiert (siehe Abschnitt 5.2.1.1). Zu den Sepharose-Proben wird bei der Fällung noch zusätzlich 40 μ g Glycogen gegeben.

5.2.1.3 Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel

2,6g Agarose werden in 170ml H₂O im Mikrowellenherd aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wird 20ml 10x Laufpuffer (20mM NaAc; 0,2mM MOPS; 10mM EDTA; pH 7,0), 10,8ml 37% Formaldehydlösung und 40µl Ethidiumbromid (0,5mg/ml) dazugegeben. Das Gel wird in eine Flachbettapparatur gegossen und ein Kamm für die Probentaschen eingesteckt. Nach dem Aushärten kann der Kamm gezogen und das Gel in der Laufkammer mit 1x Laufpuffer mit den RNA-Proben beladen werden. Das Gel wird bei einer Spannung von 40V 16-20h laufen gelassen.

5.2.1.4 RNA Analyse mit der *Northernblot* Technik

Die im denaturierenden Agarosegel aufgetrennte RNA wird mit Hilfe eines Vakuumblotters auf eine Nylonmembran übertragen. Hierzu wird das Agarosegel mit 1L H₂O für 5 min, anschließend für 20 min in 1L 0,05N NaOH und danach zweimal in 1L 10xSSC. Eine Nylonmembran und ein Whatmanpapier 3MM werden auf die passende Größe zurecht geschnitten und in 10x SSC vorinkubiert. Man legt das Whatpapier auf die Blotparatur, darauf die Membran, darauf den Rahmen zum Abdichten, darauf das gewaschene Gel. Die Blotkammer wird mit ca. 1L 10x SSC aufgefüllt und ein Vakuum von ca. 5mmHg angelegt. Der Transfer wird nach 90 min beendet und die Membran kurz in 2x SSC gewaschen, anschließend getrocknet.

Die Membran wird mit UV Licht (256nm) bestrahlt und die sichtbaren Banden von 18S und 25S angezeichnet. Zum Nachweis der Spezies wurden zwei unterschiedliche Methoden benutzt:

Digoxigenin markierte RNA-Sonden (Holtke et al. (1990, NAR 18, 5843-5851))

Die angefeuchtete Membran wird für mindestens 1h in Prähybridisierungslösung (25% Formamid; 5x SSC; 0,5% SDS; 5x Denhards) bei 65°C vorinkubiert. Dann wird 1-2µl Sonde dazugegeben (siehe Abschnitt 5.2.1.6). Der Blot wird über Nacht mit der Sonde bei 65°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wird 2x 10 min mit Prähybridisierungslösung und 2x 15 min mit 0,1xSSC / 0,1% SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend wäscht man 1x 5 min mit Waschpuffer (0,3% Lauroylsarcosin; 1x MaBS). Der Blot wird dann 1h in Blockierungspuffer (1x Blocking reagent; 0,9x MaBS) blockiert und danach für 30 min anti-Dig-Antikörper (gekoppelt an alkalische Phosphatase) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für 10 min in Waschpuffer wird der Blot 5 min in 1x Reaktionspuffer (5x Reaktionspuffer: 0,5M Tris pH 9,5; 0,5M NaCl; 25mM MgCl₂) und anschließend 5 min in CDP-Star Lösung (1% CDP-Star in 1x Reaktionspuffer) inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgt im Chemilumineszenzimager.

Radioaktiv markierte synthetische Oligonukleotid Sonden:

Die angefeuchtete Membran wird für mindestens 1h in Prähybridisierungslösung (25% Formamid; 5x SSC; 0,5% SDS; 5x Denhards) bei Hybridisierungstemperatur (abhängig von der Sonde; üblicherweise 37°C) vorinkubiert. Nun gibt man ca. 2⁶-3⁶ cpm ³²P-markierte Oligosonde (siehe Abschnitt 5.2.1.5) pro Blot hinzu und inkubiert bei Hybridisierungstemperatur über Nacht. Danach wäscht man 2x 10 min in 2x SSC und 2x 15 min in 2x SSC / 0,1% SDS. Der Blot wird dann in einer Folie auf einem Detektionsschirm (*Imagerscreen* von Fuji) exponiert und nach 2h erstmals auf dem Phosphoimager ausgelesen. Je nach Bedarf wird noch über Nacht bzw. über einen längeren Zeitraum exponiert.

5.2.1.5 Markierung von synthetischen Oligonukleotid Sonden mit radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

10pmol synthetische Desoxyribooligonukleotidsonde in 1µl H₂O wird zusammen mit 1,5µl 10x PNK-Puffer (NEB), 6,5µl H₂O, 5µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10µCi/µl) und 1µl T4 Polynukleotidkinase (NEB) für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Kinasereaktion wird durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA abgestoppt und 50µl H₂O zugegeben. Der Ansatz wird über Microbiospin 6 Säulchen (entsprechend den Herstellerangaben) von nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt.

5.2.1.6 *In vitro* Transkription von RNA-Sonden

Der Gegenstrang des T7-Promotors plus die Sequenz des zu detektierenden RNA-Stücks wird mit PCR amplifiziert. Hiervon wird 1µg in die folgende Reaktion eingesetzt: 0,5 µl RNAsin, 4µl 5x Transkriptionspuffer, 2µl Dig RNA-labeling Mix, 2µl T7 RNA-Polymerase, ad 20µl H₂O. Die Reaktion wird für 2h bei 37°C laufen gelassen und dann mit 1µl 0,5M EDTA pH 8,0 abgestoppt. Nach Zugabe von 25µl Formamid werden 4µl der Reaktion auf einem Agarosegel analysiert.

5.2.1.7 PCR (*polymerase chain reaction*) Polymerase Kettenreaktion

Bei der PCR werden DNA-Abschnitte mit Hilfe einer DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien in einem programmierbaren Thermoblock amplifiziert. Hierzu werden die Vorlage-DNA (2-50pg Plasmid-DNA oder 50-500ng genomische DNA), je 2,5µM Primer, je 200µM Desoxynukleotide (dNTP-Mix von NEB), 1x PCR-Puffer und 0,5-2,0 units *Taq* DNA Polymerase zusammengegeben und im Thermoblock inkubiert. Hierzu wird zuerst für 5 min bei 95°C denaturiert, dann folgt ein aus 35 Zyklen bestehender Programmblöck, bei dem folgende Schritte wiederholt werden: 45 sec bei 95°C (Denaturierung), 1 min 60°C (Annealing, Primer binden an den komplementären DNA-Strang; Temperatur ist abhängig von den gewählten Primern) und 2 min 72°C (Elongation. Bei dieser Temperatur wird die

DNA entsprechend der Vorlage synthetisiert. Länge dieser Phase ist abhängig von der Länge des DNA Abschnitts, der synthetisiert werden soll). Zum Schluss wird nochmals 10 min bei 72°C inkubiert, anschließend wird die Reaktion bei 4°C abgestoppt. 10µl des Ansatzes werden auf einem nativen Agarosegel analysiert.

Als Abwandlung dieser Methode wurde die sogenannte SOE-PCR (splicing by overlapping extension) durchgeführt. In der ersten SOE-PCR werden die einzelnen Gensequenzen mit je 20,

zum Fusionspartner homologen Basenpaaren amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion werden diese Produkte als Vorlagen-DNA eingesetzt wodurch die komplette Fusionssequenz erhalten wird. Mit dieser Technik lassen sich leicht Aminosäureaustausche in eine Sequenz einführen.

5.2.1.8 Reinigung von DNA aus einer PCR-Reaktion

Um die DNA von den Bestandteilen der PCR-Reaktion zu reinigen (Enzym, nicht inkorporierte Desoxynukleotide, Primer, unerwünschte Salze) wird der Ansatz mit Hilfe des PCR Purification Kits von Invitrogen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

5.2.1.9 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus unterschiedlichen Bakterienarten an für die jeweilige Restriktionsendonuklease sequenzspezifischen Stellen hydrolysiert werden. Somit können DNA-Fragmente gewünschter Größe und Sequenz erhalten und für weitere Arbeiten weiter verwendet werden. Die Hydrolyse kann zu überhängenden oder glatten Enden erfolgen, was für die weitere Verwendung der DNA wichtig ist.

Inkubationstemperatur für die Hydrolyse sowie Pufferbedingungen richten sich nach den Herstellerangaben. Die Vollständigkeit der Hydrolyse kann gegebenenfalls durch native Agarosegelektrophorese überprüft werden.

