

**Entwicklung von Verfahren für die
kontinuierliche, zielgerichtete Evolution
von Protein-Protein-Interaktionspartnern
in *Saccharomyces cerevisiae***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
KATHRIN BRUNNER

aus
STRAUBING

im Jahr 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 31.08.2010

Datum der mündlichen Prüfung: 16.11.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. Günter Hauska

Prüfer: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prof. Dr. Ralf Wagner

Prof. Dr. Herbert Tschochner

Kathrin Brunner

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.
Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die natürliche Evolution	1
1.2 Evolution im Labor – <i>directed evolution</i>.....	4
1.2.1 Replikations-/ Mutationssysteme	5
1.2.2 Selektionssysteme – Kopplung von Geno- und Phänotyp	6
1.3 Zielsetzung	8
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Material	9
2.1.1 Organismen	9
2.1.1.1 Bakterienstämme.....	9
2.1.1.2 Hefestämme.....	9
2.1.2 Nukleinsäuren	9
2.1.2.1 Plasmide	9
2.1.2.2 Oligonukleotide	10
2.1.2.3 Synthetische Gene	13
2.1.3 Antikörper.....	13
2.1.4 Chemikalien und Enzyme	14
2.1.5 Medien	16
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.8 Geräte	19
2.1.9 Software	19
2.1.10 Firmen.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Bakterien	21
2.2.1.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	21
2.2.1.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien	21
2.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien	21
2.2.1.4 Transformation chemokompetenter Bakterien	21
2.2.1.5 Transformation elektrokompetenter Bakterien	21
2.2.1.6 Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen	22
2.2.1.7 Plasmidisolation aus Bakterien.....	22
2.2.2 Hefen.....	22
2.2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte von Hefekulturen	22
2.2.2.2 Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium	22

2.2.2.3 Transformation mit PEG/LiAc	23
2.2.2.4 Elektroporation von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.2.2.5 Bestimmung der Wachstumsrate von Hefekulturen	24
2.2.2.6 Lagerung von Hefekulturen	25
2.2.2.7 Kurieren von Plasmiden.....	25
2.2.2.8 Plasmidisolation aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.2.2.9 Genomische Integration bzw. Deletion	25
2.2.2.10 Anreicherung von schnell wachsenden Hefen in einer definierten Mischkultur	26
2.2.2.11 Mutagenese durch Ethylmethansulfonat (EMS)	26
2.2.2.12 Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese und Selektion starker Interaktionspaare	26
2.2.2.13 Bestimmung des mutagenen Potentials der humanen AID in <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2.2.14 AID-induzierte Mutagenese und Selektion von starken Interaktionspartnern	27
2.2.2.15 Analyse von <i>bait</i> und <i>prey</i> aus mutagenisierten Hefekulturen	28
2.2.3 DNA-Techniken.....	28
2.2.3.1 Amplifikation von Nukleinsäuren	28
2.2.3.2 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren	29
2.2.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	30
2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.3.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	30
2.2.3.8 Aufreinigung von cPCRs im 96 well-Format.....	31
2.2.3.9 DNA-Sequenzanalyse	31
2.2.3.10 Einstellung der Verunreinigung von Oligonukleotiden.....	31
2.2.4 RNA-Techniken.....	32
2.2.4.1 <i>In vitro</i> Transkription (IVT)	32
2.2.4.2 mRNA Nachweis in Hefe	32
2.2.4.3 Nachweis zur autokatalytischen Abspaltung der Ribozymsequenz	33
2.2.4.4 Q β Aktivitätstest <i>in vitro</i>	33
2.2.4.5 RNA cloning	33
2.2.5 Proteinbiochemische Techniken	34
2.2.5.1 SDS-PAGE	34
2.2.5.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	34
2.2.5.3 Proteinnachweis mittels <i>Western Blotting</i> und Immunodetektion.....	34
2.2.5.4 Proteinexpression in <i>E. coli</i> und native Aufreinigung	35
2.2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	36
2.2.5.6 Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels ELISA	36
2.2.5.7 Alkalische Lyse von Hefe.....	36
2.2.5.8 Herstellung von nativem Hefelysat	37
2.2.5.9 Anreicherung der flag-Q β -Replikasekomponenten aus Hefelysat	37
2.2.5.10 <i>In vitro</i> Translation	37

3 ERGEBNISSE.....	38
3.1 <i>In vivo</i> Selektion von Protein-Protein-Interaktionspartnern im yeast two-hybrid System	38
3.1.1 Protein-Protein-Interaktionsstärke und Wachstumsverhalten korrelieren in Flüssigkultur ..	39
3.1.1.1 Modellsystem p53 und großes SV40 T-Antigen	41
3.1.1.2 Modellsystem Sam68 und SH3-Domänen	42
3.1.2 Besseres Y2H Interaktionspaar setzt sich in Mischkultur durch.....	46
3.1.3 Zusammenfassung Selektion von Protein-Interaktionspartnern in Flüssigkultur.....	48
3.2 Ungerichtete Mutagenese durch Ethylmethansulfonat.....	49
3.2.1 Das mutagene Agens Ethylmethansulfonat.....	49
3.2.2 EMS-induzierte Wachstumsraten-Steigerung aufgrund genomischer Mutationen.....	49
3.2.3 Zusammenfassung EMS-induzierte, ungerichtete Mutagenese.....	53
3.3 Gerichtete Mutagenese durch RNA abhängige RNA-Replikasen.....	54
3.3.1 RNA-Replikasen aus den Hefeviren 20S und 23S	55
3.3.2 RNA-Replikasen P2 aus Phi6 und NS5B aus HCV	59
3.3.3 RNA-Replikase Qβ aus dem <i>E. coli</i> Phagen Qβ.....	60
3.3.3.1 Aufbau, Funktion und Anwendung der Qβ-Replikase	60
3.3.3.2 Prinzip des autonomen Qβ-Replikons in <i>S. cerevisiae</i>	61
3.3.3.3 Amplifikation von Qβ- <i>templates</i> im <i>in vitro</i> Test	62
3.3.3.4 Expression des Qβ-Replikasekomplexes in <i>S. cerevisiae</i>	65
3.3.3.5 Heterolog exprimierter Qβ-Komplex ist <i>in vitro</i> aktiv	68
3.3.3.6 Anpassen der Qβ- <i>templates</i> an Gegebenheiten in der Hefezelle	71
3.3.3.7 Zusammenfassung Qβ-Replikon	73
3.4 Erfolgreiche Etablierung von zielgerichteten Evolutionssystemen in der Bäckerhefe durch Kopplung von Replikation, Mutation und Selektion	74
3.4.1 Sequenzspezifische, Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese	74
3.4.1.1 Vorarbeiten zur Transformation von Hefe mit Oligonukleotiden.....	75
3.4.1.2 Einbau transformierter Oligonukleotide in Plasmid-kodiertes Gen LEU2optNSM.....	75
3.4.1.2.1 Einfügen von Punktmutationen	76
3.4.1.2.2 Einfügen multipler Basenaustausche	77
3.4.1.3 Versuche zur kontinuierlichen Aufnahme von Oligonukleotiden aus Medium	80
3.4.1.4 Erfolgreiche zielgerichtete Evolution von Protein-Protein-Interaktionspaaren in Flüssigkultur	83
3.4.1.4.1 Definierte Oligonukleotide zur Mutation von Yes1-weak	83
3.4.1.4.2 Oligonukleotid-Bibliotheken zur Mutation von Yes1-weak.....	84
3.4.1.4.3 Neue Yes1-Varianten interagieren besser mit Sam68 als Yes1-weak.....	92
3.4.1.5 Zusammenfassung Oligonukleotid-vermittelte Evolution	95
3.4.2 Gerichtete Mutagenese durch <i>activation-induced cytidine deaminase</i> (AID)	96
3.4.2.1 Funktion der AID bei der Antikörperreifung in humanen B-Zellen.....	96

3.4.2.2 Prinzip der AID-basierten Mutagenese.....	97
3.4.2.3 Expression und mutagenes Potential humaner AID in <i>S. cerevisiae</i>	98
3.4.2.4 Integration der AID-Expressionskassette ins Hefegenom.....	103
3.4.2.5 Erfolgreiche kontinuierliche, zielgerichtete Evolution des Interaktionspaars Sam68/Yes1 durch AID-induzierte Mutagenese in Flüssigkultur.....	104
3.4.2.6 Zusammenfassung AID-basierte kontinuierliche Evolution	109
4 DISKUSSION.....	110
4.1 Replikase-basierte Mutagenese	110
4.1.1 Anforderungen zur Etablierung eines Hefeviren-Replikons.....	110
4.1.2 Bedingungen zur Etablierung eines Q β -Replikons in Hefe	112
4.2 Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese und Y2H Selektion	114
4.2.1 Vergleich zwischen theoretischem und praktischem Verlauf der Hefeselektion	114
4.2.2 Mögliche Ursachen für die Diskrepanz zwischen ELISA und Y2H Ergebnissen bezüglich Bindaffinität von Yes1-VariX an Sam68	116
4.3 AID-basierte autonome, kontinuierliche Evolution	119
4.3.1 Mutagenesepotenzial der humanen AID in der Bäckerhefe	119
4.3.2 Individuelle Mutationsraten der AIDint-Klone.....	121
4.3.3 AID-induzierte Mutationseignisse in den evolvierenden Kulturen	122
5 AUSBLICK.....	124
5.1 Optimierung der Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese.....	124
5.2 Weiterentwicklung der AID-Mutagenese.....	125
5.3 Anwendbarkeit des Y2H Systems zur Selektion von hochaffinen Protein- Interaktionspartnern.....	127
6 ZUSAMMENFASSUNG	129
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	130
8 ANHANG.....	141
8.1 Plasmidkarten	141
8.2 Nukleinsäuresequenzen der synthetisch hergestellten Gene	141
8.2.1 Activation-induced cytidine deaminase (AID) (-flag).....	141
8.2.2 Ts-His-Tu-Linker-Q β -flag	142
8.2.3 S1-flag.....	142
8.2.4 Hfq-flag.....	143
8.2.5 LEU2opt	143
8.2.6 TRP1opt.....	144
8.2.7 20S-Ribozym	144
8.2.8 23S-Ribozym	145
DANKSAGUNG	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
AbA	Aureobasidin A
Abb.	Abbildung
AD	Gal4 Aktivierungsdomäne
AID = AICD	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AIDint	genomisch integrierte AID
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure(n)
B	
BD	Gal4 DNA Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	
CDR	<i>complementary determined regions</i>
CIP	<i>calf intestinal polymerase</i>
clonNAT	Nourseothricin
cPCR	<i>colony-PCR</i>
CSR	<i>class switch recombination</i>
D	
Da	Dalton
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DO	<i>Synthetic Drop Out</i>
ds	<i>double stranded</i>
DTT	1,4-Dithiotreitol
E	
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
F	
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>
fwd	<i>forward</i>
G	
G418	Geneticindisulfat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis Delta Virus
Hfq	<i>host factor of Qβ</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I	
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
K	
Kana	Kanamycin
KanMX	Kana ^R -Expressionskassette
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
KH-Domäne	<i>heterogeneous nuclear ribonuclear protein K homology</i>
L	
LiAc	Lithiumacetat

M	
M	molar
mA	Milliampere
MAT	<i>mating type</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
N	
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleotide
O	
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
P	
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pBlue	pBluescriptKS(+)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol 3350
PEI	Polyethylenimin
Pos.	Position
pSc	pPCRScript
PXXP	Prolin-X-X-Prolin
Q	
Qβ- <i>E. coli</i>	Qβ-Replikase in <i>E. coli</i> exprimiert
Qβ-Hefe	Qβ-Replikase in <i>S. cerevisiae</i> exprimiert
qcPCR	<i>quick change PCR</i>
R	
R	Purinbase
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
rev	<i>reverse</i>
rmp	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	
Sam68	<i>Src-associated protein during mitosis of 68 kDa</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH3	<i>Src homology-3</i>
SHM	Somatische Hypermutation
Src	Sarcoma
ss	<i>single stranded</i>
T	
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	
U	<i>Units</i>
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
üN	über Nacht
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
V	
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
X	
X-α-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-α-D-galaktopyranosid
Y	
Y	Pyrimidinbase
Y2H	<i>yeast two-hybrid</i>
YPDA	<i>yeast peptone dextrose adenine</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Die natürliche Evolution

Nach wissenschaftlichen Erkenntnissen entstand die Erde in ihrer Urform vor rund 4,6 Milliarden Jahren. Wie erstes Leben auf die Erde kam, konnte bislang nicht rekonstruiert werden. Laut chemischer Evolutionshypothese (Abiogenese) wurden nach dem Urknall erste organische Verbindungen aus anorganischen Molekülen gebildet, die sich schließlich zu einfachen Lebensformen organisierten. Der Biologe und Chemiker Stanley Miller (1930-2007) stellte 1953 die „Ursuppe“ nach und versuchte erstmals Leben aus Nicht-Lebendigem zu erschaffen. Dabei gelang es ihm, drei der 20 Aminosäuren aus einem Gasgemisch zu generieren (Miller 1953). Kürzlich konnte ein neuer experimenteller Mechanismus aufgezeigt werden, wie Ribonukleotide abiotisch hätten entstehen können (Powner *et al.* 2009). Die Experimente zeigen zwar, dass die vorgeschlagenen Prozesse prinzipiell möglich sind, beweisen jedoch nicht wie das Leben auf der Erde tatsächlich begann, weil genaue Kenntnisse der damals herrschenden Umweltbedingungen fehlen. Hingegen gibt es gesicherte Theorien, wie sich erste einfache Lebewesen auf der Erde zu komplexen Lebensformen weiterentwickelten (Abb. 1). Die Hypothese der Biogenese besagt, dass Leben nur von Lebewesen weitergegeben werden kann.