5.2.1.10 Ligation hydrolysiertener DNA

Hydrolysierte DNA Fragmente können unter Verbrauch von ATP mit Hilfe des Enzyms Ligase wieder zu einem Strang verknüpft werden. Hierbei wird eine neue Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxyl und der 5'-Phosphatgruppe zweier DNA Stücke geschlossen. Man gibt 400U T4 DNA zu 50ng hydrolysiertener Plasmid-DNA und dem in 3-5 fach molaren Überschuss verwendeten zu ligierendem DNA-Fragment. Die Menge an eingesetzter DNA wird in Molekülanzahl bezogen auf 50ng Plasmid-DNA berechnet. Die Reaktion wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5.2.1.11 Analyse von DNA im nativen Agarosegel

Eine Suspension von 1% (w/v) Agarose wird in 1x TBE-Puffer (10x: 0,9M Tris; 0,9M Borsäure; 10mM EDTA) im Mikrowellenherd aufgekocht. Bei einer Temperatur von ca. 60°C gibt man Ethidiumbromid dazu (Endkonzentration 1µg/ml) und gießt die Lösung in eine Flachbettapparatur. Man steckt einen Kamm zum Freihalten von Probentaschen ein und lässt das Gel aushärten. Danach wird das Gel in eine mit 1x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, die DNA-Proben mit 5x DNA-Probenpuffer (10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA; 33,3%(w/v) Glycerol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die DNA wird elektrophoretisch bei einer Spannung von 100V aufgetrennt. Das zugegebene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann durch Bestrahlung mit UV-Licht (265nm) sichtbar gemacht werden.

5.2.1.12 Reinigung von DNA aus einem nativen Agarosegel

Zur Isolierung von DNA aus einem nativen Agarosegel wird die entsprechende Bande aus dem Gel auf einem UV-Schirm ausgeschnitten und nach den Anweisungen des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen aufgereinigt, alternativ wurde auch das entsprechende Kit von Invitrogen verwendet.

5.2.1.13 Fällung von DNA

Zur Reinigung oder Aufkonzentrierung von DNA kann diese gefällt werden. Hierzu gibt man zur DNA-Lösung 1/10 Vol 10M LiCl und 2,5 Vol Ethanol p.a. zu. Nach gründlichem Mischen wird die Probe für mind. 20 min bei -20°C inkubiert. Danach zentrifugiert man bei 13000xg für 10 min bei 4°C ab, nimmt vorsichtig den Überstand ab und gibt auf den Niederschlag 1 ml eiskaltes 70%iges Ethanol. Nun wird erneut zentrifugiert, der Überstand wieder vorsichtig abgenommen und der Niederschlag bei 37°C getrocknet. Nun kann man die so gefällte DNA im gewünschten Volumen H₂O wieder aufnehmen.

5.2.1.14 Sequenzierung von DNA

DNA werden durch die Firma MWG Biotech AG sequenziert.

Zur Sequenzierung wird 1-1,5µg der DNA bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet und zusammen mit jeweils 10µl des Sequenzierprimers (10pmol/µl) versendet.

5.2.2 Arbeiten mit Proteinen

5.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradfordtest

Das Bradfordreagenz (Bio-Rad Protein Assay) wird im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt und 1ml dieser Lösung wird zu bis zu 10µl Proteinlösung gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird im Photometer die Absorption bei 596 nm gemessen. Durch Vergleich mit der Absorption einer Lösung bekannter Konzentration kann die unbekannte Konzentration ermittelt werden. Als Faustformel zur Abschätzung dient folgende Formel:

$$c = \frac{OD_{596} \cdot 23}{V_{eingesetzt}} \text{ mg/ml}$$

5.2.2.2 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform

Die Proteinprobe wird mit 4 Vol Methanol p.a. versetzt und gründlich gemischt. Nun gibt man 1 Vol Chloroform dazu und mischt wieder gründlich. Man gibt 3 Vol H₂O zu und mischt wieder. Anschließend wird für 5 min bei 13000xg zentrifugiert. Man nimmt vorsichtig die obere Phase bis zur weißen Zwischenschicht (gefälltes Protein) ab. Nun gibt man 3 Vol Methanol dazu und vortext gründlich. Danach wird für 10 min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, der Niederschlag wird in Probenpuffer resuspendiert.

5.2.2.3 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Die Proteinprobe wird mit 1/100 Vol DOC und 1/10 Vol TCA versetzt und gründlich gemischt. Nun inkubiert man 10 min auf Eis. Anschließend wird 10 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen, der Niederschlag wird in Probenpuffer aufgenommen. Der Indikator Bromphenolblau im Probenpuffer zeigt an, ob eventuell durch Begasen mit Ammoniakrauch neutralisiert werden muss.

5.2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Zur Größenauf trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld wird die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Das Trenngel (375mM Tris pH8,8; 0,1% SDS; Acrylamid:Bisacrylamid 29:1 7,5-14%; TEMED 0,05%; Aps 0,05%) wird in eine vorbereitete Gelapparatur (Peqlab) gegossen und mit Isopropanol p.a. bis zur vollständigen Polymerisation überschichtet. Danach wird das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel (125mM Tris pH8,8; 0,1% SDS; Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 4%; TEMED 0,05%; Aps 0,05%) darauf gegossen und ein

Kamm für die Probentaschen eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wird das Gel in die Laufkammer gestellt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer (25mM Tris; 250mM Glycin; 0,1% SDS) aufgefüllt. Der Kamm wird gezogen und die Proteinproben im Probenpuffer in die Taschen pipettiert. An das Gel wird bei einer konstanten Spannung von 150V angelegt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat. Die Proteine werden entweder direkt im Gel sichtbar gemacht (Coomassie- oder Silberfärbung) oder mit der *Westernblot*-Technik Proteine spezifisch nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.2.2.6).

5.2.2.5 Proteintransfer mit der *Westernblot*-Technik

Nachdem ein Proteingemisch in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelektrophorese aufgetrennt wurde, werden die aufgetrennten Proteine im Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) mit einer Blotapparatur von einem SDS-Gel auf eine Immobilon-P Membran transferiert. Auf dieser Membran können Proteine immunologisch nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.2.2.6).

Hierzu werden sechs Whatman-Papiere und eine Immobilon-P- bzw. Nitrozellulose-Membran auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Die Immobilon-P Membran wird in Methanol angefeuchtet und kurz in Transferpuffer (25mM Tris; 190mM Glycin; 20% Methanol) gespült. Nun werden auf die Anodenseite der Blotapparatur drei in Transferpuffer getränktes Whatman-Papiere geschichtet, darauf die Membran, dann das SDS-Gel und darauf nochmals drei in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier. Nach Auflegen der Kathodenplatte und Schließen der Blotapparatur wird für 1 h eine Spannung von konstanten 24 V bei Raumtemperatur angelegt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine kann mit einem unspezifischen Nachweis durch die reversible Ponceau-S-Färbung (0,5% (w/v) Ponceau-S; 1% (v/v) Essigsäure) überprüft werden.

5.2.2.6 Immunologischer Proteinnachweis auf der *Westernblot*-Membran

Zur immunologischen Detektion von Proteinen auf *Westernblot*-Membranen wird die Membran mit einem für das Antigen spezifischen Antikörper inkubiert und danach mit einem Antikörper, der den konstanten Teil des ersten Antikörpers erkennt. An den zweiten Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Der Nachweis des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt durch Chemolumineszenz. Bei dieser Reaktion wird ein Substrat (Luminol) auf die Blotmembran gegeben. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols, wobei Licht emittiert wird. Dieses Licht kann im Fluoreszenz-Imager dokumentiert werden.

Freie Bindungsstellen der Membran werden durch Inkubation in PBSM (1x PBS; 5% (w/v) Magermilchpulver) für 1 h bei abgesättigt. Danach erfolgt für 1 h die Inkubation des Primärantikörpers, der in PBSTM (PBSM mit 0,05% (v/v) Tween 20) verdünnt wird. Anschließend wird der Blot dreimal für 5 min in PBST (PBSTM ohne Milchpulver) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, bevor mit dem Sekundärantikörper in PBSTM für 45 min inkubiert wird. Nach dieser Inkubation wird erneut dreimal für 5 min in PBSTM gewaschen. Die Immunmarkierung wird nun mit Hilfe des BM Chemilumineszenz-Blottung-Substrates (POD) von Roche sichtbar gemacht. Dabei katalysiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase die Umsetzung von Diacylhydracin (wie Luminol), was zu einer Lichtemission bei 430nm durch Chemilumineszenz führt. Hierzu mischt man die entsprechenden Volumina der Detektionsreagenzien 1 und 2 und gibt sie auf die Proteinseite der Membran. Die Chemilumineszenz-Signale werden mit Hilfe des Fluoreszenz Image Readers LAS 3000 (Fuji) detektiert.