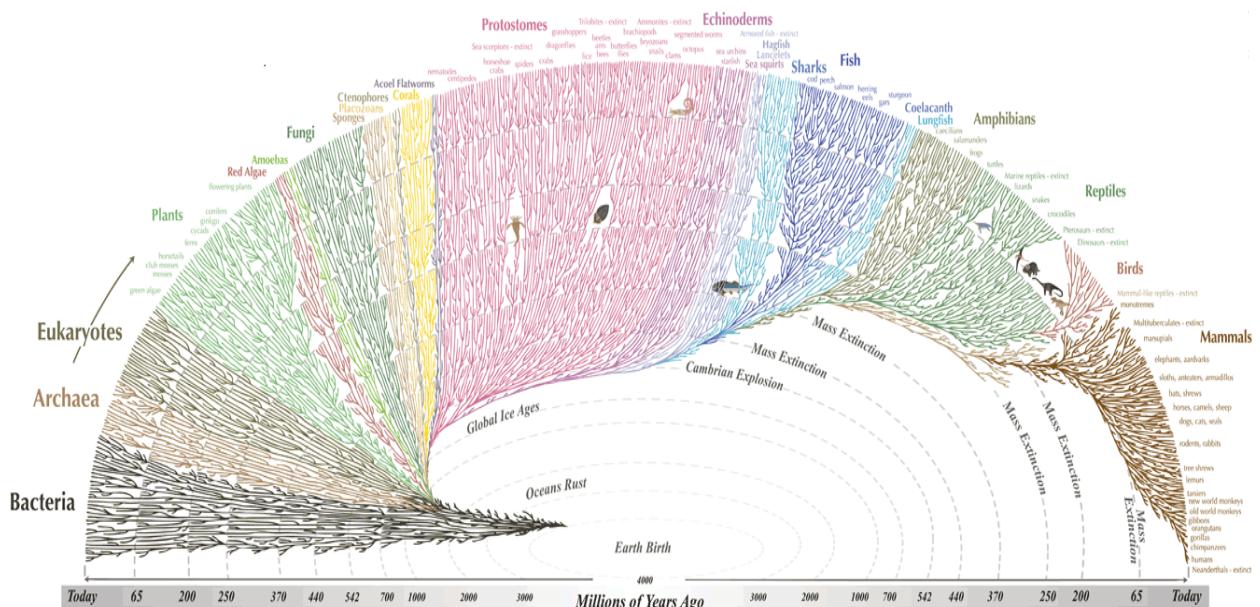


Abb. 1. Hypothetischer Stammbaum zur Entstehung von Einzellern und deren Evolution zu komplexen Lebewesen. Quelle: http://evogeneao.com/images/Evolution_poster_lg.gif

Forscher sind sich einig, dass sich Leben auf Nukleinsäurebasis durchsetzte, da in den bisher bekannten Lebensformen dieselben Nukleotid-Bausteine verwendet und sich aufgrund des universell gültigen genetischen Codes 20 Aminosäuren ergeben. Die Zellen heute speichern ihre genetische Information in Form von DNA. Zur DNA-Replikation sind Enzyme notwendig, deren „Bauanleitung“ jedoch in der DNA selbst gespeichert ist. Somit ergibt sich ein klassisches Henne-Ei-Paradoxon: was kam zuerst, DNA oder Enzym? Wahrscheinlich weder noch, sondern RNA. Walter Gilbert (*1932) schlug erstmals die RNA-Welt-Hypothese vor (1986). Sie besagt, dass RNA-Moleküle und später

einfache RNA-basierte Zellformen (Ribozyten) die Vorläufer heutiger Organismen waren. RNA ist aufgrund kleiner chemischer Unterschiede (Uracil wird statt Thymin verwendet, trägt an der Ribose ein zusätzliches Sauerstoffatom) viel reaktiver als DNA. Die Idee basiert auf den Eigenschaften der RNA, genetische Informationen speichern, übertragen und vervielfältigen zu können, sowie auf ihrer Fähigkeit als Ribozym Reaktionen zu katalysieren und ist somit in der Lage Aufgaben von Enzymen und DNA zu erfüllen. Mittlerweile ist bekannt, dass die katalytischen Zentren der Ribosomen von RNA und nicht, wie zunächst angenommen, von Proteinen gestellt werden (Yusupov *et al.* 2001). Da Ribosomen als sehr ursprüngliche Zellbausteine gelten, ist diese Entdeckung der überzeugendste Hinweis zur Untermauerung der RNA-Welt-Hypothese. Einige Viren speichern heute noch ihre genetische Information in Form von RNA. Durch die Reverse Transkriptase werden RNA Moleküle in DNA umgeschrieben. Es ist also durchaus vorstellbar, dass im Laufe der Evolution DNA zur langfristigen Speicherung von Informationen benutzt wurde, da DNA wesentlich weniger reaktiv und damit viel stabiler ist als RNA, was ein sehr wichtiger Aspekt für die langfristige Garantie des Fortbestandes ist (Fusz *et al.* 2005).

Wissenschaftler sind bemüht, den Begriff „Leben“ so zu definieren, dass er auch noch unentdeckte Lebensformen mit einschließt. Gemäß dem Chemiker Gerald Joyce (*1956) ist Leben „ein chemisches System mit der Fähigkeit zur Selbsterhaltung und zur Darwin'schen Evolution“ (Joyce 1989). Für den britischen Naturforscher Charles Darwin (1809-1882) waren v. a. die isolierten Galapagos-Inseln der ideale Forschungsort. Durch studieren von Schildkröten- und Vogelarten, die sich in Aussehen, Verhalten und Ernährung leicht voneinander unterschieden, sich aber ansonsten sehr ähnlich waren, entwickelte er die Idee, dass alle Arten von einem einzigen gemeinsamen Vorfahren abstammten und sich aufgrund unterschiedlicher Lebensbedingungen auf den Inseln verändert und sich perfekt an ihren Lebensraum angepasst haben. Die gesammelten Eindrücke und zahlreiche Fundstücke bildeten die Grundlage für die vielen Veröffentlichungen, die die Weltanschauung veränderten. Charles Darwin und Alfred Russel Wallace (1823-1913) (Abb. 2) präsentierten 1858 gemeinsam zwei unterschiedliche Arbeiten zur Theorie der Evolution durch natürliche Selektion. Doch erst die Veröffentlichung von Darwins Buch *The Origin of Species by Means of Natural Selection* (1859) trug zur wachsenden Akzeptanz der Evolutionsidee bei. Sie besagt, dass Evolution stattfindet, und zwar durch Selektion auf Basis von zufälligen Eigenschaften, die einen Überlebensvorteil bringen. Wenn die Nachkommen mit den neuen Eigenschaften schließlich soweit von ihren Vorfahren abweichen, dass sie sich nicht mehr mit ihnen fortpflanzen können, so ist eine neue Art entstanden.

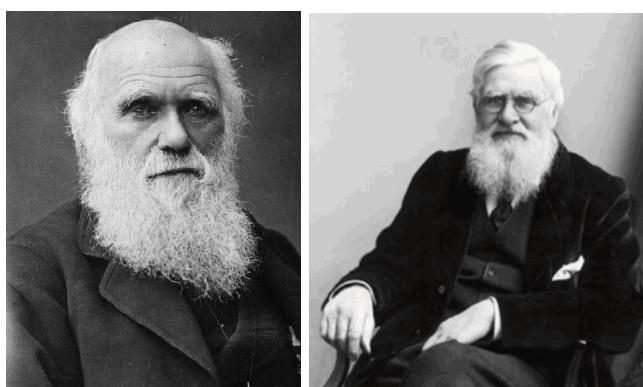


Abb. 2. Charles Darwin (links) und Alfred Russel Wallace (rechts).

Die Tatsache der Evolution, beginnend mit ersten Einzellern vor rund drei Milliarden Jahren, die sich zu einfachen und schließlich komplexen Lebewesen wie Pflanzen, Wasser- und Landtieren entwickelten bis hin zu den ersten Urzeitmenschen, die vor zwei Millionen Jahren lebten, ist in der Wissenschaft weitgehend akzeptiert. Der Mechanismus der Selektion hingegen sorgte lange Zeit für Diskussion. In den folgenden Jahren veröffentlichte Darwin weitere bedeutende Bücher zur Varietät von Tieren und Pflanzen (1868) sowie zur Abstammung des Menschen von Affen (1871). Damit lehnte er sich gegen die christliche Schöpfungslehre und entfachte einen Glaubenskrieg, der bis heute anhält. Die Ursache der Entstehung der Variationen konnte Darwin damals nicht benennen. Jedoch teilte er nicht die Meinung von Jean Baptiste de Lamarck (1744-1829), dass erworbene Eigenschaften vererbt würden, sondern erkannte, dass in einem Individuum innere Veränderungen passieren, die die Chance erhöhen, zu überleben und somit das Merkmal weiterzugeben.

Gregor Mendel (1822-1884) und Friedrich Miescher (1844-1895) lebten zur gleichen Zeit wie Darwin aber unbeeinflusst voneinander. Die Evolutionstheorie zur Entstehung der Arten als Ergebnis der Evolution wurde erst im 20. Jahrhundert durch die Erkenntnisse der Vererbungslehre, Zellforschung und Populationsbiologie erweitert und unter dem Begriff der synthetischen Evolutionstheorie zusammengefasst. Der deutsche Mediziner und Zoologe August Weismann (1834-1914) lieferte erste Gedanken zu dieser Theorie. Durch den britischen Mathematiker und Biologen Ronald Fisher (1890-1962), den deutsch-amerikanischen Biologen Ernst Mayr (1904-2005) sowie den englischen Biologen Julian Huxley (1887-1975) wurde die synthetische Evolutionstheorie 1942 erstmals einer breiten Öffentlichkeit vorgestellt und verhalf schließlich der Selektionstheorie zum Durchbruch. So bezieht die heutige Evolutionstheorie auch die Erkenntnisse der Genetik mit ein und legte sechs Merkmale zur Entstehung von neuen Arten fest:

1. Mutationen: zufallsbedingte Veränderungen des genetischen Materials → Diversität
2. Selektion: natürliche Auslese durch abiotische und biotische Selektionsfaktoren der Umwelt
3. Gen-Drift: zufällige Veränderungen des Gen-Pools
4. Rekombination: Vermischung von Erbmaterial durch sexuelle Fortpflanzung
5. Isolation: Fortpflanzungsschranke durch räumliche, zeitliche oder genetische Trennung
6. Migration: Wanderungsbewegungen

Der Slogan „*Survival of the Fittest*“ – Überleben des Fähigsten wurde nicht von Darwin geschaffen, sondern vom Politikwissenschaftler und Philosoph Herbert Spencer (1820-1903). In seinem Buch *Principles of Biology* (1864) integrierte er sowohl die Theorien von Darwin und Wallace, als auch die von Henri Milne-Edwards (1800-1885) über die Arbeitsteilung in Organismen. Der Evolutionsbiologe der Neuzeit Richard Dawkins (*1941) erlangte Bekanntheit durch seine Theorie des egoistischen Gens. Er beschreibt es als fundamentale Einheit der natürlichen Selektion, die den Körper nur als „Überlebensmaschine“ benutzt (1976).

Durch zufällige Mutationen im Erbgut evolvieren völlig eigenständig komplexe Lebensformen und Organismen passen sich an ihre Umwelt- und Lebensbedingungen an – die Evolution optimiert sich selbst. Dabei verblüfft die Einfachheit; Evolution stützt sich lediglich auf drei biologische Prinzipien: Vermehrung, Mutation und Selektion.

1.2 Evolution im Labor – *directed evolution*

Das Zeitalter der Biotechnologie ermöglicht Naturwissenschaftlern, die Evolution im Labor in beschleunigter Form nachzustellen. Dabei beschränken sie sich auf einzelne Proteine und kreierten den Begriff *protein engineering*. In Milliarden von Jahren hat die Natur zwar ein breit gefächertes Repertoire an Proteinen hervorgebracht, jedoch eignen sich die wenigsten in ihrer natürlichen Bauart für den industriellen Einsatz. Zur Perfektion von Proteinen im Labor werden zwei Strategien verwendet: 1) Rationales Proteindesign basiert auf detaillierter Information über Proteinstruktur und – Funktion und plant konkrete DNA-Veränderungen. 2) *Directed evolution* ist ein zielgerichteter Prozess zur Generierung von optimalen DNA-/Proteinvarianten, der über mehrere Runden von Mutation und Selektion abläuft. So wurde der Weg für die synthetische Biologie geebnet.

Replikation, Mutation und Selektion sind die treibenden Kräfte der *directed evolution* (Abb. 3), als deren Vorreiter Sol Spiegelman (1914-1983) und Manfred Eigen (*1927) gelten. Statt der Reproduktion von komplexen Lebewesen beschränkt man sich hierbei auf einzelne Gene, die fehlerhaft repliziert und auf diese Weise mutiert werden. Dabei finden Mutationen wie in der Natur durch ein kleines Repertoire von Genveränderungen wie Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Rekombination von Genen statt.

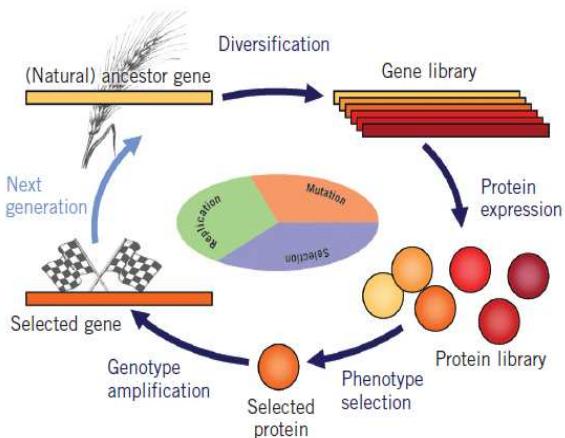


Abb. 3. Schema zur *directed evolution*. Durch Diversifizierung entsteht aus dem Vorläufergen eine Genbibliothek und nach Translation eine Proteinbibliothek. Nach Selektion über den gewünschten Phänotyp kann das Gen in einer neuen Generation diversifiziert werden. Nach Liss *et al.* (2007)

Proteine, die so in der Natur nicht existieren oder unter gewünschten Bedingungen nicht optimal funktionieren, werden maßgeschneidert. Anwendung findet die *directed evolution* in allen Bereichen des modernen Lebens (Schäfer *et al.* 2007). Für die Landwirtschaft und Nahrungsmittelindustrie werden Enzyme mit optimierten katalytischen Aktivitäten hergestellt und zur Produktion von Bier, Wein, Milch- und *Light*-Produkten genutzt. Mittels *enzyme engineering* wird die Spezifität, Chiralität und Thermostabilität von Biokatalysatoren gezielt angepasst. Dazu zählen auch Spül- und Waschmittelzusätze wie Proteasen, Lipasen, Amylasen und Cellulasen, deren Aktivitätsoptima zwischen 40 °C und 95 °C liegen sollen. Die Generierung neuer Stoffwechselwege zum Abbau von Zellulose und Lignin in Mikroorganismen erlangt immer mehr an Bedeutung bezüglich Biokraftstoffproduktion durch Umsetzung von Biomasse aus Getreide, Pflanzen oder Holz. Beachtenswerten Einsatz findet die *directed evolution* auch in der Medizin- und Pharmaindustrie. Die Produktion von Arzneimitteln (z. B. Antibiotika, Insulin) in Mikroorganismen ist unentbehrlich geworden. Die natürliche Antikörperreifung in B-Zellen Antikörper wird imitiert, indem Antikörper *in vitro* modifiziert werden, um die Affinität zu ihrem Antigen und zugleich die biologische Wirksamkeit

zu erhöhen. Immunglobuline finden in der medizinischen Diagnostik und der Humantherapie eine breite Anwendung und werden beispielsweise routinemäßig in Analytiklabors zur Untersuchung von Blutkonserven auf relevante Krankheitserreger genutzt.

Im Laufe der letzten Jahre entwickelten Wissenschaftler zahlreiche Strategien zur Optimierung von Proteinen, jeweils bestehend aus mehreren Runden von Varianten-Generierung, Selektion und fehlerhafter Amplifikation der selektierten Moleküle. Bislang wird zunächst ein großer Pool an Gen-Varianten auf DNA oder RNA-Basis hergestellt, entweder in lebenden Zellen (*in vivo*) oder außerhalb von Zellen (*in vitro*). Die generierte Genbibliothek wird im Anschluss in einem Selektionssystem entweder *in vivo* oder *in vitro* translatiert und nach optimierten Proteinen durchmustert. Dabei wird der Selektionsdruck auf die Proteinfunktion abgestimmt. Die Selektion des „Fitteren“ bezieht sich in den künstlichen Evolutionssystemen jeweils auf Einzelmoleküle, die durch Kopplung von Geno- und Phänotyp einen Vorteil in dem definierten System haben. Evolution kann unter diesen Bedingungen schnell, systematisch und zielgerichtet durchgeführt werden.

1.2.1 Replikations-/ Mutationssysteme

In der Natur ereignen sich Mutationen spontan, an zufälligen Positionen im Genom. Im Labor werden Mutationen beabsichtigt induziert und treten deshalb mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit auf.

Die Zufallsmutagenese (*random mutagenesis*) wird genutzt, wenn kein konkretes Zielgen bekannt ist, z. B. zur Veränderung von Stoffwechselwegen (Mobini-Dehkordi *et al.* 2008). Dazu werden Mikroorganismen mit Mutagenen behandelt, die entweder physikalischer (ionisierende Strahlung) oder chemischer Natur (alkylierende Agenzien) sind (James *et al.* 1977; Hapala *et al.* 2005). In *E. coli*-Mutatorstämmen (Greener *et al.* 1997) finden Mutationen ebenso ungerichtet statt, indem Gene der zelleigenen Reparaturssysteme wie *mutD*, *mutS*, *mutT* gezielt verändert und die *proof reading*-Aktivität von Polymerasen herabgesetzt wurde. Durch beide Methoden können die Genveränderungen genomisch oder episomal auftreten, zielen jedoch nicht auf definierte Gene ab.

Um die Zufallsmutagenese auf einzelne Gene zu beschränken, wurden weitere Methoden entwickelt. *Saccharomyces cerevisiae* wird zur Bibliothekherstellung über Rekombination von homologen Genen benutzt (Bulter *et al.* 2003). In Anlehnung daran entstand die *in vitro*-Anwendung des *DNA shuffling* (Stemmer 1994). Dabei führt die Rekombination von DNasel-verdauten homologen Genen zur Generierung von Gen-Varianten. Eine der beliebtesten Methoden zur Zufallsmutagenese *in vitro* ist die *error-prone* PCR (Cadwell *et al.* 1992). Mittels *Taq* Polymerase und erhöhter $MgCl_2$ -Konzentrationen oder Zugabe von $MnCl_2$ kann die Mutationsrate eines Gens genau eingestellt werden und generiert eine hohe Variantenanzahl, allerdings entstehen naturgemäß überwiegend Transitionen. *Spiked* Oligonukleotide werden genutzt, um DNA-Regionen zu verändern (Hermes *et al.* 1989); Phosphoramidite, die Bausteine der Oligonukleotide, werden zu einem gewissen Prozentsatz mit einem Gemisch der anderen drei Basen verunreinigt. Bei dieser PCR-basierten Zufallsmutagenese treten keine bevorzugten Mutationen auf. Zur Herstellung von RNA-Bibliotheken werden RNA-abhängige RNA-Polymerasen verwendet. Da sie keine *proof reading*-Aktivität besitzen, liegt die durchschnittliche Mutationsrate bei 10^{-3} - 10^{-4} (Rohde *et al.* 1995). Die Q β -Replikase aus dem Bakteriophagen Q β ist dabei eine der beliebtesten Enzyme für *ex vivo* Evolutionen (Haruna *et al.* 1965; Kopsidas *et al.* 2007).

Sollen in einem Protein mit 300 Aminosäuren (AS) 20 Positionen durch die möglichen 19 AS ersetzt werden, so ergibt sich die enorme Variantenanzahl von 19^{20} ($= 3,8 \times 10^{25}$). Ersetzt man lediglich neun AS-Positionen, so entstehen $3,2 \times 10^{11}$ Proteinvarianten. Die Anzahl an zu durchmusternden Varianten mithilfe der bislang existierenden Selektionssysteme liegt bei $\sim 10^{11}$. Eine Reduzierung der Bibliotheksgröße durch Fokussierung auf ausschlaggebende Proteinregionen ist deshalb anzustreben. Im Gegensatz zur Zufallsmutagenese werden durch ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) gezielt Mutationen in ein Gen eingefügt. Dabei können variable Bereiche entweder auf definierte DNA-Abschnitte beschränkt werden oder über das ganze Gen verteilt liegen. Bei einem Alanin-Scan (Lin *et al.* 2001) wird jede Position durch Alanin ersetzt, was Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner AS-Positionen zulässt. Für ein Protein mit 300 AS ergeben sich 300 Varianten. Das Maß an Diversität wird durch *sequential permutation* erhöht. Hierbei wird jede AS durch die anderen 19 möglichen ersetzt. Dadurch ergeben sich $300 \times 19 = 5.700$ Protein-Varianten. Diese beiden Methoden geben Aufschluss über wichtige Domänen des Proteins, wobei die Bibliotheksgröße relativ klein gehalten wird. Degenerierte Gen-Bibliotheken werden rational geplant und das AS-Verhältnis pro Position kann individuell festgelegt werden. Eingegrenzte Genbereiche werden durch Assemblierung von degenerierten Oligonukleotiden mutiert und ggf. im Anschluss mit unveränderten Genabschnitten fusioniert. Die weiterentwickelte Methode des *dirty bottle*-Ansatzes erlaubt es, den überwiegenden Anteil an wildtypischen AS beizubehalten und nur einen geringen Anteil zu variieren. Durchschnittlich werden 1 – 4 AS pro Gen substituiert, wodurch der Anteil an *loss of function*-Varianten reduziert und dennoch eine genügend hohe Variabilität garantiert wird.

Die erzeugten Gen-Bibliotheken werden bisher in separaten Selektionssystemen durchmusterst.

1.2.2 Selektionssysteme – Kopplung von Geno- und Phänotyp

Das Selektionssystem bestimmt die Richtung der Evolution, sowohl in der Natur als auch im Labor. Nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* wurden Selektionssysteme etabliert, bei denen Geno- und Phänotyp gekoppelt sind (Abb. 4). Dabei ist der Phänotyp an eine katalytische Funktion geknüpft, die der Wirtszelle einen selektiven Wachstumsvorteil vermittelt oder es wird ein Signal produziert, das in einem Aktivitätstest ausgelesen werden kann.

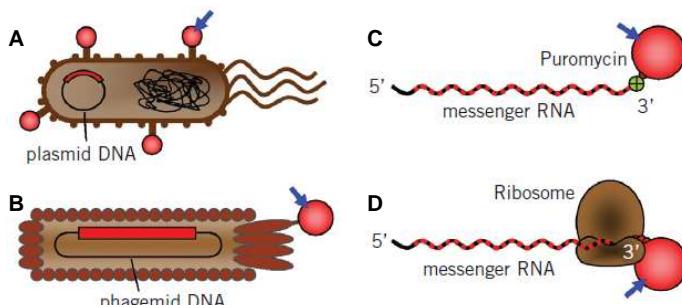


Abb. 4. *In vivo* und *in vitro* Selektionssysteme. A. Bacterial display, B. Phage display, C. mRNA display, D. Ribosome display. Details siehe Text. Modifiziert nach Liss *et al.* (2007).

Im *ribosome display* (Hanes *et al.*, 1997) wird eine DNA-Bibliothek *in vitro* transkribiert und in Protein translatiert, welches an einen immobilisierten Liganden bindet. Das Protein bleibt dabei mit mRNA und Ribosom verbunden. Nach Selektion und Elution wird die freie mRNA reverse transkribiert und die

cDNA amplifiziert. Dieser Prozess wird über mehrere Selektionsrunden mit ansteigendem Selektionsdruck durchgeführt (*panning*). Die resultierenden DNA-Sequenzen kodieren für stark bindende Proteine (Kopsidas *et al.* 2007; Zahnd *et al.* 2007). Je nach Ursprung des Proteins kann ein pro- oder eukaryontisches zellfreies System gewählt werden. Aufgrund der Unabhängigkeit von lebenden Systemen und damit auch der Unabhängigkeit von Transformationseffizienzen ist die Anzahl bzw. Verfügbarkeit an Ribosomen in dem Reaktionsansatz die limitierende Größe. Als Weiterentwicklung gilt das *mRNA display* (Roberts *et al.* 1997; Liu *et al.* 2000). Die DNA-Bibliothek wird *in vitro* in mRNA transkribiert und das 3' Ende über einen Linker mit Puromycin verknüpft. Puromycin ist ein Antibiotikum, das durch Imitieren der Tyrosyl-tRNA die Translation blockiert. Bei diesem Selektionssystem werden Geno- und Phänotyp gekoppelt, indem nach Fertigstellung das Peptid oder Protein mit dem eigenen mRNA *template* verbunden bleibt, obwohl es vom Ribosomenkomplex abfällt. Da Puromycin bedeutend kleiner ist als der komplette Ribosomenkomplex (2.000 kDa) wird dieses System meist favorisiert und ermöglicht das Durchmustern von bis zu 10^{11} Varianten (Gold 2001; Fukuda *et al.* 2006). Parallel zu den *in vitro* Systemen wurden Selektionsmethoden in Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen oder Bakteriophagen entwickelt. Die Bibliotheksgröße, die durchmustert werden kann, resultiert jeweils aus der Transformationsrate. Bei der beliebten Methode des *phage displays* (Smith 1985; McCafferty *et al.* 1990) werden Bakteriophagen dafür verwendet, Geno- und Phänotyp zu koppeln. Es dient als Hochdurchsatz-screening-System zur Verbesserung von Protein-Bindepartnern, insbesondere zur Verbesserung von Antikörperspezifitäten (Rader *et al.* 1997; Broders *et al.* 2003). Die DNA-Bibliothek kodiert im Phageninneren auf einem Phagemid für Fusionsproteine bestehend aus Ziel- und Mantelprotein. Jeder M13-Phage präsentiert eine Variante eines Fusionsproteins auf der Oberfläche (Bakteriophagen-Bibliothek). Das Zielprotein und damit verbunden der Phage mit der DNA-Information bindet je nach Stringenz und Bindestärke an einen immobilisierten Liganden. Über mehrere *panning*-Runden wird auf diese Weise ein besserer Interaktionspartner selektiert. Im *bacterial display* (Francisco *et al.* 1993) werden Polypeptide, Oligosaccharide oder ganze Antikörper mit Ankerproteinen fusioniert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Eine Abwandlung davon stellt das *yeast cell surface display* (Boder *et al.* 1997) dar. Hierbei wird das Zielprotein mit AGA2 fusioniert und die Fusionsproteine dadurch auf der Zelloberfläche präsentiert. Das Durchmustern einer Bibliothek mit max. 10^6 (Hefe) bzw. 10^9 (Bakterien) Varianten erfolgt mittels *fluorescent-activated cell sorting* (FACS) und führt bspw. zur Isolation von hochaffinen Rezeptor-Liganden (Becker *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010). Das *two-hybrid* System wurde ursprünglich, basierend auf dem Gal4 Transkriptionsfaktor zur Selektion von Protein-Protein-Interaktionspartnern in Hefe entwickelt (Fields *et al.* 1989). Das Zielprotein, hier als Beuteprotein (*prey*) bezeichnet, sowie das Köderprotein (*bait*) werden mit Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne von Gal4 fusioniert. Gelangen sie durch *bait-prey*-Interaktion in räumliche Nähe, so wird ein Reporter exprimiert und vermittelt der Zelle einen Wachstumsvorteil. Da dieses System im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, wird das Prinzip im Ergebnisteil detailliert erläutert. Aus dem *yeast two-hybrid* System entwickelten sich auch bakterielle Systeme. Je nach Ursprung des *prey*-Proteins oder Toxizitätseffekten können pro- oder eukaryontische Selektionssysteme genutzt werden (Joung *et al.* 2000; Albers *et al.* 2005).

1.3 Zielsetzung

Die zielgerichtete Evolution von Proteinen erfolgt bislang durch separat durchgeführte Mutations- und Selektionsverfahren. Die Generierung von Genbibliotheken ist ebenso wie das anschließende *screening* zeit- und kostenintensiv, so dass in der Regel nur ein bis zwei aufeinanderfolgende Selektionsrunden durchgeführt werden und die Anzahl an zu durchmusternden Varianten auf maximal 10^{11} begrenzt ist. Ziel dieser Arbeit war es, Mutation, Selektion und Replikation zeitlich und räumlich zu koppeln, um ein eigenständiges und kontinuierliches Evolutionssystem zur Verbesserung von Protein-Protein-Interaktionspartnern zu etablieren. Proteinvarianten sollen *in vivo* generiert, selektiert und die „Gewinner“ der Selektionsrunde weiter mutiert werden. Diese treten dann in den nächsten Evolutionszyklus ein, bis schließlich das optimale Bindepaar entstanden ist und den Genpool dominiert. Dieser Prozess kommt der natürlichen Evolution durch Generierung neuer Varianten und gleichzeitiger Selektion über viele Generationen (= Evolutionsrunden) hinweg, sehr nahe. Das Potenzial der schrittweisen Optimierung soll genutzt werden, um aus einer sehr großen Anzahl an theoretisch möglichen Varianten den besten Kandidaten zu identifizieren, unabhängig von Kenntnissen zur Proteinstruktur.