5.2.3 Arbeiten mit *E. coli*

5.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Eine Übernachtkultur von *E. coli* in SOB-Medium (SOB: 0,2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract; 8,55mM NaCl; 2,5mM KCl; pH 7,0 mit NaOH; autoklavieren; vor Gebrauch auf 10mM MgCl₂ bringen) wird 1:100 in 400ml warmem SOB verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35-0,6 (ca. 3h) wachsen gelassen. Die Kultur wird anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt und dann mit 7000xg für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wird mit 400ml kaltem, steriles H₂O resuspendiert. Dann wird wieder zentrifugiert (7000xg, 10 min, 4°C), das Zellsediment mit 200ml kaltem, steriles H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (7000xg, 10min, 4°C) wird das Zellsediment in 10ml kaltem, steriles 10%igem Glycerin resuspendiert und anschließend in einem 50ml Reaktionsgefäß bei 5000xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment nimmt man nun in 1,5ml kaltem, steriles 10%igen Glycerin auf (ca. 1-3x10¹⁰ Zellen pro ml). Die Zellen werden in 50µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

5.2.3.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Ein Aliquot Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut. In einer Elektroporationsküvette legt man 1-5µl DNA-Lösung (in 0,2mM Tris pH 7,4 oder H₂O) vor und mischt nun die Zellsuspension dazu. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5kV (Programm EC2). Nach dem Puls gibt man 1ml LB-Medium zu und überführt die Suspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß. Nach einer Inkubationszeit von >20 min bei 37°C unter Schütteln werden die Zellen für 1 min bei

Raumtemperatur mit 5000xg abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Zellsediment wird in 100µl H₂O resuspendiert und auf LB-Platten mit geeigneter Selektion ausplattiert.

5.2.4 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

5.2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation

Eine Flüssigkultur von *S. cerevisiae* wird über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wachsen gelassen. Die Zellen werden bei 4000xg bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert und in 0,5 Vol sterilem H₂O gewaschen, wieder zentrifugiert und danach in 0,1 Vol LiTSorb (1M Sorbitol in TELit (TELit: 100mM Lithium Acetat; 10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; pH mit Essigsäure auf 8,0) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren resuspendiert man den Zellniederschlag in 360µl LiTSorb pro 50ml Ausgangskultur und gibt 40µ Lachssperma DNA (10mg/ml) dazu, die vorher 10 min bei 100°C gekocht und dann in Eiswasser gekühlt wird. Nach dem Mischen werden Aliquots à 50µl gemacht und diese bei -80°C gelagert.

5.2.4.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Ein Aliquot kompetenter Hefezellen (siehe Abschnitt 5.2.4.1) wird langsam auf Eis aufgetaut. In einem 1,5ml Reaktionsgefäß werden maximal 2µl Plasmid-DNA vorgelegt. Man gibt 10µl Zellsuspension dazu, für genomische Integration durch Rekombination (siehe Abschnitt 5.2.4.10) werden 50µl Zellen verwendet. Es wird gründlich gemischt und anschließend 6 Vol LitTPEG (40% PEG3350 in TeLit steril filtriert) dazugegeben und wieder gründlich gemischt. Man inkubiert für 30 min bei Raumtemperatur, dann wird 1/9 Vol DMSO dazugegeben, wieder gründlich gemischt und für 15 min bei 42°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 2 min bei 2000xg abzentrifugiert, in 100µl YNB oder H₂O resuspendiert und auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert.

5.2.4.3 Selektion gegen Hefestämme mit Uracil-Prototrophie mittels 5-Fluoro-Uracil (5-FOA)

5-FOA (5-Fluoroorotic acid) ist ein synthetischer Hemmstoff der DNA-Synthese, der in der Zelle über 5-Fluor-UMP zu 5-Fluor-dUMP umgesetzt wird. Dieses blockiert im Stoffwechsel das Enzym Thymidylat-Synthase und damit die Bildung von Thymidylsäure, sodass die DNA-Synthese gehemmt wird. Daher können Hefestämme, die ein Plasmid für Uracil-Prototrophie tragen auf diesen Selektionsplatten nicht wachsen. Hefezellen verlieren das Plasmid statistisch, dadurch wird den Zellen das Wachstum auf 5-FOA-Selektionsplatten ermöglicht.

Diploide Stämme, die ein disruptiertes Allel eines essentiellen Gens tragen, werden mit einem Plasmid transformiert, das dieses Gen und den URA3-Marker trägt. Die Stämme werden auf Uracil-Prototrophie selektioniert und eine Tetradenanalyse (siehe Abschnitt 5.2.4.5) durchgeführt. Die gewachsenen, haploiden Klone testet man erneut auf Uracil-Prototrophie. Positive Klone werden mit einem weiteren Plasmid transformiert, das ein Allel des essentiellen Gens enthalten muss. Der Transformationsansatz wird dann auf Platten ausgestrichen, die 5-FOA enthalten. Es können nur die Hefeklone überleben, die das Plasmid mit dem URA3-Marker nicht mehr besitzen und das neue Plasmid mit dem essentiellen Gen aufgenommen haben.

5.2.4.4 Sporulation von diploiden Hefezellen

Zur Produktion von haploiden Hefezellen lässt man diploide Hefeklone 2-4 Tage auf YPD-Platten wachsen, die man anschließend auf Sporulationsplatten transferiert (alle Inkubationen bei 30°C). Nach weiteren 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C überprüft man im Lichtmikroskop die Sporulation. Bei erfolgreicher Sporulation müssen Tetraden (vier zusammenhängende haploide Sporen) zu sehen sein.

5.2.4.5 Tetradenanalyse von sporulierten Hefezellen

Zur Vereinzelung der Sporen einer Tetrade werden die Tetraden von Sporulationsplatten in 40 µl Zymolyase-Lösung (10mg/ml) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl dieses Ansatzes werden auf einem Streifen auf einer YPD-Platte verteilt. Nachdem die Suspension etwas in die Platte eingezogen ist, kann man je 4 Sporen einer Tetrade mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer Instruments, MSM System) in einer Reihe auf der YPD-Platte vereinzeln. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C sollten die Hefekolonien sichtbar sein.

5.2.4.6 Random Spore Analyse von sporulierten Hefezellen

Nach der Kreuzung eines Can⁻-Stammes mit einem Can⁺-Stamm wird der diploide Stamm sporuliert (siehe Abschnitt 5.2.4.5). Eine Impföse voll Sporen wird in 500µl YNB resuspendiert. Man gibt 35µl Zymolyase 20T (0,5mg/ml) dazu und inkubiert für 10 min bei 37°C. Nach Zugabe von 1 Vol sterilem Mineralöl wird kräftig gevortext (die Sporen gehen hierbei in die Ölphase). Nun wird sanft abzentrifugiert (300xg, 1 min). Man versucht nun, möglichst viel Öl abzunehmen und resuspendiert die sedimentierten Sporen in 500µl YNB. Nun wird bei 13000xg für 1 min abzentrifugiert. Die Sporen werden in 100µl YNB resuspendiert und plattiert auf Selektionplatten (-Arg, +L-Canavanin (60µg/ml)) aus.

5.2.4.7 Plasmidisolation aus *S.cerevisiae*

Man gibt in ein 2ml Reaktionsgefäß 300µl Glasperlen (0,75mm Ø) und 200µl Lysepuffer (10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA; 100mM NaCl; 1% SDS; 2% Triton X-100). Man resuspendiert hierin eine Impföse voll frisch ausgestrichener Hefezellen von Agarplatte. Nun gibt man 100µl Phenol und 100µl Chloroform dazu und inkubiert für 10 min bei 4°C auf den Vibrax. Danach zentrifugiert man 10 min bei 4°C und 13000xg ab und überführt 50µl von der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Von dieser Lösung kann 1µl in *E. coli* mittels Elektroporation transformiert werden.

5.2.4.8 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Eine Impföse voll Zellen wird in 1ml H₂O resuspendiert. Nun gibt man 150µl Vorbehandlungslösung ((7,5% β-Mercaptoethanol; 1,85M NaOH) dazu, mischt gründlich, gibt 150µl 55% TCA (Trichloressigsäure) dazu, mischt wieder gründlich und inkubiert für 10 min auf Eis. Danach wird für 10 min bei 4°C mit 13000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag in 40µl HU-Puffer (5% SDS; 200mM Tris pH 6,8; 1mM EDTA pH 8,0; 1,5% β-Mercaptoethanol; 8M Harnstoff; Bromphenolblau) für 10 min unter Schütteln bei 65°C gelöst. Zur Analyse mittels *Westernblot* (siehe Abschnitt 5.2.2.5) werden 15µl aufgetragen.

5.2.4.9 Herstellung von Gesamtzellextrakt aus *S. cerevisiae*

Ca. 50ml einer Hefeflüssigkultur mit einer OD₆₀₀ 0,5-1 werden bei 4000xg für 5min bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Zellniederschlag wird in 250µl kaltem Aufschlusspuffer aufgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Es werden Proteaseinhibitoren (1mM PMSF; 2mM Benzamidin) dazugegeben. Nun füllt man mit Glasperlen (0,75mm Ø) bis zum Flüssigkeitslevel auf und inkubiert 45min bei 4°C auf dem Vibrax. Anschließend wird für 10min bei 13000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Man kann nun die Proteinkonzentration mit dem Bradfordtest (siehe Abschnitt 5.2.2.1) bestimmen.