Zur Affinitätsselektion sollte das *yeast two-hybrid* (Y2H) System genutzt werden. Als etabliertes eukaryontisches Selektionssystem bietet es Vorteile bezüglich Faltungshelfern (Chaperone) und posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung. Zur Kopplung des Selektionssystems mit einem Replikations- und Mutationssystem galt es folgende Punkte zu etablieren:

- Endogene Generierung kodierender Nukleinsäure-Varianten auf DNA- oder RNA-Ebene
- Gewährleistung einer genügend hohen Mutationsrate
- Bevorzugte Replikation der „Gewinner“
- Auslesen der Protein-Protein-Interaktionsstärke über das Wachstumsverhalten der Hefezelle
- Schrittweise Verbesserung der Protein-Protein-Interaktion soll autonom und kontinuierlich, also über zahlreiche Generationen hinweg stabil ablaufen

Die autonome, kontinuierliche Evolution sollte folgendermaßen ablaufen: Hefezellen, in die ein fehlerbehaftetes Replikations-/Mutationssystem eingepasst wurde, werden mit genetischen Informationen für beide Protein-Protein-Interaktionspartner *bait* und *prey* transformiert. Ausgehend von langsam wachsenden Hefezellen mit einem schwachen *bait-prey*-Interaktionspaar werden endogen durch *prey*-spezifische Zufallsmutagenese während der Replikation viele Nukleinsäure-Varianten generiert. Stille Mutationen bringen keine unmittelbaren Wachstumsvorteile mit sich. Mutationen, die die *bait-prey*-Affinität negativ beeinflussen, resultieren in einem Wachstumsnachteil für die Hefezelle. Einige wenige *prey*-Varianten werden allerdings eine erhöhte Affinität zu *bait* besitzen, was den Hefezellen zu Wachstumsvorteilen verhilft und somit zur Anreicherung in der Hefekultur führt. Diese „Gewinner“ sind der Ausgangspunkt für weitere Mutationen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Organismen

2.1.1.1 Bakterienstämme

Die Genotypen der verwendeten *E. coli* K12 Stämme sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1. *E. coli* K12 Derivate

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold® <i>Ultracompetent cells</i>	TetrD(<i>mcrA</i>) 183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lac</i> q _Z <i>DM15</i> Tn 10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> Max Efficiency® DH10B™	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 _{lacZ} <i>ΔM15</i> Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ- rpsL nupG</i> /pMON14272 / pMON7124	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 competent cells	F' <i>ompT hsdSB(rB- mB-)</i> <i>gal dcm</i>	Novagen

2.1.1.2 Hefestämme

Die Genotypen der verwendeten Stämme sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
AH109	MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1</i>	Clontech
Y2HGold	MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-Aur1-C, MEL1</i>	Clontech
2928-4	<i>his3, trp1, ura3, 20SRNA-o, 23SRNA-o</i>	R. Esteban, Universität Salamanca, Spanien

2.1.2 Nukleinsäuren

2.1.2.1 Plasmide

Tab. 3 enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Plasmide.

Tab. 3. Plasmide

Datenbank-Nr. intern	Bezeichnung	Hersteller/Referenz	Marker ¹
V.031	pPCRScript (pSc)	Stratagene	<i>bla</i>
V.058	pBlueScriptKS(+) (pBlue)	Stratagene	<i>bla</i>
V.023	pGADT7-AD	Clontech	<i>bla/LEU2</i>
V.024	pGBK7-DNA-BD	Clontech	<i>kan/TRP1</i>
V.025	pGADT7-T	Clontech	<i>bla/LEU2</i>
V.026	pGBK7-p53	Clontech	<i>kan/TRP1</i>
V.027	pGBK7-Lam	Clontech	<i>kan/TRP1</i>
V.009	pRS313 (CEN/ARS)	Sikorski <i>et al.</i> (1989)	<i>bla/HIS3</i>
V.011	pRS315 (CEN/ARS)	Sikorski <i>et al.</i> (1989)	<i>bla/LEU2</i>
V.015	YCplac111 (CEN/ARS)	Sikorski <i>et al.</i> (1989)	<i>bla/LEU2</i>
V.003	pRS305 (integrativ)	Sikorski <i>et al.</i> (1989)	<i>bla/LEU2</i>
V.004	pRS306 (integrativ)	Sikorski <i>et al.</i> (1989)	<i>bla/URA3/</i>
C.222	pRS305K (integrativ)	M. Heinrich ³	<i>bla/LEU2/kan</i>
C.234	pRS306N (integrativ)	M. Heinrich ³	<i>bla/URA3/clonNAT^R</i>
V.070	pJH-Yes1wt	B. Asbach ²	<i>bla</i>
V.071	pJH-Yes1mut	B. Asbach ²	<i>bla</i>
V.072	TOPO-Sam68	B. Asbach ²	<i>bla</i>
V.075	pGEX-207 (Insectin 2)	B. Asbach ²	<i>bla</i>
V.076	pGEX-188 (Ras-GAP)	B. Asbach ²	<i>bla</i>

Datenbank-Nr. intern	Bezeichnung	Hersteller/Referenz	Marker ¹
C.569	pGK7-CYCp-Sam68	diese Arbeit	kan /TRP1
C.573	pRS315-AD-prey	diese Arbeit	bla/LEU2
C.571	pRS315-AD-Yes1wt	diese Arbeit	bla/LEU2
C.572	pRS315-AD-Yes1mut	diese Arbeit	bla/LEU2
C.615	pRS315-AD-Insectin	diese Arbeit	bla/LEU2
C.616	pRS315-AD-Ras-GAP	diese Arbeit	bla/LEU2
C.668	pRS315-AD-Yes1-Y177H	diese Arbeit	bla/LEU2
c.669	pRS315-AD-Yes1-D184G	diese Arbeit	bla/LEU2
C.670	pRS315-AD-Yes1-E191G	diese Arbeit	bla/LEU2
C.671	pRS315-AD-Yes1-W203R = pRS315-AD-Yes1-weak	diese Arbeit	bla/LEU2
C.413	pRS313-AL_LEU2optNSM	diese Arbeit	bla/HIS3
C.376	pGK7-TEFp-AIDflag	diese Arbeit	kan/TRP1
C.377	pGK7-TEFp-AID	diese Arbeit	kan/TRP1
C.378	pGK7-CYCp-AID	diese Arbeit	kan/TRP1
C.397	pGK7-CUPp-AID	diese Arbeit	kan/TRP1
C.398	pGA14-5'-UNG1-KanMX-UNG1-3'	diese Arbeit	bla/kan
C.569	pGK7-CYCp-Sam68	diese Arbeit	kan/TRP1
C.570	pGK7-CYCp-Sam68-TEFp-AID	diese Arbeit	kan/TRP1
C.693	pRS305K-TEFp-AID	diese Arbeit	bla/LEU2/kan
C.716	pIVEXMCS-AIDGSflag	diese Arbeit	bla
V.45	pIVEX-GFP	Roche	bla
C.085	pGK7-TEFp-20S-Ribo	diese Arbeit	kan/TRP1
C.087	pGK7-CYCp-20S-Ribo	diese Arbeit	kan/TRP1
C.110	pGK7-TEFp-23S-Ribo	diese Arbeit	kan/TRP1
C.133	pGK7-CYCp-23S-Ribo	diese Arbeit	kan/TRP1
C.224-C.231;	pGK7-AL_LeuOpt20S(Genomseq.anteile)	diese Arbeit	kan/TRP1
C.274-C.305	pGK7-AL_LeuOpt23S(Genomseq.anteile)	diese Arbeit	kan/TRP1
C.174-C.202;	pSc-AL_LeuOpt20S(Genomseq.anteile)	diese Arbeit	bla
C.236-C.267	pSc-AL_LeuOpt23S(Genomseq.anteile)	diese Arbeit	bla
C.325	pBlue-20SRibo	diese Arbeit	bla
C.326	pBlue-23SRibo	diese Arbeit	bla
C.403	YCplac111-ADH _p -S1-CYCp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2
C.415	YCplac111-ADH _p -S1-PGKp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2
C.414	YCplac111-CYCp-S1-PGKp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2
C.410	YCplac111-CYCp-S1-CYCp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2
C.419	pRS305K-ADH _p -S1-CYCp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2/kan
C.421	pRS305K-CYCp-S1-CYCp-Hfq	M. Heinrich ³	bla/LEU2/kan
C.453	pRS306N-TEFp-Ts-Tu-Q β	M. Heinrich ³	bla/URA3/clonNAT
C.546	pSc-Q β T1	diese Arbeit	bla
C.547	pSc-Q β T2	diese Arbeit	bla
C.548	pSc-Q β T3	diese Arbeit	bla
C.549	pSc-Q β T4	diese Arbeit	bla
C.550	pSc-Q β T5	diese Arbeit	bla
C.588-C.612	pSc-AL_RQ-IRES-LEU2opt-PA-RQ-Ribo	diese Arbeit	bla
C.617-C.626	pRS313_RQ-IRES-LEU2opt-PA-RQ-Ribo	diese Arbeit	bla/HIS3
C.389	pGK7-AL_kan-LEU2opt	diese Arbeit	kan/LEU2
C.392	pGK7-AL_ADE2-LEU2opt	diese Arbeit	kan/LEU2/ADE2
C.810	pEVH1-Sam68	diese Arbeit	bla
C.815	pGEX4T1-Yes1-wt	diese Arbeit	bla
C.816	pGEX4T1-Yes1-mut	diese Arbeit	bla
C.817	pGEX4T1-Yes1-weak	diese Arbeit	bla
C.818	pGEX4T1-Yes1-Vari4	diese Arbeit	bla

¹ Plasmidnomenklatur nach Novick *et al.* (1976), ² Universitätsklinikum Regensburg,

³ Geneart AG, Regensburg

2.1.2.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 4 nach Verwendungszweck geordnet dargestellt. Sie wurden von den Firmen Geneart AG oder Metabion bzw. *dirty bottle*-Oligonukleotide von der Firma ELLA Biotech bezogen und bei -20 C° gelagert.

Tab. 4. Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz
qcPCR zur Herstellung von Yes1-Varianten		
P.0995	YesNSM1_qc.fwd	GTCGCCCTGATGATCATGAAGCCCGTACCA
P.0996	YesNSM1_qc.rev	GTGGTACGGGCTTCATGATCATACAGGGCGAC
P.0997	YesNSM2_qc.fwd	GAAGCCCGTACCAACCGAAGGTTGTCTTTAAAAAG
P.0998	YesNSM2_qc.rev	CTTTTTAAAGGACAAACCTTCGGTGGTACGGGCTTC
P.0999	YesNSM3_qc.fwd	CCTTTAAAAAGGTGGACGTTCCAGATTATC

MATERIAL UND METHODEN

Nr.	Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz
P.1000	YesNSM3_qc.rev	GATAATCTGGAAACGTCACCTTTTAAAGG
P.1001	YesNSM4_qc.fwd	CAACACCGAAGGCATCGTGGGAAGCAGTC
P.1002	YesNSM4_qc.rev	GAACGTGCTTCCACCAGTCGCCTCGGTGTTG
	Nachweis und Sequenzierung von AD-prey	
P.0001	Std.fwd	GCCTCTTCGCTATTACGCCAG
P.0002	Std.rev	TTAGGCACCCAGGCTTAC
P.0038	NLS.Seq	AATATTGCTGATAGCTATTGTCC
P.0091	PADH.Seq1	TTGAAGAGGAAACAGCAATAGG
P.0092	PADH.Seq2	TGAAGTAATAATAGGCGCATGC
P.0492	pGADT7.fwd	TGTTAGAAAAATAGCGCTCTCG
P.0493	pGADT7.rev	GAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGC
	Nachweis und Sequenzierung von BD-bait	
P.0016	T7.Seq	TAATACGACTCACTATAGGGC
P.0494	pGBKT7.fwd3	GTGCCGAAAGCACTAAATCG
P.0495	pGBKT7.rev3	ACGCAATTAAATGTGAGTTACCTC
P.0795	Sam68.Seq480	ACTGAAAGAGCGAGTGCTGATAC
	Nachweis und Sequenzierung von pGBKT7-pAID	
P.0209	pGBKT7.fwd2	TTATTCTGTCTTTATTGCCG
P.0210	pGBKT7.rev2	CTATGAAAGGTTGGCTTCGG
	Amplifikation Qβ-templates für in vitro Test	
P.0003	M13-21	TGTAAAACGACGCCAGT
P.1165	Leu2opt_T1.rev	GGGTCAAGCCAAATCTTTTTAC
P.1166	Leu2opt _T2.rev	TGGGTCAAGCCAAATCTTTTTAC
P.1167	Leu2opt _T3.rev	TGGGAGGAGTGAGGGCAAAG
P.1168	Leu2opt.rev	TCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.0886	RQ135_CCC.rev	GGGCTAACAGTGCAGGTAACAC
P.1292	Q β End1.rev	ATCAGAGGATGCTGGCATTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1295	Q β End2.rev	ATCAGATTGCTTGAGAGAGAACTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1298	Q β End3.rev	ATCAGAACGGCTACCTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1301	Q β End4.rev	ATCAGAGAATCTGACTGTTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1304	Q β End5.rev	ATGCCAGCATCCTCTGATTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1307	Q β End6.rev	GATTCTCTCTGCAAGGAATCTGATTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1310	Q β End7.rev	GGTAGCCGTTCTGATTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
P.1313	Q β End8.rev	ACAGTCAGATTCTGATTCAAGCCAAATCTTTTTACTTC
	Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese von S. cerevisiae (fett gedruckte Nukleotide führen zu Basenaustausch)	
P.0774	Oligomut_LEU2opt.fwd1	CAACTCCAGAATT C ATGTC C GCTC
P.0775	Oligomut_LEU2opt.rev1	GAGCTGAC A ATGAATTCTGGAGTTG
P.0777	Oligomut_LEU2opt.fwd2	GAATT C ATGTCAGCTCAA
P.0778	Oligomut_LEU2opt.rev2	TTGGAGCTGAC A TGAATT
P.1082	Oligomut_LEU2opt.fwd3	CATGAC A GCTCCAAAAAAG
P.1083	Oligomut_LEU2opt.rev3	CTTTTGAGCTGTC A TG
P.1074	Oligomut_LEU2opt.fwd4	GCATACAATCACTCCAGAATT C ATGAC A
P.1075	Oligomut_LEU2opt.rev4	CTGTCATGAATTCTGGAGTTGATTGATGC
P.1068	Oligomut_LEU2opt.fwd5	CTCCAGAATT C ATGAC A GCTCCAAAAAAG
P.1069	Oligomut_LEU2opt.rev5	CTTTTGAGCTGTC A TGAATTCTGGAG
P.1080	Oligomut_LEU2opt.fwd6	CATGAC A GCTCCAAAAAAGATTGTTGTTAC
P.1081	Oligomut_LEU2opt.rev6	GTAAAACAACATCTTTTGAGCTGTC A TG
P.1072	Oligomut_LEU2opt.fwd7	CTATACCAAGCATACAATCAACTCCAGAATT C ATGAC A
P.1073	Oligomut_LEU2opt.rev7	CTGTCATGAATTCTGGAGTTGATTGATGCTGGTATAG
P.0779	Oligomut_LEU2opt.fwd8	P-ATCAACTCCAGAATT C ATGTCAGCTCCAAAAAAGATTGTT
P.0780	Oligomut_LEU2opt.rev8	P-AACAACTTTTGAGCTGAC A ATTCTGGAGTTGAT
P.1078	Oligomut_LEU2opt.fwd9	CATGACTGCTCCAAAAAAGATTGTTGTTACCAAGGTGATC
P.1079	Oligomut_LEU2opt.rev9	GATCACCTGGTAAAACAATCTTTTGAGCAGTC A TG
P.1014	Oligomut1_LEU2opt.fwd	P-GCTCCAAAAAATCGTTGTTACCAAGGTGA TCATGTAAGG
P.1015	Oligomut1_LEU2opt.rev	P-CCTACATGTCACCTGGTAAAACAACGATT T GGAGC
P.1016	Oligomut2_LEU2opt.fwd	P-TTACCAAGGTGATCATGTTAGGAC G AAATTACTGCTGAAGC
P.1017	Oligomut2_LEU2opt.rev	P-GCTTCAGCAGTAATT C TGCTCATGATCACCTGGTAA
P.1018	Oligomut3_LEU2opt.fwd	P-ATCAACTCCAGAATT C ATGTCAGC A CTAAG T TTGTTTACCA
P.1019	Oligomut3_LEU2opt.rev	P-CTGGTAAAACAACAAATT A ACTT A GGTGC A ATGAA T CTGGAGTTGAT
P.1020	Oligomut4_LEU2opt.fwd	P-ATCAACTCCAGAATT C ATGNNNNNNNNNN A TGAA T CTGGAGTTGAT
P.1021	Oligomut4 LEU2opt.rev	P-CTGGTAAAACAACAAATT C TMNNNNNNNNNN A TGAA T CTGGAGTTGAT

MATERIAL UND METHODEN

Nr.	Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz
P.1096	Yes1-weak_R203W.fwd	P-CAACAAACACCGAAGGAGATTGGTGGGAAGCAGCTCTATTG
P.1097	Yes1-weak_R203W.rev	P-CAATAGAACGTGCTTCCCACCAATCTCCTCGGTGTTGTTG
P.1242	Yes1-weak_dirty.fwd	GGTGAACGTTCCAGATTATCaacaacaccgaaGGAgatTGGTGGaaagcCcgttctattGCCACCGTAAACCGGT
P.1243	Yes1-weak_dirty.rev	ACCGTTTTTACCGGTCaatagaacgggcttcCACCAtcTCCttcggtttgttGATAATCTGAAACGTTACCC
P.1240	Yes1-mut_dirty.fwd	CTTGTGCGCCCTGTATGATTATgaagccgtaccaccgaaGATTGTCCTTAA
P.1241	Yes1-mut_dirty.rev	AAAAGGTGAACCGTACACCTTTAAAGGACAATCTtcgggtacgggcttaaTAATCATAAGGGCGACAAAG
Genomische Integrationen und Deletionen		
P.1036	KanMX4seq1.fwd	GCGATCCCCGGCAAAACAGC
P.0629	KanMX.Seq750	ATATGGTATTGATAATCCTGATATG
P.0575	KanMXloxP485.fwd	CGCAGACCGATAACCAGGATC
P.0576	KanMXloxP650.rev	GTAACATCATTGGCAACGCTACC
P.0386	natNT2seq1.fwd	CGTGGTCATCTCGTACTCGG
P.0660	natR.fwd	GGATCCCCGGGTTAATTAAAGGCGGCCAG
P.1160	leu2_3.fwd2	TGTTAACGTTCTTCGCCCTAC
P.1161	leu2_5.rev2	TAGAATTGCAAGATTCCCTTTATG
P.0093	Leu2.Seq3	TCATTAAATTGGTGGTGCCTGC
P.0112	Leu2.rev	TTAACGCAAGGATTCTTAACCTTC
P.0704	Ura3-3'.rev	GGTAATAACTGATATAATTAAATTGAAG
P.0705	Ura3-5'.fwd	GGTAATCTCGAACAGAAGGAAG
P.1013	ART1_800.fwd	GTTTCGTTAGCGACGACGTC
P.0919	ATR1_50.rev	TGCCCATGTCTATATAATCGC
P.0573	UNG1+603down.rev	GGTTGGAATCCCGTGGGTT
P.0574	UNG1-751up.fwd	GTTATGCGTCGGCTCCGGATC
P.0371	0707903seq1.fwd	GGTGATATTGAATTGGCTATTG
P.0372	0707903seq2.fwd	GACTGGTCAACCATTGTTATG
P.0373	0707903seq3.fwd	CGGAAGTTAGAGAATTGTTGTCTC
P.0374	0707903seq4.fwd	GGTGTAGAAATGGTAATGCCAG
P.0375	0707903seq5.fwd	GGTGATGTTCCATCTGTTGAG
P.0376	0707903seq6.fwd	CTTTGGCTCGTTCTGTTGTG
P.0377	0707903seq7.fwd	GCTATTGATCAATTGATTGTCG
P.0388	0708293seq4.fwd	GGCTAAAGGCAATCTTTC
P.1162	AID.fwd	AACTGGTACCATATGGATTCTTG
P.1163	AID.rev	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC
Oligonukleotidstabilität		
P.0921	Leu2optNMS_PCR1.fwd	GCTCCAAAAAAAGATTGTTGTTTAC
P.0922	Leu2optNMS_PCR2.fwd	CCAAGCATACAATCAACTCCAGAATTACAGTC
P.0923	Leu2optNMS_PCR1u2.rev	TGGTGGTCATGTTGCAAAGC
Klonierung 20S- und 23S-Konstrukte		
P.0174	Kpn_PLeu.fwd	TGATAGCGGTGGTACCAACTGTGGAAATACTCAGGTATCG
P.0175	PLeu_EcoR_20S.rev	CACCCCCGAATTCTAGAATGGTATATCCTGAAATAT
P.0176	EcoR_20S_LeuOpt.fwd	ATTCTAGAATTCCGGGCTGATCCCCTGCTGCTCCAAAAAAGATTG
P.0177	LeuOpt_20SRibo.rev	TGCCGACCCGGGGCGTGGCCTCAAGCCAAATCTTTTACTTC
P.0178	20S_Ribo.fwd	GGCCACGGCCCCGGGTGGCATGG
P.0179	Ribo_Cla_TLeu.rev	GAGAATCTTATCGATCTCCCTAGCCATCCGAGTGG
P.0180	Cla_TLeu.fwd	ATCGATAAAGATTCTCTTTTATGATATTG
P.0181	TLeu_Sac.rev	ATTCGCCGCGAGCTCCTACCCCTATGAACATATTCC
P.0182	Kpn_PADH.fwd	TGATAGCGGTGGTACCTCGCAGTCGAGATCCGGG
P.0183	PADH_EcoR.rev	CAGCCCCGAATTCTGGAGTTGATGCTGCTTGG
P.0184	Cla_TADH.fwd	GGCTTGAATCGATAGCTTGGACTTCTCGCCAGA
P.0185	TADH_Sac.rev	ATTCGCCGCGAGCTCGCCGGTAGAGGTGTGGTC
P.0186	LeuOpt_20S_Cla.rev	TGATATCGATGGGGCGTGGCCTCAAGCCAAATCTTTTACTTC
P.0187	EcoR_23S_LeuOpt.fwd	ATTCTAGAATTCCGGGCGATGCTGCTCCAAAAAAGATTG
P.0188	LeuOpt_23SRibo.rev	ATGCCGACCCGGGGCTCAAGCCAAATCTTTTACTTC
P.0189	23S_Ribo.fwd	GCTTGAGCCCGGGTCGGCATGGCATCTCCAC
P.0190	LeuOpt_23S_Cla.rev	TGATATCGATGGGGCTCAAGCCAAATCTTTTACTTC
mRNA-Nachweis		
-	Dynabeads® Oligo(dT)25 (Invitrogen)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
P.0646	LeuOpt740.fwd	CTAACATGTTCGGTGATATTACAGTGATG

Nr.	Bezeichnung	5' - 3'-Sequenz
Nachweis und Sequenzierung von ADH_p-LEU2optNSM		
P.0001	Std.fwd	GCCTCTTCGCTATTACGCCAG
P.0002	Std.rev	TTAGGCACCCAGGCTTTAC
P.0091	PADH.Seq1	TTGAAGAGGAAACAGCAATAGG
P.0092	PADH.Seq2	TGAAGTAATAATAGGCGCATGC
P.0751	PADH_1450.fwd	ATACCAAGCATAACAATCAACTCC
P.0345	Leu2Opt.Seq570	GGATAAGGCAAACGTTTAGC
RNA cloning		
P.1229	Kpn_sRNAP1.fwd	TTTTGGTACCGAGCGGCCGAAG
P.1230	sRNAP2_Sac.rev	AAAAGAGCTCCTATAGGCGGCCACC

2.1.2.3 Synthetische Gene

Synthetisch hergestellte Gene wurden über die Firma Geneart AG bezogen. Die *codon usage* der Gene wurden gegebenenfalls auf die von *S. cerevisiae* angepasst (8.2). *LEU2opt* und *TRP1opt* wurden auf Nukleinsäureebene so unähnlich wie möglich zum wildtypischen Gen gestaltet.

Tab. 5. Synthetische Gene

Bestell-Nr.	Gen	Ursprungs-Organismus	Datenbank-Nr.
0720054	AID-flag	<i>Homo sapiens</i>	NP_065712
0720055	AID	<i>Homo sapiens</i>	NP_065712
	Qβ-Untereinheit	Qβ-Phage	AAM33128
0707903	Tu	<i>E. coli</i>	NP_312930
	Ts	<i>E. coli</i>	NP_285864
0708293	S1	<i>E. coli</i>	NP_286786
	Hfq	<i>E. coli</i>	NP_290802
0704360	LEU2opt	<i>S. cerevisiae</i>	NP_009911
083862	TRP1opt	<i>S. cerevisiae</i>	NP_010290
0705372	20S	20S Virus aus <i>S. cerevisiae</i>	AF039063
0705371	23S	23S Virus aus <i>S. cerevisiae</i>	U90136

2.1.3 Antikörper

Tab. 6 enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Antikörper.

Tab. 6. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller; Bestell-Nr.
Primärantikörper		
anti-flag Epitope tag (rabbit)	1:500	Dianova; PA1-984B
anti-cMyc monoclonal antibody (Clone 9E10) (mouse)	1:250	Clontech; 631206
anti-HA tag polyclonal antibody (rabbit)	1:200	Clontech; 631207
anti-AICDA (residues 1-100) polyclonal antibody (rabbit)	1:1.000	Abcam; ab5197
anti-AICDA polyclonal antibody (goat)	1:5.000	Biozol; LS-C54462/16980
anti-Gal4 monoclonal antibody (mouse)	1:5.000	Clontech; 630402
anti-cdc28 (y-40) polyclonal antibody (rabbit)	1:250	Santa Cruz; sc-28550
horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-GST polyclonal antibody (rabbit)	1:25.000	Biomol/Rockland; 600-103-200
Sekundärantikörper		
HRP conjugated (goat) anti-rabbit IgG	1:5.000	Pierce, 31105
HRP conjugated (goat) anti-mouse IgG	1:5.000	Sigma, A4416
HRP conjugated (rabbit) anti-goat IgG	1:5.000	Pierce, 31402

Antikörper	Verdünnung	Hersteller; Bestell-Nr.
Gekoppelte Agarose anti-flag M2 Agarose beads	-	Sigma, A2220

In Tab. 7 sind die Säulenmaterialien aufgeführt, die zur Aufreinigung von Proteinen genutzt wurden.

Tab. 7. Säulenmaterial zur Aufreinigung von Proteinen

Säulenmaterial	Hersteller
TALON® Metal Affinity Resin	Clontech
GST-Tag Purification Resin	Clontech

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Tab. 8 enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und ihrer Bezugsquellen.

Tab. 8. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat-Lösung für ELISA	Sigma-Aldrich
3'3'-Diaminobenzidin (DAB)	Roth
3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)	Sigma-Aldrich
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Roth
Agarose	Serva
alpha-D(+) Glucose-Monohydrat	Roth
Ampicillin Natriumsalz (Amp)	Roth
Aureobasidin A (AbA)	Clontech
Billiant Blau R 250	Roth
BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate	Roche
Borsäure	Roth
Bovine serum albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau Indikator	Merck
Calciumchlorid	Roth
Citronensäure	Roth
Deoxynucleotide Solution Mix (40 mM)	NEB
Deoxyribonucleic Acid sodium from Salmon Testes = Salmon Testes Carrier DNA (ssDNA)	Sigma-Aldrich
DEPC-H ₂ O	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D-Saccharose	Sigma-Aldrich
D-Sorbit	Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylmethansulfonat (EMS)	Roth
Geneticidisulfat (G418)	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanosin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kanamycinsulfat (Kana)	Roth
Laugen	Roth
LB-Medium (Lennox)	Roth
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich
Lithiumacetat Dihydrat	Sigma-Aldrich
Lithiumchlorid	Roth
Lösungsmittel	Roth
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid	Finnzymes
Magnesiumsulfat	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich
Nourseothricin Dihydrogensulfat (clonNAT)	Werner Bioagents

Chemikalie	Hersteller
Pepton	Roth
PIPES	Roth
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences
<i>Ribonucleotide Solution Mix (NTPs, 80 mM)</i>	NEB
Säuren	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Sorbitol	Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
TritonX-100	Roth
Trypton	Roth
Tween20	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth
X- α -GAL	Roth
Xylencyanol Indikator	Merck
Yeast Nitrogen Base	BD
<i>Yeast Synthetic Drop Out Amino Acid Mix</i>	Clontech, Sigma-Aldrich
Yeast Peptone Dextrose (YPD)	Roth
Weitere Chemikalien	Sigma-Aldrich

Die verwendeten kommerziellen Reagenzsysteme sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9. Kommerzielle Reagenzsysteme

Reagenzsystem	Hersteller
Access RT-PCR System	Promega
<i>ExactSTART™ End-Tagged Double-Strand cDNA Synthesis Kit for small RNA</i>	Epicentre
<i>EZNA Yeast RNA Kit</i>	Omegabiotek
<i>MinElute PCR Purification Kit</i>	Qiagen
PCR Master Mix	Promega
<i>Pure Yield™ Plasmid Midiprep System</i>	Promega
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
RTS 100 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche

In Tab. 10 sind die verwendeten Enzyme dargestellt.