5.2.4.10 Genomische Epitopmarkierung von Proteinen in *S. cerevisiae*

Zur genomischen Integration von Epitopmarkierungen (= Tag) wird durch PCR ein DNA-Abschnitt amplifiziert, der für eine entsprechende Markierung codiert. Zusätzlich werden am 5'- und 3'-Ende homologe Sequenzen zum zu markierenden Gen (an dessen 3'-Ende, vor und nach dem Stop-Codon, so dass dieses durch Rekombination eliminiert) angefügt, die es ermöglichen, dass durch homologe Rekombination in der Hefe der Tag ins Genom integriert

wird. In Knop et al 1999 wird das Vorgehen beschrieben, zusammen mit den möglichen *Tags*, die durch PCR mit unterschiedlicher DNA-Vorlage erhalten werden können. So kann mit Hilfe eines Satzes an Primern eine große Vielzahl an unterschiedlichen *Tags* für das gleiche Gen hergestellt werden.

50µl kompetenter Hefezellen (siehe Abschnitt 5.2.4.2) werden mit der zu transformierenden DNA gemischt (max. 2µl DNA für 10µl Hefesuspension).

5.2.4.11 Immunfluoreszenzlokalisierungen von Proteinen in *S.cerevisiae*

Runde Deckgläschchen werden in 0,1M HCl 30 min gekocht, zehnmal in sterilem H₂O gewaschen und autoklaviert. (Lagerung bei 4°C) Vor Gebrauch wird die benötigte Anzahl getrocknet. Objektträger (Carl Roth, Epoxy beschichtet mit 3 Aussparungen) werden mit poly-L-Lysin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Objektträger mindestens 3h bei Raumtemperatur getrocknet.

Zum Fixieren von Hefezellen gibt man zu 5ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur 0,5ml 37% Paraformaldehyd (Endkonzentration 4%) und inkubiert für 1h unter Schütteln bei Wachstumstemperatur. Danach werden die Zellen mit 3000xg bei Raumtemperatur für 3 min abzentrifugiert und einmal in 1ml 0,1M Kalium-Phosphat pH 7,5 gewaschen. Die Zellen werden wieder zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 1ml Spheroblastierungspuffer (50mg/ml Zymolyase 100T, 2µl beta-Mercaptoethanol in 0,1M Kalium-Phosphat pH 7,5) aufgenommen und für 30 bis 45min bei 30°C unter leichtem Schütteln (180rpm) in einer kleinen Petrischale inkubiert. Die Spheroblastierung wird im Lichtmikroskop kontrolliert. Die Spheroblasten werden in 1ml TBS aufgenommen.

50 µl Spheroblasten werden auf den Poly-L-Lysin-beschichteten aufgetropft und für 5 min dort inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt. Anschließend wird dreimal mit 50µl TBS gewaschen. Die Spheroblasten werden nun mit 50µl sterilfiltrierter Waschlösung (TBS, 2%BSA, 0,1% NP40) für 30min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Waschlösung wird anschließend abgesaugt und dreimal mit 50µl Waschlösung ohne BSA gewaschen. Dann werden die Spheroblasten mit 50µl Antikörperlösung (Primärantikörper in Waschlösung verdünnt) für 1h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Danach werden die Zellen viermal mit Waschlösung ohne BSA gewaschen. Die Spheroblasten werden dann mit 50µl Zweitantikörperlösung (Zweitantikörper in Waschlösung verdünnt) für 1h bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Spheroblasten viermal mit Waschlösung ohne BSA gewaschen. Die Spheroblasten werden dann in 3µl 0,1µg DAPI in Moviol aufgenommen.

Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M mit 63×/1.40 – Ölobjektiv). Dazu werden folgende Filter verwendet: Filter 49 DAPI für DAPI – Analyse, Filter 37 Wildtyp – GFP zur Analyse von AlexaFluor® 488 und Filter 20 Rhodamine zur Analyse von AlexaFluor® 594. Die Expositionszeiten werden je nach Signalintensität variiert.

Moviol-Lösung: 2,4g Moviol werden mit 6g Glycerol gemischt. Nach Zugabe von 6ml H₂O wird für 2h bei RT inkubiert, dann werden 12ml 0,2M Tris ph 8,5 zugegeben, gut gemischt und 10min bei 50°C (Wasserbad) inkubiert. Anschließend wird auf Eis abgekühlt, 15min bei 5000g abzentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.2.4.12 Fraktionierung von *S. cerevisiae*

Mit dieser Methode kann auf biochemischen Weg der Zellkern vom Cytoplasma getrennt werden und beide Fraktionen getrennt auf Protein- und RNA-Gehalt untersucht werden.

Benötigtes Material:

Protoplasten-Recovery

2% (w/v) Glucose
1% (w/v) Bactopepton
0,6% (w/v) Malt extract
0,01% (w/v) Yeast extract
17,7 mM MgAc*4H₂O
12% Mannitol
bei -20°C lagern, vor Gebrauch zum auftauen und erwärmen

PVP

8% Polyvinylpyrrolidon
1mM MgCl₂
20mM KPO₄ pH6.5

PVP/Triton

0,03% (w/v) Triton-X100 in PVP
Für Proteinanalyse mit 100x Proteaseinhibitoren (PMSF/Benzamidin) versetzen
bei -20°C lagern

0,6M Sucrose in PVP

20,5% (w/v) Saccharose in PVP
Für Proteinanalyse mit 100x Proteaseinhibitoren (PMSF/Benzamidin) versetzen
bei -20°C lagern

0,45M Sucrose in PVP

15,4% (w/v) Saccharose in PVP
bei -20°C lagern

Uracil

5',6' 3H-Uracil, 1µCi/ul

12 ml einer Hefekultur mit einer OD600 ~ 0,8 werden kurz abzentrifugiert (3 min, 2500 rpm, RT) und in 5ml 2mM DTT gewaschen. Die Zellen werden in 5ml Recoverypuffer aufgenommen, mit 5mg Zymolyase 100T versetzt und in einem Becherglas 20 min bei Wachstumstemperatur des Hefestamms leicht geschüttelt (150 rpm). Die Zellen werden kurz abzentrifugiert (3 min, 2500 rpm, RT), in 1ml Recoverypuffer gewaschen und erneut in 5ml Recoverypuffer aufgenommen. Die Zellen werden bei Wachstumstemperatur unter leichtem Schütteln (150 rpm) für 20 min inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 1ml Recoverypuffer aufgenommen.

Nun kann optional ein 5',6' ^3H Uracil Puls zur RNA-Analyse parallel mit einem Temperaturshift durchgeführt werden:

Hierzu inkubiert man die Zellen für 15 min bei 37°C auf einem Eppendorf-Schüttler, dann gibt man 20 μl 5',6' ^3H -Uracil zu und inkubiert erneut bei 37°C für 15 min. Die Reaktion wird durch Inkubation auf Eis abgestoppt. Die nun folgende Fraktionierung kann auch ohne den Tritium-Uracil-Puls durchgeführt werden.

Die Zellen werden für 3 min bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Zellsediment in 0,7ml PVP/Triton gut suspendiert (jeweils kurz vor dem Aufschluss). Man überführt die Suspension in den auf Eis vorgekühlten Homogenisator (Douncer). Nun schließt man die Zellen auf, indem man den Stößel 22x auf und ab bewegt mit gleichzeitiger Drehung um die Stößelachse. Das Homogenisat wird mit 0,7ml PVP/0,6M Sucrose gemischt und vorsichtig auf ein Kissen aus 3ml PVP/0,45M Sucrose in einem 15ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach 10 min Zentrifugation mit 4500 rpm im swing-out Rotor bei 4°C wird vorsichtig 500-1000 μl Überstand abgenommen (Phasengrenze beachten). Dieser Überstand enthält die cytoplasmatische Fraktion. Sie kann mit der Methanol/Chloroform Methode (siehe Abschnitt 5.2.2.2) gefällt werden. Der restliche Überstand wird sorgfältig abgenommen und das Sediment je nach gewünschter Analyse mit Proteinprobenpuffer (HU-Puffer) für nachfolgende Proteinanalyse aufgenommen, oder mit 150 μl PVP/0,45M Sucrose für nachfolgende RNA-Analyse aufgenommen. Für die RNA-Extraktion werden 250 μl Cytoplasmafraktion (entspricht 17%) und 75 μl Kernfraktion (50%) ad 500 μl mit AE-Puffer aufgefüllt und die RNA extrahiert (siehe Abschnitt 5.2.1.1).

5.3 Verwendete Stämme

Name	Datenbank Nummer	Relevanter Genotyp	Plasmide	Herkunft
noc4-8	40	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4	pNOPPA1- noc4-8	Esther Draken
BY4743 CRM1-knockout	226	2n Ygr128w::kanMX4/ YGR128w		Euroscarf
pDL-CRM1	307	Mat a; his3-1; leu2-0; lys2-0; met15-0; ura3-0 Ygr128w::HygmB	pDL-CRM1 (leu)	diese Arbeit
pDL-crm1-T539C	308	Mat a; his3-1; leu2-0; lys2-0; met15-0; ura3-0 Ygr128w::HygmB	pDL-crm1-T539C (leu)	diese Arbeit
BY-alpha3	282	his3-1; leu2-0; lys2-0; ura3-0 trp1::hisG; can1::hisG; ade2::hisG		Sébastien Ferreira-Cerca
BY-a20	283	his3-1; leu2-0; lys2-0; ura3-0 trp1::hisG; can1::hisG; ade2::hisG		Sébastien Ferreira-Cerca
CRM1-BY-a	373	Mat a; ade2Δ; can1Δ; his3-1; leu2-0; ura3-0; trp1::hisG Ygr128w::HygmB	pDL-CRM1 (LEU2) YEp352 (URA)	diese Arbeit
CRM1-BY-alpha	374	Mat alpha; ade2Δ; can1Δ; his3-1; leu2-0; ura3-0; trp1::hisG Ygr128w::HygmB	pDL-CRM1 (LEU2) YEp352 (URA)	diese Arbeit
crm1-BY-a	375	Mat alpha; ade2Δ; can1Δ; his3-1; leu2-0; ura3-0; trp1::hisG Ygr128w::HygmB	pDL-crm1-T539C (LEU2) YEp352 (ura)	diese Arbeit
crm1-BY-alpha	376	Mat alpha; ade2Δ; can1Δ; his3-1; leu2-0; ura3-0; trp1::hisG Ygr128w::HygmB	pDL-crm1-T539C (LEU2) YEp352 (ura)	diese Arbeit
CRM1-BY-alpha-noc4-8	372	ade2Δ; can1Δ; his3-1; leu2Δ; ura3Δ ypr144c::KanMX4 (NOC4) Ygr128w::HygmB (CRM1)	pDL-CRM1 (LEU2) pNOPPA-noc4-8 (LEU2)	diese Arbeit
crm1noc4-8	500	can1Δ; ura3Δ; leu2Δ; his3-1 YPR144c::kanMX4 Ygr128w::HygmB	pDL-crm1-T539C (LEU2) pNOPPA1- noc4-8	diese Arbeit
NOC4-shuffle	30	Mat a/alpha ?; his3-1; leu2-0; lys2-0; MET15; ura3-0 YPR144c::kanMX4	YCplac33 - 144c	Esther Draken
NOC4-shuffle A43-HA	205	Mat a/alpha ?; his3-1; leu2-0; lys2-0; MET15; ura3-0 YPR144c::kanMX4; A43::HIS3	YCplac33 - 144c	diese Arbeit
Noc4-8 A43-HA	215	Mat a/alpha ?; his3-1; leu2-0; lys2-0; MET15; ura3-0 YPR144c::kanMX4; A43::HIS3	pNopPA-noc4-8	diese Arbeit
noc5-ts	386	a/alpha ?; his3-1; leu2-0; ura3-0 lys2-0/LYS2 ?; met15-0/MET15 ? YDL148c::kanMX4/YDL148c	pNOPPA-noc5-2	Holger Kühn Diplomarbeit
pGAL-Noc4	405	Mat a/alpha ?; his3-1; leu2-0; lys2-0; MET15; ura3-0 YPR144c::kanMX4	YCplac111-pGAL- FLAG-NOC4	Philipp Milkereit
pGALFLAG-Noc4 ProA-Noc4 Noc5-HA	488	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pNopPA-Noc4; YCplac33pGal- FLAG-Noc4	diese Arbeit
YK48 Noc4--D1	492	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K48	diese Arbeit
YK49 Noc4--D1-D2	493	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K49	diese Arbeit

		YDL148c::YDL148c-HA		
YK59 Noc4--D3-D4	494	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K59	diese Arbeit
YK60 Noc4--D5	495	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K60	diese Arbeit
YK61 Noc4--D6	496	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K61	diese Arbeit
YK62 Noc4--D7	497	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K62	diese Arbeit
YK63 Noc4--D7-D8	498	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K63	diese Arbeit
YK64 Noc4--D8	499	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K64	diese Arbeit
YK50 Noc4--D1-D4	553	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K50	diese Arbeit
YK51 Noc4--D1-D5	554	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K51	diese Arbeit
YK52 Noc4--D1-D6	555	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K52	diese Arbeit
YK53 Noc4--D1-D7	556	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K53	diese Arbeit
pGal-Flag-Noc4 (LVK)	574	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA	diese Arbeit
YK55 Noc4--D5-D8	575	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-KH55	diese Arbeit
YK56 Noc4--D6-D8	590	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-KH56	diese Arbeit
YK86 Noc4--d7::Noc1d7a	591	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K60	diese Arbeit
YK87 Noc4--d7::Noc1d7b	592	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K86	diese Arbeit
YK88 Noc4--d7::Hs- Noc4d7	593	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-K88	diese Arbeit
YK89 Noc4--d7::Noc3d7	594	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-HA	pGAL-FLAG-Noc4 pNOPPA-N4N3	diese Arbeit
pGal-Noc4 Noc5-TAP	613	Mat a; his3-1; leu2-0; ura3-0 YPR144c::kanMX4 YDL148c::YDL148c-TAP	pGAL-FLAG-Noc4	diese Arbeit

5.3.1 Herstellung des Stammes pDL-CRM1 (#307):

Der Stamm #226 (diploider Wildtypstamm mit einem disruptierten Allel für CRM1) wurde mit dem Plasmid pDL-CRM1 (Neville & Rosbash, EMBO 1999) co-transformiert und anschließend sporuliert. Bei der folgenden Tetradenanalyse wurden die Tetraden auf Geneticin-Resistenz geprüft (verfolgt den Knockout des disruptierten CRM1-Allels). Zellen einer auf Geneticin wachstumsfähigen Tetrade wurde mit dem mit *NotI*-behandelten Vektor pAG32 (Goldstein und McCusker, 1999) co-transformiert und nach 1h Inkubation bei 30°C auf Hygromycin B-enthaltenden Platten ausgestrichen.

5.3.2 Herstellung des Stammes pDL-crm1T539C (#308)

Der Stamm #226 (diploider Wildtypstamm mit einem disruptierten Allel für CRM1) wurde mit dem Plasmid pDL-crm1T539C (Neville & Rosbash, EMBO 1999) co-transformiert und anschließend sporuliert. Bei der folgenden Tetradenanalyse wurden die Tetraden auf Geneticin-Resistenz geprüft (verfolgt den Knockout des disruptierten CRM1-Allels). Zellen einer auf Geneticin wachstumsfähigen Tetrade wurde mit dem mit *NotI*-behandelten Vektor pAG32 (Goldstein und McCusker, 1999) co-transformiert und nach 1h Inkubation bei 30°C auf Hygromycin B-enthaltenden Platten ausgestrichen.

5.3.3 Herstellung des Stammes CRM1-BY-a (#373)

Der Stamm #307 wurde gekreuzt mit dem Stamm #283. Der resultierende diploide Stamm wurde spourliert und Tetraden mit der Methode der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt 5.2.4.6) auf Canavnin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin vorselektioniert. Rote Kolonien zeigen haploide Zellen an. Die nun gewachsenen Kolonien wurden auf Hygromycin B Resistenz hin überprüft (Disruption des endogenen CRM1-Allels). Nach Überprüfung des Matingtypes wurden Zellen mit dem Typ a gewählt.

5.3.4 Herstellung des Stammes CRM1-BY-alpha (#374)

Der Stamm #307 wurde gekreuzt mit dem Stamm #282. Der resultierende diploide Stamm wurde spourliert und Tetraden mit der Methode der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt 5.2.4.6) auf Canavnin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin vorselektioniert. Rote Kolonien zeigen haploide Zellen an. Die nun gewachsenen Kolonien wurden auf Hygromycin B Resistenz hin überprüft (Disruption des endogenen CRM1-Allels). Nach Überprüfung des Matingtypes wurden Zellen mit dem Typ alpha gewählt.

5.3.5 Herstellung des Stammes crm1-BY-a (#375)

Der Stamm #308 wurde gekreuzt mit dem Stamm #283. Der resultierende diploide Stamm wurde spourliert und Tetraden mit der Methode der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt

5.2.4.6) auf Canavnin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin vorselektioniert. Rote Kolonien zeigen haploide Zellen an. Die nun gewachsenen Kolonien wurden auf Hygromycin B Resistenz hin überprüft (Disruption des endogenen CRM1-Allels). Nach Überprüfung des Matingtypes wurden Zellen mit dem Typ a gewählt.

5.3.6 Herstellung des Stammes *crm1-BY-alpha* (#376)

Der Stamm #308 wurde gekreuzt mit dem Stamm #282. Der resultierende diploide Stamm wurde spourliert und Tetraden mit der Methode der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt 5.2.4.6) auf Canavnin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin vorselektioniert. Rote Kolonien zeigen haploide Zellen an. Die nun gewachsenen Kolonien wurden auf Hygromycin B Resistenz hin überprüft (Disruption des endogenen CRM1-Allels). Nach Überprüfung des Matingtypes wurden Zellen mit dem Typ alpha gewählt.

5.3.7 Herstellung des Stammes *CRM1-BY-alpha-noc4-8* (#372)

Der Stamm #374 (CRM1-BY-alpha) wurde mit dem Stamm #40 (noc4-8) gekreuzt. Mit Hilfe der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt 5.2.4.6) wurden Sporen selektioniert, die auf Canavanin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin wachsen konnten. Rote Kolonien zeigen haploide Zellen an. Diese wurden dann sowohl auf Resistenz gegen Hygromycin B und Geneticin getestet und mit Hilfe von Replikaplattierung der temperatursensitive Phänotyp bei 37°C überprüft.