Tab. 10. Enzyme

Enzym	Hersteller
Benzonase Nuklease (25.000 U/ml)	Merck
<i>Calf intestinal alkaline phosphatase (10.000 U/ml)</i> mit Puffer	NEB
DNase mit Puffer (2.000 U/ml))	NEB
DNase Set EZNA (1.000 U/ml)	VWR
KAPA2G Robust (5.000 U/ml) mit Puffer	PEQLAB
Lytikase aus <i>Arthrobacter luteus</i> (200.000 U/ml)	Sigma-Aldrich
<i>Murine RNase Inhibitor</i> (40.000 U/ml)	NEB
<i>PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase</i> (2.500 U/ml)	Stratagene
Phi6 RNA Replikase (1.000 U/ml)	Finnzymes
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase</i> (2.000 U/ml) mit Puffer	Finnzymes
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor cocktail tablets	Sigma-Aldrich
Q β -Replikase (1.000 U/ml)	Biozym
Restriktionsendonukleasen (5.000 – 20.000 U/ml) mit Puffer und BSA	NEB
T4 DNA Ligase (400.000 U/ml) mit Puffer	NEB
T7 RNA Polymerase (50.000 U/ml) mit Puffer	NEB

In Tab. 11 sind die verwendeten Größenstandards für die Elektrophorese aufgelistet.

Tab. 11. Größenstandards für die Elektrophorese

Größenstandard	Hersteller	Anwendung	Größenbereich
<i>2log DNA Ladder</i>	NEB	Agarosegel	100 - 10.000 bp
<i>GelPilot HighRange Ladder</i>	Qiagen	Agarosegel	250 – 15.000 bp
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas	SDS-PAGE	10 - 250 kDa

2.1.5 Medien

Alle Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser (Astacus, *membraPure*) angesetzt und 30 min bei 121°C autoklaviert.

Tab. 12. Medien zur Anzucht von *E. coli*

Medium	Endkonz.
LB ₀ (Luria Broth)	0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) Pepton 171,0 mM NaCl 27,0 mM Glucose (optional)
dYT-Medium	1,0% (w/v) Hefeextrakt 1,6% (w/v) Trypton 85,0 mM NaCl
SOB-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 2,0% (w/v) Trypton 8,6 mM NaCl 10,0 mM MgCl ₂ * 10,0 mM MgSO ₄ * 2,5 mM KCl*
SOC-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 2,0% (w/v) Trypton 22,0 mM Glucose 8,6 mM NaCl 10,0 mM MgCl ₂ * 10,0 mM MgSO ₄ *

* sterilfiltriert; wurde nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1% Agar-Agar zugegeben.

Tab. 13. Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

Medium	Endkonz.
YPDA (yeast peptone dextrose adenine) = Vollmedium	5,0% (w/v) YPD 3,3 mM Adeninhemisulfat
Minimalmedium (<i>Synthetic Drop Out</i>), pH 5,8	0,7% (w/v) Yeast Nitrogen Base without aminoacids 0,2% Yeast Synthetic Drop Out Amino Acid Mix 3,3 mM Adeninhemisulfat

Zur Herstellung von Festmedien wurde 2% Agar-Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf 55°C wurde Glukose zugegeben (1% Endkonz.).

Zur Selektion wurde dem Medium eine entsprechende Menge an Antibiotikum zugegeben (Tab. 14).

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Tab. 14. Antibiotikum-Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz.	
		Flüssigkultur	Festmedien
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
G418	50 mg/ml	--	200 µg/ml
clonNAT	100 mg/ml	--	100 µg/ml

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind nach Anwendungsbereichen sortiert.

Tab. 15. Puffer zur Herstellung chemokompetenter Bakterien

Puffer	Endkonz.
TB-Puffer, pH 6,7	10,0 mM PIPES
	15,0 mM CaCl ₂
	85,0 mM MgCl ₂

Tab. 16. Puffer zur Elution von DNA

Puffer	Endkonz.
EB	10,0 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA, pH 8,0

Tab. 17. Puffer für die Gelelektrophorese von Proteinen

Puffer	Endkonz.
10x SDS-Laupuffer	25,0 mM Tris 192,0 mM Glycin 0,1% (v/v) SDS
5x SDS-Probenpuffer	2,0% (v/v) SDS 10,0% (w/v) Glycerin 1,0% (w/v) Bromphenolblau 5,0% (v/v) β-Mercaptoethanol

Tab. 18. Lösungen zum Färben und Entfärben von SDS-Gelen

Lösung	Endkonz.
Coomassie-Färbelösung	45,00% (v/v) Ethanol 10,00% (v/v) Essigsäure 0,25% (w/v) Brillant Blau R 250
Entfärbelösung	26,00% (v/v) Ethanol 7,00% (v/v) Essigsäure

Tab. 19. Lösungen für den Proteinnachweis mittels *Western Blot*

Lösung	Endkonz.
Proteintransferpuffer	1x SDS-Laupuffer 20,0% (v/v) Methanol
10x TBS	248,0 mM Tris 27,0 mM KCl 1,4 M NaCl
TBS-T	1x TBS 0,1% Tween20
Blocklösung	1x TBS-T 5% Magermilchpulver
DAB-Färbelösung	50,00 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% (w/v) DAB 0,06% (v/v) H ₂ O ₂

Tab. 20. Lösungen für die Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Lösung	Endkonz.
Gelauftragspuffer (10 x)	49,5 mM (w/v) Tris-HCl, pH 7,6 51,6% (v/v) Glycerin 25,0% (w/v) Bromphenolblau 25,0% (w/v) Xylencyanol
TBE-Puffer (10 x)	890,0 mM Tris 890,0 mM Borsäure 25,0 mM EDTA
Agarosegel-Lösung 0,8 - 1,0%	0,5x TBE 0,800 - 1,000% (w/v) Agarose 0,005% (w/v) EtBr 0,100 mM Guanosin

Tab. 21. Lösungen für Transformation von *S. cerevisiae*

Lösung	Endkonz.
Spheroblastenpuffer A	50,0 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,0 mM MgCl ₂ 30,0 mM DTT 15,0 mM β -Mercaptoethanol 1,0 M Sorbitol
YPDA-Sortibol	YPDA 1M Sorbitol
10x TE	100,0 mM Tris-HCl, pH 8,0 10,0 mM EDTA
ssCarrier DNA	1x TE 2,0% (w/v) <i>salmon testes</i> carrier DNA → ÜN bei 4°C röhren; vor Gebrauch 5 min bei 95°C denaturiert

Tab. 22. Aufschlusspuffer für *S. cerevisiae*

Puffer	Endkonz.
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% TritonX-100 1 Tablette Proteaseinhibitor
Alkalischer Lysepuffer	1,85 M NaOH 7,50% β -Mercaptoethanol

Tab. 23. Reinigung von mRNA aus Gesamt-RNA durch *Dynabeads® Oligo(dT)₂₅* (Invitrogen)

Puffer	Endkonz.
Binding buffer	20,00 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,00 M LiCl 2,00 mM EDTA
Washing buffer B	10,00 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M LiCl 1,00 mM EDTA

Tab. 24. Puffer für ELISA zur Bestimmung der Dissoziationskonstante

Puffer	Endkonz.
Blocking buffer	1x PBS 5% BSA
Waschpuffer	1x PBS 0,05% Tween 20

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 25 aufgelistet.

Tab. 25. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 well Aufreinigungsplatte <i>MultiScreen® PCRμ96</i>	Millipore
Bottle-Top Filter	Fisher
Combitips plus (0,1 ml, 1 ml, 5 ml), steril	Eppendorf
Copper Coated, High Binding Capacity Plates (clear, 96-well)	Pierce
Einmal-Impfösen, 0,1 μ l	Roth
Einmalspritzen	Braun
Elektroporationsküvetten Gene Pulser (1 mm, 2 mm)	Bio-Rad
Falkons (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Filterpapier, 2,5 μ m	Whatman
Glasperlen (0,25 - 0,50 mm und 2,85 - 3,3 mm)	Roth
Gradientengele 4 – 20% Tris-Glycin	Invitrogen
LBamp-Platten	Universitätsklinikum
LBKana-Platten	Universitätsklinikum
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt
Mikrotiter-Platten	Nunc

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Nitrocellulose-Membran Protran BA 85, 0,45 µm	Whatman
PCR-Folie <i>Adhesive PCR Film</i>	ABgene
PCR-Platte 96-well <i>Multiply®</i>	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäß	Anthos Mikrosysteme
PD-10 <i>Desalting Columns</i>	GE Healthcare
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)	Sarstedt, Kisker, Eppendorf
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Anthos Mikrosysteme
Serologische Pipetten (10 ml, 25 ml)	Roth
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Roth
UV-Küvetten	Eppendorf

2.1.8 Geräte

In Tab. 26 sind die verwendeten Geräte dargestellt.

Tab. 26. Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
96 well Plattenauswerter	Infinite M200	Tecan
Analysewaage	SI-203	Denver Instrument
Autoklav	Systec V-150	Systec
AutoRep	E Rainin	Mettler Toledo
Brutschrank	B12	Heraeus
Chemilumineszenz <i>Imager</i>	Chemocam HR 16	Intas
Elektrophorese-Apparaturen		Bio-Rad
		Bio-Rad
		Biometra
		Bio-Rad
		Bio-Rad
		Biometra
		Consort
		Bio-Rad
		Intas
		Eppendorf
		Invitrogen
		Heidolph
		Mettler Toledo
		Brand
		Roth
		Scientific Industries
		Edmund Bühler
		Bio-Rad
		Biometra
		Schott Instruments
		Gilson
		<i>membraPure</i>
		Canon
		Infors AG
		Applied Biosystems
		Eppendorf
		Clean Air
		Scientific Industries
		Bandelin electronic
		Roth
		C.B.S. Scientific
		Eppendorf
		Roth

2.1.9 Software

Tab. 27 enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Software-Programme sowie deren Hersteller.

Tab. 27. Software

Software	Verwendung	Hersteller
BioEdit <i>Sequence alignment Editor</i>	Erstellen von DNA- und Aminosäuresequenz-alignments	BioEdit
Chromas 2.31	Darstellung von Sequenzierdaten	Technelysium Pty Ltd
MS Office XP	Erstellen von Abbildungen/ Dokumenten	Microsoft Corporation
pDraw32	<i>In silico</i> Klonierung	AcaClone
Scion Image	Proteinbanden-Quantifizierung	Scion Corporation
SeqMan TM Pro	DNA-Sequenzanalyse	DNAstar
VectorNTI Advance TM 10	Erstellung von Vektorkarten	Invitrogen

2.1.10 Firmen**Tab. 28. Firmen**

Firma	Standort
Abcam	Cambridge, MA, USA
Anthos Mikrosysteme GmbH	Krefeld, D
B. Braun AG	Melsungen, D
Bandelin <i>electronic</i>	Berlin, D
BD	Franklin Lakes, NJ, USA
Biometra® GmbH	Göttingen, D
Biozym	Hamburg, D
Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, D
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, D
Clontech/ TAKARA BIO INC	Mountain View, CA USA
Denver Instrument GmbH	Göttingen, D
Dianova	Hamburg, D
DNAstar	Madison, WI, USA
Edmund Bühler GmbH	Hechingen, D
ELLA Biotech GmbH	Martinsried, D
Epicentre	Madison, WI, USA
Eppendorf AG	Hamburg, D
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, D
Finnzymes	Espoo, FIN
Fisher Scientific GmbH	Schwerde, D
GATC Biotech AG	Konstanz, D
GE Healthcare	Fairfield, CT, USA
Geneart AG	Regensburg, D
Gilson International B.V.	Limburg-Offheim, D
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, D
Infors AG	Bottmingen-Basel, CH
Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen, D
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, D
<i>membrapur</i>	Bodenheim, D
Merck KGaA	Darmstadt, D
Metabion GmbH	Martinsried, D
Mettler Toledo	Giessen, D
Millipore	Eschborn, D
New England BioLabs, Inc.	Frankfurt, D
Novagen	Madison, WI, USA
PEQLAB Biotechnologie GMBH	Erlangen, D
Pierce	Rockford, IL, USA
Polysciences	Warrington, PA, USA
Promega	Mannheim, D
Qiagen	Hilden, D
Sarstedt	Nümbrecht, D
Schleicher & Schuell BioScience GmbH	Dassel, D
Schott Instruments GmbH	Mainz, D
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, D
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, D
Stratagene	Heidelberg, D
VWR	Darmstadt, D
Whatman	Maidstone, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) einer Bakterienkultur wurde photometrisch über die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht eine $OD_{600} = 1$ einer Bakteriendichte von 1×10^9 Zellen/ml (Sambrook *et al.* 2001).

2.2.1.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

10 ml dYT-Medium wurde mit einem *E. coli* Einzelklon angeimpft und üN bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Mit der Vorkultur wurde 1 Liter SOB-Medium auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \sim 1,0$ bei 19°C geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2.600 g geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 60 ml TB-Puffer resuspendiert und weitere 10 min in Eiswasser inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3.200 g für 10 min wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer gelöst und mit 1,4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Die Zellen wurden in 100 μ l-Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

10 ml LB-Medium wurde mit einem *E. coli* Einzelklon angeimpft und üN bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Mit der Vorkultur wurden 750 ml LB-Medium auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 geschüttelt. Die Kultur wurde in sterile Zentrifugenbecher umgefüllt und für 30 min in Eiswasser inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation bei 4°C und 4.000 rpm für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 ml und anschließend in 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 10 ml 10%igem Glycerin gewaschen und schließlich in 4 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und in Reaktionsgefäßportioniert. Die 100 μ l-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Transformation chemokompetenter Bakterien

Zum Einbringen von DNA in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden 50 μ l Zellen mit 0,5 μ l Plasmid-DNA oder 20 μ l Ligationsansatz (50 - 200 ng DNA) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 sec im Thermomixer. Bei Selektion auf Kanamycin-Resistenz wurde 500 μ l LB-Medium zugegeben und bei 37°C für 1 h im Thermomixer bei 550 rpm geschüttelt und anschließend auf Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden üN bei 30°C inkubiert. Die Platten wurden im Kühlschrank bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

2.2.1.5 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Plasmide, die aus Hefe isoliert wurden, wurden durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen DH10B vereinzelt. 50 μ l Zellen wurden mit 1 - 10 μ l Plasmid-DNA (0,5 - 3 μ g) auf Eis gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 1,8 kV,

einem Widerstand von 600 Ohm, einer Kapazität von 10 μ F und einer Pulsdauer von 3 - 4 msec durchgeführt. Anschließend wurden 400 μ l vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben, die Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C im Thermomixer bei 500 rpm geschüttelt. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurde der regenerierte Transformationsanatz auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden im Kühlschrank bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

2.2.1.6 Lagerung von *E. coli*-Kulturen

E. coli-Ausstriche auf Agarplatten wurden bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden Übernachtkulturen mit sterilem Glycerin versetzt (20% Endkonz.) und bei -80°C gelagert.