5.3.8 Herstellung des Stammes *crm1-noc4-8* (#500)

Der Stamm #376 (crm1-BY-alpha) wurde mit dem Stamm #40 (noc4-8) gekreuzt. Mit Hilfe der *random spore* Analyse (siehe Abschnitt 5.2.4.6) wurden Sporen selektioniert, die auf Canavanin-haltigen Platten ohne Leucin und Arginin wachsen konnten. Diese wurden dann sowohl auf Resistenz gegen Hygromycin B und Geneticin getestet und mit Hilfe von Replikaplattierung der temperatursensitive Phänotyp bei 37°C überprüft. Obwohl mit dem Stamm BY-alpha ein ade⁻ - Stamm benutzt wurde, mit dessen Hilfe (rote Kolonien) normalerweise haploide Stämme in bei der *random spore* Analyse identifiziert werden können, zeigten diese keinen ts-Phänotyp. Erst durch Auswahl von weißen Kolonien konnten Zellen mit den gewünschten Phänotypen gefunden werden. Eine Erklärung hierfür gibt es nicht.

5.3.9 Herstellung des Stammes *NOC4-shuffle A43-HA* (#205)

In diesem Stamm wurde die Untereinheit A43 der RNA-Polymerase (P0II) mit dem Epitoptag HA (Haemagglutinin) versehen. Hierzu wurde mittels PCR auf dem Vektor pYM2 ein DNA-Fragment amplifiziert, das homologe Bereiche zum 3'-Ende des Gens besitzt und so durch

Rekombination ins Genom des Hefestammes integriert werden kann. Hierbei wird der Leserahmen des Gens um die Sequenz des Epitoptags HA erweitert. Positive Integration kann durch Prototrophie der Aminosäure Histidin selektiert werden. Die erfolgreiche Integration wird zusätzlich noch durch *Westernblot*-Analyse (siehe Abschnitt 5.2.2.5) biochemisch bestätigt.

Der Stamm kann nun auch dazu verwendet werden, um das auf einem Plasmid vorhandene NOC4-Allel gegen andere NOC4-Allele (z.B. temperatursensitive Allele) auszutauschen (siehe Abschnitt 5.2.4.3).

5.3.10 Herstellung des Stammes noc4-8 A43-HA (#215)

Dieser Stamm enthält das temperatursensitive Allel noc4-8, das zwei Mutationen trägt: N260D und V550A. Der Stamm #205 wurde mit dem Plasmid pNopPA-noc4-8 transformiert und Leucin prototrophe Kolonien wurden nun auf Selektionsplatten ausgestrichen, die 5-FOA enthalten (siehe Abschnitt 5.2.4.3). Nun können nur solche Zellen überleben, die das Plasmid mit dem NOC4-Wildtypallel, das einen URA-Marker enthält, verloren haben.

5.4 Verwendete Plasmide

Name	Datenbank Nummer	Gen	Selektion	Origin	Funktion
pDL-CRM1	K239	CRM1 YGR218w	LEU2 Amp	CEN2 ARS1 ORI(E.Coli)	Leptomycin B resistentes <i>S.cerevisiae</i> wt CRM1 Gen
pDL-crm1-T539C	K240	CRM1 YGR218w	LEU2 Amp	CEN2 ARS1 ORI(E.Coli)	Leptomycin B sensitives <i>S.cerevisiae</i> CRM1 Gen
pAG32	K213	Hph marker	Amp	ORI(E.Coli)	HygromycinB Resistenz
pNOPPA- noc4-8	K106	noc4-8	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	ORF YPR144C unter NOP- Promotor mit N-terminalem Protein A Tag, ts Mutante
pNOPPA- noc5-2	K210	noc5-2	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	ORF YDL148C unter NOP- Promotor mit N-terminalem Protein A Tag, ts Mutante
pNOPPA-K48 (dD1)	Philipp 48	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 57-553 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K49 (dD1-D2)	Philipp 49	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 86-553 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K50 (dD1-D4)	Philipp 50	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 261-553 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K51 (dD1-D5)	Philipp 51	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 316-553 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K52 (dD1-D6)	Philipp 52	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 445-553 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-KH55 (dD5-D8)	K866	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1-260 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-KH56 (dD6-D8)	K867	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1-145 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K59 (dD3+D4)	Philipp 59	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1- 56+261-553 von Noc4p unter NOP-Promoter mit N- terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K60 (dD5)	Philipp 60	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1- 260+316-553 von Noc4p unter NOP-Promoter mit N- terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K61 (dD6)	Philipp 61	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1- 315+445-553 von Noc4p unter NOP-Promoter mit N- terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K62 (dD7)	Philipp 62	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1- 444+483-553 von Noc4p unter NOP-Promoter mit N-

					terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K63 (dD7-D8)	Philipp 63	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1-144 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-terminalem Protein A Tag
pNOPPA-K64 (dD8)	Philipp 64	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Expression von AS 1-482 von Noc4p unter NOP- Promoter mit N-term. ProteinA Tag
pNOPPA-K86	K868	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Hybrid aus NOC4 und NOC1-Noc-Dom. unter NOP-Promoter mit N-term. Protein A Tag; kein Wachstum
pNOPPA-K87	K869	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Hybrid aus NOC4 und NOC1-Noc-Dom. unter NOP-Promoter mit N-term. Protein A Tag; kein Wachstum
pNOPPA-HS-N4	Philipp 88	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Hybrid aus NOC4 und humaner Noc4-Noc-Dom unter NOP-Promoter mit N- term. Protein A Tag;
pNOPPA-N4N1	K870	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Hybrid aus NOC4 und NOC1 unter NOP-Promoter mit N- term. Protein A Tag, Wachstum möglich
pNOPPA-N4N1- mut1	K871	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch L459E; unterstützt Wachstum
pNOPPA- N4N1- mut2	K872	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch D460K; unterstützt Wachstum
pNOPPA- N4N1- mut3	K873	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch L466I; unterstützt Wachstum
pNOPPA- N4N1- mut4	K874	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch L469F; unterstützt Wachstum
pNOPPA- N4N1- mut5	K875	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch Y473F; unterstützt Wachstum
pNOPPA- N4N1- mut6	K876	NOC4- Derivat	LEU2 Amp	CEN6 ARS4 ORI(E.Coli)	Derivat von pNOPPA-N4N1, AA-Austausch A478K; unterstützt Wachstum

5.4.1 Herstellung des Plasmids K870:

Mittels PCR (siehe Abschnitt 5.2.1.7) mit den Primern Long-Hybrid-5'-N4N1 und Long-Hybrid3'-N4N1 wurde ohne eine Vorlage (beide Primer haben einen großen überlappenden Bereich) ein PCR-Produkt hergestellt, dass dann mit dem durch Sall-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

5.4.2 Herstellung des Plasmids K871:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch L459E durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #976 und #973 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage ein Stück DNA amplifiziert, das dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primer Long-Hybrid3'-N4N1 eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sali-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

5.4.3 Herstellung des Plasmids K872:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch D460K durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #976 und #972 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage ein Stück DNA amplifiziert, das dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primer Long-Hybrid3'-N4N1 eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sali-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

5.4.4 Herstellung des Plasmids K873:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch L466I durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #974 und #971 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage ein Stück DNA amplifiziert, das dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primer Long-Hybrid-5'-N4N1 eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sali-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

5.4.5 Herstellung des Plasmids K874:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch L469F durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #975 und #971 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage ein Stück DNA amplifiziert, das dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primer Long-Hybrid-5'-N4N1 eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sali-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in

Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifizert und anschließend sequenziert.

5.4.6 Herstellung des Plasmids K875:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch Y473F durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #977 und #971 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage ein Stück DNA amplifiziert, das dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primer Long-Hybrid-5'-N4N1 eingesetzt wurde. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sall-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

5.4.7 Herstellung des Plasmids K876:

Mit Hilfe der SOE-PCR-Technik (siehe Abschnitt 5.2.1.7) wurden der Aminosäureaustausch A478K durchgeführt. In der ersten PCR wurde mit den Primern #1139 und #976 sowie #1138 und # 971 und dem pNOPPA-N4N1 als Vorlage je ein Stück DNA amplifiziert. Beide Produkte wurden in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem Primern #976 und #971 eingesetzt. Das entstandene PCR-Produkt wurde nun mit dem durch Sall-Behandlung linearisierten Vektor pNOP-K62 in Hefe transformiert (siehe Abschnitt 5.2.4.2). Durch Rekombination wird das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut. Nach einer Isolation des Vektors aus der Hefe (siehe Abschnitt 5.2.4.7) wurde dieser in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Publikationen im Rahmen dieser Doktorarbeit

Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol Cell.* 2007 Nov 9;28(3):446-57

Milkereit, P., Kühn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003a). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res* 31, 799-804.

Milkereit, P., Strauss, D., Baßler, J., Gadali, O., Kühn, H., Schutz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E., and Tschochner, H. (2003b). A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *J Biol Chem* 278, 4072-4081.

6.2 Allgemeine Literatur

Balakin, A. G., Smith, L., and Fournier, M. J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86, 823-834.

Baßler, J., Grandi, P., Gadali, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* 8, 517-529.

Beckmann, R., Spahn, C. M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107, 361-372.

Bernstein, K. A., and Baserga, S. J. (2004). The small subunit processome is required for cell cycle progression at G1. *Mol Biol Cell* 15, 5038-5046.

Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S., and Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell* 3, 1619-1626.

Beven, A. F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D. J., Brown, J. W., and Shaw, P. J. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1241-1251.

Bier, M., Fath, S., and Tschochner, H. (2004). The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett* 564, 41-46.

Billy, E., Wegierski, T., Nasr, F., and Filipowicz, W. (2000). Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. *Embo J* 19, 2115-2126.

- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2, E107-112.
- Chen, W., Bucaria, J., Band, D. A., Sutton, A., and Sternglanz, R. (2003). Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic Acids Res* 31, 690-699.
- Chook, Y. M., and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* 399, 230-237.
- Chu, S., Archer, R. H., Zengel, J. M., and Lindahl, L. (1994). The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 659-663.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Muller, C. W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221-229.
- Claypool, J. A., French, S. L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J. A., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* 15, 946-956.
- Clemons, W. M., Jr., Menetret, J. F., Akey, C. W., and Rapoport, T. A. (2004). Structural insight into the protein translocation channel. *Curr Opin Struct Biol* 14, 390-396.
- Cmarko, D., Verschure, P. J., Rothblum, L. I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R., and Fakan, S. (2000). Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol* 113, 181-187.
- Culver, G. M., and Noller, H. F. (2000). In vitro reconstitution of 30S ribosomal subunits using complete set of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 318, 446-460.
- Dabbs, E. R. (1991). Mutants lacking individual ribosomal proteins as a tool to investigate ribosomal properties. *Biochimie* 73, 639-645.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331-2338.
- Dick, F. A., Eisinger, D. P., and Trumpower, B. L. (1997). Exchangeability of Qsr1p, a large ribosomal subunit protein required for subunit joining, suggests a novel translational regulatory mechanism. *FEBS Lett* 419, 1-3.
- Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). The Noc proteins involved in ribosome synthesis and export contain divergent HEAT repeats. *Rna* 10, 351-354.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.

- Du, Y. C., and Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* 109, 835-848.
- Eisinger, D. P., Dick, F. A., and Trumppower, B. L. (1997). Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Mol Cell Biol* 17, 5136-5145.
- Fatica, A., Cronshaw, A. D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 9, 341-351.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol* 23, 1798-1807.
- Fatica, A., Tollervey, D., and Dlakic, M. (2004). PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *Rna* 10, 1698-1701.
- Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20, 263-275.
- Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. submitted.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 23, 1558-1568.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessl, J., Trumppower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405-3415.
- Gallagher, J. E., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* 18, 2506-2517.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.

- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* *440*, 631-636.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Geerlings, T. H., Vos, J. C., and Raue, H. A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'-->3' exonucleases. *Rna* *6*, 1698-1703.
- Gleizes, P. E., Noaillac-Depeyre, J., Leger-Silvestre, I., Teulieres, F., Dauxois, J. Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M. C., and Gas, N. (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* *155*, 923-936.
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 1541-1553.
- Gorlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 607-660.
- Grandi, P., Rybin, V., Baßler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., *et al.* (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* *10*, 105-115.
- Granneman, S., and Baserga, S. J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res* *296*, 43-50.
- Hage, A. E., and Tollervey, D. (2004). A surfeit of factors: why is ribosome assembly so much more complicated in eukaryotes than bacteria? *RNA Biol* *1*, 10-15.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 116-125.
- Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M. R., Wild, K., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006). Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle. *Nature* *444*, 507-511.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., *et al.* (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* *8*, 505-515.
- Hedges, J., Chen, Y. I., West, M., Bussiere, C., and Johnson, A. W. (2006). Mapping the functional domains of yeast NMD3, the nuclear export adapter for the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* *281*, 36579-36587.
- Hedges, J., West, M., and Johnson, A. W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *Embo J* *24*, 567-579.

- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., and Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J Biol Chem* *249*, 3103-3111.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalski, E., Kearsey, S., and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *Embo J* *13*, 2452-2463.
- Ho, J. H., and Johnson, A. W. (1999). NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 2389-2399.
- Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* *151*, 1057-1066.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Bouliier, K., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* *415*, 180-183.
- Hughes, J. M. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *J Mol Biol* *259*, 645-654.
- Hughes, J. M., and Ares, M., Jr. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *Embo J* *10*, 4231-4239.
- Hung, N. J., and Johnson, A. W. (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *26*, 3718-3727.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J. M., and Grummt, I. (2002). TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* *109*, 297-306.
- Johnson, A. W., Lund, E., and Dahlberg, J. (2002). Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* *27*, 580-585.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J. R., Schneper, L., Broach, J. R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* *18*, 2491-2505.
- Kallstrom, G., Hedges, J., and Johnson, A. (2003). The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol* *23*, 4344-4355.
- Keener, J., Dodd, J. A., Lalo, D., and Nomura, M. (1997). Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13458-13462.
- Keys, D. A., Vu, L., Steffan, J. S., Dodd, J. A., Yamamoto, R. T., Nogi, Y., and Nomura, M. (1994). RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the

- initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2349-2362.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Kowalak, J. A., Bruenger, E., and McCloskey, J. A. (1995). Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* 270, 17758-17764.
- Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwulbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., and Bukau, B. (2002). L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* 419, 171-174.
- Kruiswijk, T., de Hey, J. T., and Planta, R. J. (1978a). Modification of yeast ribosomal proteins. Phosphorylation. *Biochem J* 175, 213-219.
- Kruiswijk, T., Kunst, A., Planta, R. J., and Mager, W. H. (1978b). Modification of yeast ribosomal proteins. Methylation. *Biochem J* 175, 221-225.
- Kruiswijk, T., Planta, R. J., and Krop, J. M. (1978c). The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. *Biochim Biophys Acta* 517, 378-389.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9112-9117.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A. L., Desgres, J., and Vandenhaute, J. (1994). The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J Mol Biol* 241, 492-497.
- Lafontaine, D., Vandenhaute, J., and Tollervey, D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev* 9, 2470-2481.
- Lafontaine, D. L., Preiss, T., and Tollervey, D. (1998). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol Cell Biol* 18, 2360-2370.
- Lalo, D., Steffan, J. S., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *J Biol Chem* 271, 21062-21067.

- Leger-Silvestre, I., Caffrey, J. M., Dawaliby, R., Alvarez-Arias, D. A., Gas, N., Bertolone, S. J., Gleizes, P. E., and Ellis, S. R. (2005). Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem* 280, 38177-38185.
- Leger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., and Gleizes, P. E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *Embo J* 23, 2336-2347.
- Leger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 108, 103-113.
- Lin, C. W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K., and Reeder, R. H. (1996). A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 6436-6443.
- Liu, P. C., and Thiele, D. J. (2001). Novel stress-responsive genes EMG1 and NOP14 encode conserved, interacting proteins required for 40S ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 12, 3644-3657.
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* 1694, 17-35.
- Maki, J. A., Schnobrich, D. J., and Culver, G. M. (2002). The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Mol Cell* 10, 129-138.
- Martin, D. E., Soulard, A., and Hall, M. N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119, 969-979.
- Matsuura, Y., and Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432, 872-877.
- Mattaj, J. W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Milkereit, P., Gadál, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105, 499-509.
- Milkereit, P., Kühn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003a). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res* 31, 799-804.
- Milkereit, P., Strauss, D., Baßler, J., Gadál, O., Kühn, H., Schütz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E., and Tschochner, H. (2003b). A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *J Biol Chem* 278, 4072-4081.
- Milkereit, P., and Tschochner, H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *Embo J* 17, 3692-3703.

- Miller, O. L., Jr., and Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* *164*, 955-957.
- Mizushima, S., and Nomura, M. (1970). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature* *226*, 1214.
- Moss, T., Stefanovsky, V., Langlois, F., and Gagnon-Kugler, T. (2006). A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. *Biochem Soc Trans* *34*, 1079-1081.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* *7*, 1609-1619.
- Moy, T. I., and Silver, P. A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* *13*, 2118-2133.
- Moy, T. I., and Silver, P. A. (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci* *115*, 2985-2995.
- Neville, M., and Rosbash, M. (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *18*, 3746-3756.
- Ni, J., Tien, A. L., and Fournier, M. J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* *89*, 565-573.
- Nissan, T. A., Baßler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J* *21*, 5539-5547.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., and Nyborg, J. (2000). Macromolecular mimicry. *Embo J* *19*, 489-495.
- Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev* *18*, 196-209.
- Oeffinger, M., Fatica, A., Rout, M. P., and Tollervey, D. (2007). Yeast Rrp14p is required for ribosomal subunit synthesis and for correct positioning of the mitotic spindle during mitosis. *Nucleic Acids Res.*
- Oeffinger, M., and Tollervey, D. (2003). Yeast Nop15p is an RNA-binding protein required for pre-rRNA processing and cytokinesis. *Embo J* *22*, 6573-6583.
- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* *514*, 17-25.
- Osheim, Y. N., French, S. L., Keck, K. M., Champion, E. A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S. J., and Beyer, A. L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* *16*, 943-954.