2.2.1.7 Plasmidisolation aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus 15 - 50 ml *E. coli*-Kultur wurde mit dem *Pure YieldTM Plasmid Midiprep System* (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 μ l EB-Puffer. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.2 Hefen

2.2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte von Hefekulturen

Das Wachstum von *S. cerevisiae* in Flüssigkultur wurde photometrisch über die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ = 1 einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml (Treco *et al.* 1993).

2.2.2.2 Kultivierung von Hefen in Flüssigmedium

10 ml Flüssigmedium wurde mit Hefeklonen von Agarplatten angeimpft und üN bei 30°C und 190 rpm geschüttelt (= Vorkultur). Nicht-transformierte Hefestämme wurden in YPDA-Vollmedium inkubiert. Bei Hefestämmen, die mit einem Plasmid (Plasmid-Prototrophiomarker *TRP1*, *LEU2* oder *HIS3*) oder mit den beiden Y2H Plasmiden pGBKT7-BD-*bait* (Plasmidmarker *TRP1*) und pGADT7-AD-*prey* bzw. pRS315-AD-*prey* (Plasmidmarker *LEU2*) transformiert wurden, wurde Minimalmedium verwendet, in dem die entsprechende Aminosäure die durch den/die Plasmidmarker kodiert ist, nicht enthalten war (*Drop Out* Medium DO Trp, DO Leu, DO His bzw. DO TrpLeu). Somit konnten in der Vorkultur alle Hefen wachsen, die ein oder zwei Plasmide aufgenommen hatten, ungeachtet ob Protein-Protein-Interaktion stattfindet oder nicht.

Die 20 ml Hauptkultur wurde mit einer Anfangs-OD₆₀₀ = 0,1 gestartet. Bei nicht-transformierten Hefestämmen wurde wiederum YPDA verwendet. Transformierte Hefestämme wurden entsprechend dem/den Plasmidmarker(n) in *Drop Out* Medium kultiviert. Bei Überprüfung der Y2H Interaktion wurde das Minimalmedium so gewählt, dass für das Wachstum nicht nur die Expression der Plasmid-kodierten Marker *TRP1* und *LEU2* notwendig war, sondern auch Reportergene des genomischen Y2H Systems aktiviert sein mussten. Beim Test auf Expression von *HIS3* wurde Histidin-freies

Minimalmedium (DO TrpLeuHis) verwendet bzw. zur Erhöhung der Stringenz 3-Aminotriazol (3-AT) im millimolaren Bereich zugesetzt (z. B. DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT). Beim Test auf Expression von *Aur1-C* wurde Aureobasidin A (AbA) im nanomolaren Bereich zugesetzt (z. B. DO TrpLeuHis/64 nM AbA). Sobald die Hauptkultur die stationäre Phase ($OD_{600} > 3$) erreichte, wurde sie erneut mit einer Anfangs- $OD_{600} = 0,1$ in frisches Medium überimpft.

2.2.2.3 Transformation mit PEG/LiAc

Die Transformation von Hefe wurde nach (Gietz *et al.* 2002) durchgeführt.

Eine Hefekolonie (ca. 0,5 cm im Durchmesser) wurde üN in 10 ml 2-fach konzentriertem YPDA-Medium bei 30°C und 190 rpm geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml 2-fach YPDA mit einer $OD_{600} = 0,5$ angeimpft und für 3 - 5 h geschüttelt. Die Hefezellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden durch Zentrifugation bei 3.000 g für 5 min geerntet, mit 20 ml Wasser und im Anschluss mit 1 ml gewaschen. Die gewaschenen Hefezellen ($\sim 10^8$) waren kompetent, um Plasmid-DNA aufzunehmen. Pro Transformationsansatz wurden 100 μ l Zellen pelletiert und mit dem in Tab. 29 aufgeführten Transformationsmix resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde kräftig gevortext, 40 min bei 42°C inkubiert und dann die transformierten Hefezellen abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und auf Selektionsplatten entsprechend den Plasmidmarkern bzw. Y2H Selektionsmarkern ausplattiert. Die Transformationsplatten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert bzw. 3 Tage, wenn die Selektionsplatten 3-AT (3-Aminotriazol) oder AbA (Aureobasidin A) enthielten. Einzelkolonien wurden auf neuen Agarplatten ausgestrichen und weitere 2 Tage bebrütet. Agarplatten wurden bis zu 4 Wochen bei RT oder 4°C gelagert.

Hefen können mit mehr als einem Plasmiden transformiert werden, entweder nacheinander oder gleichzeitig (Kotransformation). Die (Ko-)Transformationsrate wurde bestimmt aus der Anzahl an Kolonien auf den Selektionsplatten pro eingesetzter Gesamtzellzahl und pro μ g DNA. Die Transformationsrate von Plasmid-DNA betrug in der Regel 10^5 , die Kotransformationsrate 10^3 . Die (Ko-)Transformanten wurden entsprechend ihrer Stammes und ihrer heterolog exprimierten Proteine bezeichnet. Beispiel: AH109-*bait/prey* bedeutet, AH109 wurde mit pGBK7-*bait* und pGADT7-*prey* kotransformiert.

Tab. 29. Transformationsmix

Komponente	Volumen [μ l]
50% PEG 3350 (w/v)	240
1 M LiAc	36
ssCarrier DNA (2 mg/ml)	50
Plasmid (100 ng/ μ l)	1 – 10
H ₂ O	ad 360

2.2.2.4 Elektroporation von *S. cerevisiae*

Methode I – Herstellung von Spheroberblasten nach Everett (1992)

15 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur ($OD_{600} < 2$) wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4.000 g geerntet, in 5 ml Spheroberblastenpuffer A resuspendiert, mit 100 Units Lytikase versetzt und 10 – 30 min bei 30°C und schwachem Schütteln (25 rpm) inkubiert, um die Zellwand anzudauen. Die so generierten Spheroberblasten wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 400 g geerntet, zweimal mit 5 ml Spheroberblastenpuffer A gewaschen und schließlich in 1 ml

Spheroblastenpuffer A aufgenommen. In 10 ml YPDA-Sorbitol Medium wurden die Spheroblasten bei 50 rpm für 90 min geschüttelt. Die regenerierten Spheroblasten wurden im Anschluss geerntet und zweimal mit 5 ml 1 M Sorbitol gewaschen, um jegliches Salz zu entfernen, das die Effizienz der Elektroporation beeinträchtigen würde. Schließlich wurden die Spheroblasten in 1 M Sorbitol zu einer Zellsuspension von 1×10^8 Zellen/ml verdünnt. Die kompetenten Hefen wurden in 200 µl-Aliquots in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 2 mm) mit bis zu 1 µg RNA bzw. DNA für 5 min inkubiert. Die Ansätze wurden bei 800 V, 21 µF, 1.000 Ohm und einer Zeitkonstante von 4,5 - 5 elektroporiert, mit 500 µl vorgewärmtem YPDA-Sorbitol in Reaktionsgefäß übertragen und 2 - 16 h bei 30°C regeneriert. Die Elektroporationsansätze wurden anschließend auf Agarplatten selektiert.

Methode II – nach Lundblad (1993)

50 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur ($OD_{600} \leq 1,5$) wurden durch Zentrifugation bei 4.000 g für 10 min bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 8 ml gekühltem Wasser aufgenommen, mit 1 ml 10x TE und 1 ml 1 M Lithiumacetat versetzt und 45 min sowie nach Zugabe von 0,25 ml 1 M DTT weitere 15 min bei 30°C bei 90 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 40 ml eiskaltes Wasser zugegeben und die Zellen bei 4°C geerntet. Nach Waschen mit 25 ml eiskaltem Wasser und 2,5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol wurden die Zellen schließlich in 50 µl 1 M Sorbitol aufgenommen, so dass eine 150 µl Suspension entstand. 40 µl der Zellsuspension wurden mit bis zu 1 µg RNA oder DNA gemischt, in Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 2 mm) für 5 min in Eiswasser inkubiert und bei 5 kV, 25 µF und 200 Ohm und einer Zeitkonstante von 4,5 - 5 elektroporiert. Unmittelbar danach wurde 1 ml eiskaltes Sorbitol (1 M) zugegeben, die Ansätze in Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt plattierte oder bis zu 8 h in Eiswasser gekühlt und im Anschluss auf Agarplatten selektiert.

2.2.2.5 Bestimmung der Wachstumsrate von Hefekulturen

Eine Hefekolonie wurde in 10 ml Medium üN bei 30°C und 190 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur wurde mit einer OD_{600} von 0,1 in Selektivmedium gestartet und die Zeldichte über 24 bzw. 48 h bestimmt (2.2.2.1). Die Generationszeit der Hefekultur in der exponentiellen Phase errechnete sich gemäß folgender Gleichung:

$$N_t = N_0 \times 2^{\Delta t}$$

N: Zellzahl, die sich aus der gemessenen OD_{600} ergibt

$$g = \frac{\Delta t \times \log 2}{\Delta \log N}$$

t: Anzahl an Stunden, die die Kultur gewachsen ist

g = Generationszeit: Zeit, die Hefezelle für eine Verdopplung braucht

$$\text{Wachstumsrate/h [%]} = \frac{1}{g} \times 100$$

Die Wachstumsrate pro Stunde in Prozent ergibt sich aus dem Kehrwert der Generationszeit und besagt, um wie viel Prozent die Hefekultur pro Stunde an Masse zunimmt. Bei einer Generationszeit von 2 h beträgt die Wachstumsrate/h 50%.

2.2.2.6 Lagerung von Hefekulturen

Ausstriche von *S. cerevisiae* auf Agarplatten wurden max. 4 Wochen bei RT oder 4°C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden Übernachtkulturen (in YPDA oder Minimalmedium) mit sterilem Glycerin versetzt (25% Endkonz.) und bei -80°C gelagert.

2.2.2.7 Kurieren von Plasmiden

Hefen verloren ihre Plasmide, wenn sie mind. 30 Generationen lang in Vollmedium kultiviert wurden. Ein Aliquot der Flüssigkultur wurde auf YPDA ausplattiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Einzelkolonien wurden auf Selektivplatten ausgestrichen; die Aminosäure, die durch den/die Plasmidmarker codiert wurde, fehlte in dem Minimalmedium. Kolonien, die auf Minimalmedium nicht anwuchsen, waren von dem/den Plasmid(en) kuriert und wurden ausgehend von der YPDA-Platte weiter verwendet.

2.2.2.8 Plasmidisolation aus *S. cerevisiae*

Zwischen 10^3 und 10^9 Hefezellen wurden für die Plasmidisolation benutzt. Diese wurde mithilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen) und nach Vorgaben von Singh *et al.* (2002) durchgeführt. Das Hefepellet wurde in 200 µl P1 Puffer resuspendiert, mit 50 µl Lytikase (1.000 Units) versetzt und zum Andauen der Zellwand 45 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer und 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Hefezellen lysiert. Durch Zugabe von 700 ml N3 wurde der Ansatz neutralisiert und die Zelltrümmer im Anschluss bei 14.000 g 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf DNA-bindende Silikasäulchen geben, mit 500 µl PB gespült und mit 750 µl PE gewaschen, 2 min trocken zentrifugiert und schließlich mit 50 µl Wasser eluiert.

2.2.2.9 Genomische Integration bzw. Deletion

Zur Expression von einem heterologen Gen in Hefe wurde eine Expressionskassette bestehend aus Promotor, Terminator und dem Gen hergestellt. Zur ortsgerichteten Integration wurden integrative Vektoren (Tab. 3) benutzt, welche dem Genlokus entsprechende homologe Enden besitzen. Zur Selektion von Integranten wurden Expressionskassetten mit einem Antibiotikum-Resistenzgen (Antibiotikum^R-Gen) benutzt, die zusätzlich integriert wurden. In Abb. 5 ist schematisch eine Integration an den *LEU2*-Lokus dargestellt. Integranten können durch Selektion auf Agarplatten mit G418 auf die Expression von KanMX selektiert werden. Das Genom der Integranten wurde mittels PCR von Hefekolonien (cPCR, 2.2.3.1) mit sequenzspezifischen Primern und anschließender Sequenzierung der Amplifikate (2.2.3.9) auf die korrekte Integration hin überprüft.

Bei der genomischen Deletion wird eine Expressionskassette eines Antibiotikum^R-Gens über homologe Enden (am 5' und 3' Ende ca. 500 bp lang) an den entsprechenden Genlokus im Hefegenom integriert. Dadurch wurde der ORF des Zielgens komplett deletiert. Integranten wurden durch Selektion auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert und die ortsspezifische Deletion ebenso überprüft.

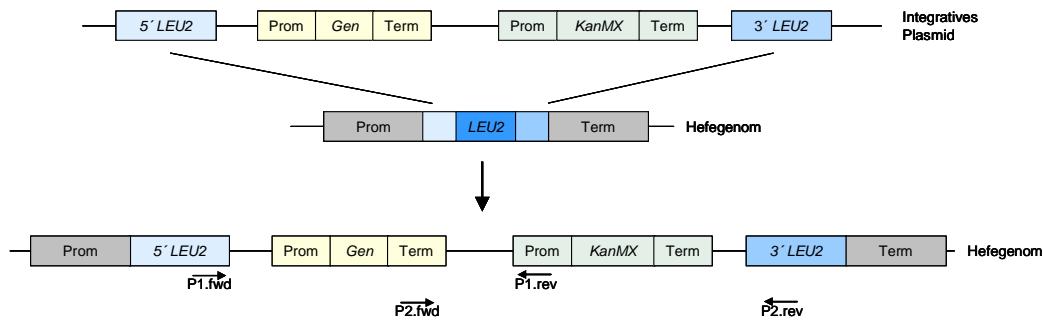


Abb. 5. Integration einer Gen- und KanMX-Kassette in den LEU2 Lokus des Hefegenoms. Das linearisierte Integrationsplasmid hybridisiert mit dem 5' und 3' Ende des LEU2 Gens und wird durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert. Integranden können über die Expression des Antibiotikum^R-Gens kan selektiert werden. Die Korrektheit der Integration wurde mit den Primerpaaren P1.fwd/rev und P2.fwd/rev mittels cPCR und Sequenzierung überprüft.