- Pemberton, L. F., Blobel, G., and Rosenblum, J. S. (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol 10*, 392-399.
- Perez-Fernandez, J., Roman, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X. R., and Dosil, M. (2007). The 90S Preribosome Is a Multimodular Structure That Is Assembled through a Hierarchical Mechanism. *Mol Cell Biol 27*, 5414-5429.
- Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science 297*, 1345-1348.
- Reeder, R. H. (1984). Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell 38*, 349-351.
- Reeder, R. H., Guevara, P., and Roan, J. G. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol Cell Biol 19*, 7369-7376.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J 21*, 2664-2671.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol 17*, 1030-1032.
- Rout, M. P., and Aitchison, J. D. (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem 276*, 16593-16596.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol 148*, 635-651.
- Rout, M. P., and Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol 123*, 771-783.
- Ryan, K. J., and Wente, S. R. (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol 12*, 361-371.
- Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J 20*, 6475-6484.
- Schafer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Bottcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature 441*, 651-655.
- Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *Embo J 22*, 1370-1380.
- Schawalder, S. B., Kabani, M., Howald, I., Choudhury, U., Werner, M., and Shore, D. (2004). Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature 432*, 1058-1061.

- Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* *103*, 253-262.
- Schneider, D. A., French, S. L., Osheim, Y. N., Bailey, A. O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J. R., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2006). RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12707-12712.
- Schneider, D. A., Michel, A., Sikes, M. L., Vu, L., Dodd, J. A., Salgia, S., Osheim, Y. N., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2007). Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell* *26*, 217-229.
- Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Wollam, B. J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M. D., and Lycan, D. E. (2006). Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *174*, 679-691.
- Siddiqi, I., Keener, J., Vu, L., and Nomura, M. (2001). Role of TATA binding protein (TBP) in yeast ribosomal dna transcription by RNA polymerase I: defects in the dual functions of transcription factor UAF cannot be suppressed by TBP. *Mol Cell Biol* *21*, 2292-2297.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* *107*, 373-386.
- Steffan, J. S., Keys, D. A., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev* *10*, 2551-2563.
- Takyar, S., Hickerson, R. P., and Noller, H. F. (2005). mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* *120*, 49-58.
- Taura, T., Schlenstedt, G., and Silver, P. A. (1997). Yrb2p is a nuclear protein that interacts with Prp20p, a yeast Rcc1 homologue. *J Biol Chem* *272*, 31877-31884.
- Thomas, F., and Kutay, U. (2003). Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci* *116*, 2409-2419.
- Thomson, E., and Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *Rna* *11*, 1215-1224.
- Tollervey, D., and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 337-342.
- Trapman, J., Retel, J., and Planta, R. J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res* *90*, 95-104.
- Trotta, C. R., Lund, E., Kahan, L., Johnson, A. W., and Dahlberg, J. E. (2003). Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *Embo J* *22*, 2841-2851.

- Udem, S. A., and Warner, J. R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 65, 227-242.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *Embo J* 19, 1357-1365.
- Vanrobays, E., Gelugne, J. P., Caizergues-Ferrer, M., and Lafontaine, D. L. (2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *Rna* 10, 645-656.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261-311.
- Wade, J. T., Hall, D. B., and Struhl, K. (2004). The transcription factor Ifh1 is a key regulator of yeast ribosomal protein genes. *Nature* 432, 1054-1058.
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.
- Wehner, K. A., Gallagher, J. E., and Baserga, S. J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol Cell Biol* 22, 7258-7267.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-473.
- White, R. J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 69-78.
- Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* 1, 223-234.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M. C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18, 4463-4470.
- Zhang, Y., Yu, Z., Fu, X., and Liang, C. (2002). Noc3p, a bHLH protein, plays an integral role in the initiation of DNA replication in budding yeast. *Cell* 109, 849-860.

7 Abkürzungen

aa	Aminosäure(n) (amino acid(s))
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
C-terminal, ct	carboxy-terminal
d	Tage (days)

Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ETS	external transcribed spacer
5'-FOA	5'-Fluoorotic Acid
FT	Durchfluß (flow through)
g	Gramm
GAL	Galaktose
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GLU	Glukose
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
h	Stunde
h.s.	<i>Homo sapiens</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein-Partikel
IP	Immunpräzipitation
ITS	internal transcribed spacer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Puffer	Lysepuffer (Lysis buffer)
M	Marker
MDa	Megadalton
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mRNP	mRNA enthaltendes Ribonukleoprotein Partikel
NES	nukleäre Export-Sequenz (nuclear export sequence)
NLS	nukleäre Lokalisierungs-Sequenz (nuclear localisation sequence)
NPC	nukleärer Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
N-terminal, nt	Amino - terminal
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol I	RNA-Polymerase I
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNP	Ribonukleoprotein Partikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
rRNA	ribosomale RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	Glukose-haltiges Medium für Hefe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shuffle Stamm	Disruptionsstamm komplementiert mit einem pURA3-WT Plasmid

sl	synthetisch letal / synthetische Letalität
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA)
TAP	Tandem Affinity Purification
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	Temperatur-sensitiv
U	Unit
UTR	Untranslated region
wt	Wildtyp
WCE	Gesamtzellextrakt (whole cell extract)
YPD	Glukose-haltiges Vollmedium für Hefe
YPG	Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefe
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

Aminosäuren wurden entsprechend dem Einbuchstabencode abgekürzt.

8 Zusammenfassung

Die Ribosomenbiogenese ist eine der wichtigsten metabolischen Aufgaben einer Zelle. Das fertige Ribosom besteht aus zwei ungleichen Untereinheiten, die zusammen aus etwa 78 ribosomalen Proteinen und vier rRNA-Spezies aufgebaut sind. Zur Herstellung von Ribosomen benötigt die Zelle die koordinierte Aktivität aller drei nukleären Transkriptionsmaschinierien zusammen mit über 180 Biogenesefaktoren und etwa 100 snoRNAs. Alle zusammen bewirken in einem komplexen Netzwerk die Produktion von 40S- und 60S-Untereinheiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Ribosomenbiogenesefaktors Noc4p im Zusammenhang mit der Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit untersucht. Noc4p ist eine Komponente des SSU-Prozessoms, der als großer, heteromultimerer snoRNP-Komplex (small nucleolar Ribonukleoprotein) eine zentrale Funktion bei der Prozessierung des 18S-rRNA-Vorläufers hat. Noc4p bildet einen stabilen, heterodimeren Komplex mit Nop14p und ist ebenfalls für die Prozessierung der rRNA der 40S-Untereinheit notwendig. Für Noc4p lagen Hinweise für eine Funktion im ribosomalen Kernexport der Prä-40S-Untereinheit vor.

Durch Mutationsanalysen von Noc4p sollte untersucht werden, wie es in das Netzwerk der Biogenesefaktoren des SSU-Prozessoms eingebunden ist und welche Funktionen es dabei übernimmt. Hierzu wurde eine Kartierung von Noc4p-Interaktionsdomänen vorgenommen und wichtige Domänen für die Interaktion mit Nop14p charakterisiert. Die Bindung an Nop14p über die C-terminalen Domänen scheint eine Voraussetzung für eine Interaktion von Noc4p mit rRNA und U3 snoRNA zu sein. Eine dieser Interaktionsdomänen ist die Noc-Domäne, ein Abschnitt von 45 Aminosäuren, der große Homologie zu den beiden 60S-Biogenesefaktoren Noc1p und Noc3p aufweist. Die Domänen aus Noc1p und Noc3p können nicht die essentielle Funktion der Noc4p-Noc-Domäne übernehmen, der homologe Bereich aus *H. sapiens* ist hingegen dazu in der Lage.

Mit Hilfe eines neuen Assays war es möglich, die Funktion von Noc4p im Kernexport der Prä-40S-Untereinheit detailliert zu analysieren und die Funktion von Noc4p im Export zu bestätigen. In weiteren Experimenten wurde ein genetischer Zusammenhang zwischen Noc4p und der Exportmaschinerie gefunden.

Um die große Menge publizierter Daten der proteomweiten Interaktionen zwischen Biogenesefaktoren hinsichtlich Noc4p und Nop14p auswerten zu können, wurde eine Datenbank erstellt, die es ermöglicht, die Interaktionen spezifisch zu analysieren und statistisch auszuwerten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass die Aufgaben von Noc4p über eine Funktion im SSU-Prozessom hinausgehen. Es wird die Rolle von Noc4p als Exportadapter sowie Assemblierungsfaktor für ribosomale Proteine diskutiert.