2.2.2.10 Anreicherung von schnell wachsenden Hefen in einer definierten Mischkultur

AH109 wurde mit pGBK7-Sam68 (Plasmidmarker *TRP1*, Kana^R) und pRS315-AD-Yes1-wt bzw. pRS315-Yes1-weak (Plasmidmarker *LEU2*, Amp^R) kotransformiert (2.2.2.3). Es wurden Vorkulturen mit AH109-Sam68/Yes1-wt (starke Interaktion) und AH109-Sam68/Yes1-weak (schwache Interaktion) in DO TrpLeu Flüssigmedium üN geschüttelt. Die Vorkulturen wurden im Verhältnis 1:100 bzw. 1:10⁶ gemischt, so dass die Hauptkultur mit einer Gesamt-OD₆₀₀ = 0,04 gestartet wurde. Zur Selektion der Minderheit von Hefen mit starken Interaktionspartnern wurde die gemischte Kultur in DO TrpLeuAdeHis über 3 Tage hinweg geschüttelt und bei Erreichen der stationären Phase in frisches Medium überimpft (OD₆₀₀ = 0,1). Die Wachstumsraten/h wurden ermittelt (2.2.2.5). Zur Quantifizierung des aktuellen Verhältnisses zwischen Hefen mit starken und schwachen Protein-Protein-Interaktionspartnern wurden täglich die Plasmide von 10⁸ Hefezellen isoliert (2.2.2.8) und in *E. coli* vereinzelt (2.2.1.5). Pro Zeitpunkt wurde der Yes1-Genabschnitt von 48 - 96 Amp^R-Bakterienklonen mittels cPCR und Sequenzierung analysiert (2.2.3.1, 2.2.3.9).

2.2.2.11 Mutagenese durch Ethylmethansulfonat (EMS)

AH109 wurde mit pGBK7-p53 (Plasmidmarker *TRP1*) und pGADT7-T (Plasmidmarker *LEU2*) kotransformiert (2.2.2.3) und auf DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Agarplatten selektiert. 10 ml DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT wurde mit einem AH109-p53/T Einzelklon mit starker Y2H Interaktion angeimpft und üN geschüttelt. Mit der Vorkultur wurden vier Hauptkulturen angeimpft, mit EMS in den Konzentrationen 1,00%, 0,10%, 0,01% und 0,00% (= Kontrolle) versetzt und für 32 h inkubiert. Die Hefekulturen in der stationären Phase wurden in frisches Medium mit entsprechender Menge an EMS überimpft (OD₆₀₀ = 0,1) und weitere 48 h kultiviert. Aus den Flüssigkulturen wurden täglich 10³ Hefezellen auf DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Agarplatten plattiert und die Koloniengrößen im Vergleich zum Kontrollansatz (ohne EMS) bestimmt.

2.2.2.12 Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese und Selektion starker Interaktionspaare

Hefen wurden mittels PEG/LiAc-Methode mit Oligonukleotiden transformiert (2.2.2.3). Von den Oligonukleotiden mit einzelnen Nukleotid-Austauschen (100 µM) wurden 7,5 - 15 µl (0,75 – 1,5 nmol) eingesetzt, von den Oligonukleotid-Bibliotheken (100 µM) wurden jeweils 4 µl (4 nmol) verwendet. Um

bakterielle Kontaminationen zu inaktivieren, wurden die Oligonukleotide vor der Transformation 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt. Zum Einbau der Oligonukleotide in die DNA wurde der Transformationsansatz üN in 1 ml YPDA bei 30°C und 200 rpm im 2 ml-Reaktionsgefäß geschüttelt und im Anschluss zweimal mit 1 ml Wasser gewaschen. Zur Selektion von Hefen mit starken Protein-Protein-Interaktionspartnern wurde der Transformationsansatz in 15 ml DO TrpLeuHisAde verdünnt, über 11 Tage hinweg mit steigendem Selektionsdruck (Zugabe von 3-AT) kultiviert und die Wachstumsraten/h ermittelt (2.2.2.5). Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Kultur in frisches Medium überimpft ($OD_{600} = 0,2$); außerdem wurden rechnerisch bis zu 10^6 Hefezellen auf Agarplatten mit und ohne Selektionsdruck auf Y2H Interaktion plattiert, um die Qualität der Selektion in Flüssigkultur zu verfolgen. Aus den Flüssigkulturen und den gewachsenen Kolonien auf Selektionsplatten wurden Plasmide isoliert und sequenziert (2.2.2.15).

2.2.2.13 Bestimmung des mutagenen Potentials der humanen AID in *S. cerevisiae*

Ein Hefestamm, der die humane AID konstitutiv exprimiert (TEFp-AID) wurde mit pRS313-AL_LEU2optNSM (Plasmidmarker *HIS3*) transformiert (2.2.2.3) und auf DO His Agarplatten selektiert. Einzelkolonien wurden in 10 ml DO His angeimpft und am nächsten Tag in 20 ml frisches DO His Medium verdünnt ($OD_{600} = 0,1$). Parallel wurden rechnerisch 10^6 Zellen auf DO HisLeu Agarplatten ausplattiert, um *LEU2opt*-Revertanten zu identifizieren und 10^3 Zellen auf DO His Agarplatten, um die konkrete Gesamtzellzahl zu bestimmen. Die Hefekulturen wurden insgesamt 7 Tage hintereinander überimpft und täglich plattiert. Aus der Anzahl an Revertanten im Verhältnis zur Gesamtzellzahl und Anzahl an Generationen wurde die Mutationsrate pro Basenpaar und Generation berechnet. 10 bzw. 20 *LEU2opt*-Revertanten wurden in DO HisLeu angeimpft und üN kultiviert (2.2.2.2). Aus den Vorkulturen wurde pRS313-AL_LEU2optNSM isoliert und in *E. coli* (2.2.2.8, 2.2.1.5) vereinzelt (Selektionsmarker *amp*). Nach Amplifikation von ADHp-LEU2optNSM aus 96 Bakterienkolonien folgte die Sequenzierung (2.2.3.1, 2.2.3.9).

2.2.2.14 AID-induzierte Mutagenese und Selektion von starken Interaktionspartnern

Y2HGold-TEFp-AID wurde mit pGBKT7-BD-*bait* (Plasmidmarker *TRP1*) und pRS315-AD-*prey* (Plasmidmarker *LEU2*) kotransformiert und auf DO TrpLeu Agarplatten selektiert. Jeweils 3 Kotransformanten wurden üN in DO TrpLeu kultiviert. In diesem Medium wurde lediglich auf die Prototrophiomarker der beiden Plasmide selektiert und nicht auf Y2H Interaktion, somit konnten in der Vorkultur alle Hefen wachsen, die beide Plasmide aufgenommen haben. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 20 ml frisches Medium überimpft ($OD_{600} = 0,1$), üN bis zur stationären Phase kultiviert und noch weitere 3 bzw. 4 Tage so verfahren. Zur Selektion von Hefen mit starken Interaktionspartnern wurde das Medium anschließend so gewählt, dass für das Wachstum nicht nur die Expression der Plasmid-kodierten Marker notwendig war, sondern auch die Reportergene des genomischen Y2H Systems *HIS3* und *Aur1-C* (3.1.1) exprimiert werden mussten. Für die Selektion auf *HIS3*-Expression wurde Histidin-freies Medium verwendet und zur Erhöhung des Selektionsdrucks 100 mM 3-AT zugesetzt. Zusätzlich wurde dem Medium für die Selektion auf Expression des Antibiotikum-Resistenzmarkers *Aur1-C* Aureobasidin (64 nM) zugesetzt. Auf diese Weise wurden die Hefekulturen bis zu zwei Wochen einem ständig steigenden Selektionsdruck ausgesetzt, so dass letztendlich nur Hefeklone überleben konnten, deren Y2H Plasmide für ein gut interagierendes Proteinpaar kodierten.

Täglich wurden Aliquots von 10^3 Zellen auf Selektionsplatten plattiert. DO TrpLeuAde diente aufgrund der resultierenden Hefekolonienfarbe (weiß oder rosa) zur Bestimmung des Verhältnisses von starken und schwachen Bindern. Auf DO TrpLeuHisAde wuchsen nur Hefeklone mit starken Interaktionspartnern, ebenso auf DO TrpLeuHis/64 nM AbA/X- α -Gal, wobei die Expression von den drei Y2H Reportern – *HIS3*, *Aur1-C* und *MEL1* überprüft wurde. Die Wachstumsrate/h der Flüssigkulturen wurde bestimmt (2.2.2.5), sowie aus den Flüssigkulturen und den gewachsenen Kolonien auf Selektionsplatten Plasmide isoliert und sequenziert (2.2.2.15).

2.2.2.15 Analyse von *bait* und *prey* aus mutagenisierten Hefekulturen

Nach Mutagenese von Hefen mit *bait*-*prey*-Interaktionspartnern wurden die *shuttle*-Plasmide pGBK7-*bait* (2 μ m, Kana^R) und pGADT7-*prey* (2 μ m, Amp^R) bzw. pRS315-AD-*prey* (CEN/ARS, Amp^R) analysiert, um mögliche *bait*-*prey*-Mutationen zu identifizieren. Bei 2 μ m Plasmiden existieren pro Hefezelle bis zu 1.000 Kopien, bei Plasmiden mit CEN/ARS-Elementen hingegen nur 2 – 3 Kopien. Eine Kopie eines besseren Interaktionspartners reicht aus, um der Hefezelle einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Verbesserte *bait*- oder *prey*-DNA reicherte sich erst durch Selektion zu 100% in der Hefezelle an und war erst dann direkt aus der Hefekolonie als Variante identifizierbar. Mutagenisierte Hefen konnten am Anfang der Selektion deshalb nicht direkt in cPCRs eingesetzt werden, sondern Plasmide wurden isoliert und in *E. coli* vereinzelt.

Aus 10 ml Hefekultur der stationären Phase zwischen OD₆₀₀ 1 und 5 (= 2×10^8 – 10^9 Zellen) oder von 10³ Hefezellen auf Agarplatten wurden Plasmide isoliert (2.2.2.8). Das aufgereinigte *prey/bait*-Plasmidgemisch wies eine durchschnittliche Konzentration von 0,3 μ g/ μ l auf. 3 μ g (~ 10^{11} Moleküle) wurden zur Elektroporation von *E. coli* verwendet (2.2.1.3). Die 100 -500 Bakterien auf LB_{Amp}-Platten enthielten ein *prey*-Plasmid. Zur Vereinzelung von Bakterien mit pGBK7-*bait* wurde der Transformationsansatz 1:100 verdünnt, so dass auf den LB_{Kana}-Platten 500 – 1.000 Bakterien wuchsen. Es wurden jeweils 24 - 130 Bakterieneinzelklone gepickt und mittels cPCR der BD-*bait* bzw. AD-*prey*-spezifische Genabschnitt amplifiziert und sequenziert (2.2.3.1, 2.2.3.9).

2.2.3 DNA-Techniken

2.2.3.1 Amplifikation von Nukleinsäuren

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ermöglicht eine gezielte Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte (Mullis *et al.* 1986). Die Reaktionen wurden in sterilen, dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäße nach folgenden Schemata (Tab. 30 – 33) auf Eis pipettiert.

Für die Standard-PCR lag das *template* als Plasmid oder linear vor. Zur Amplifikation wurde die DNA-Polymerase *PhusionTM High-Fidelity* verwendet.

Bei PCR-Reaktionen direkt von Kolonien (cPCR) wurden 1 – 2 μ l Zellmaterial mit *Taq*-Polymerasen amplifiziert. Für die Analyse von Bakterienkolonien wurde der *PCR Master Mix* (Promega) verwendet. Die PCR-Analyse direkt von Hefekolonien wurde zur Überprüfung der genomischen Integration bzw. Deletion genutzt bzw. zur Amplifikation hefe-eigener IRES-Sequenzen aus AH109. Dafür wurde die KAPA2GTM Robust Polymerase (PEQLAB) verwendet.

Tab. 30. Zusammensetzung einer Standard-PCR

Komponente	Endkonz.
<i>Phusion</i> TM HF-Puffer (5x)	1x
dNTPs	0,20 mM
Primer forward/reverse	1,00 μ M
<i>Phusion</i> TM Polymerase	0,02 U/ μ l
template-DNA	0,50 – 2,00 ng/ μ l
DMSO*	3,00%

* bei Amplifikation von *Sam68-templates*

Tab. 31. Zusammensetzung einer cPCR von Bakterienkolonien

Komponente	Endkonz.
<i>PCR Master Mix</i> (2x)	1x
Primer forward/reverse	0,5 μ M

Tab. 32. Zusammensetzung einer cPCR von Hefekolonien

Komponente	Endkonz.
<i>KAPA2G</i> TM Robust Puffer B (5x)	1x
dNTPs	0,2 mM
Primer forward/reverse	1,0 μ M
<i>KAPA2G</i> TM Robust Polymerase	0,5 U/ μ l

Das Einfügen von Punktmutationen in *Yes1* wurde mittels *quick change PCR* (qcPCR) generiert. Die Primer enthielten die gewünschten Nukleotidveränderungen.

Tab. 33. Zusammensetzung einer qcPCR

Komponente	Endkonz.
<i>PfuUltra</i> TM HF-Puffer (10x)	1x
dNTPs	0,5 mM
je Primer	1,0 μ M
<i>PfuUltra</i> TM Polymerase	0,1 U/ μ l
template-DNA	0,5 – 1,0 ng/ μ l

Tab. 34 zeigt die Amplifikations-Programme, die entsprechend den Polymerasen eingestellt wurden. Die Elongationszeit wurde der Länge des zu amplifizierenden DNA-*templates* angepasst. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Das Ergebnis der PCR-Amplifikation wurde durch Auftrag von 5 μ l (analytisch) bzw. des ganzen Ansatzes (präparativ) auf ein Agarosegel und elektrophoretischer Auftrennung der Produkte überprüft.

Tab. 34. Programme der PCR-Reaktion im Thermocycler

Programmschritt	<i>Phusion</i> TM			<i>Taq</i>			<i>PfuUltra</i> TM		
	Zeit [sec]	Temp [°C]	Zyklens- zahl	Zeit [sec]	Temp [°C]	Zyklens- zahl	Zeit [sec]	Temp [°C]	Zyklens- zahl
Anfangsdenaturierung	120	98	1	300	95	1	95	95	1
Denaturierung	20	98		30	95		95	95	
Primer-annealing	20	58	30	30	55	30	30	50-70	25
Elongation	30/kb	72		60/kb	72		120/kb max.960	68	
Endelongation	300	72	1	300	72	1	1200	68	1

2.2.3.2 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

Enzymatische Spaltungen von DNA (bis zu 1 μ g für analytische und bis zu 5 μ g für präparative Ansätze) wurden in 30 - 50 μ l Gesamtvolumen mit 1/10 Vol 10x Restriktionspuffer und

Restriktionsenzym zwischen 5 - 10 Units/ μ g DNA für 1 - 8 h durchgeführt. Die Wahl des Puffers sowie der Inkubationstemperatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Restriktion wurde der Reaktionsansatz mittels Gelelektrophorese analysiert.

2.2.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung falsch-positiver Kolonien bei der *E. coli*-Transformation bedingt durch Rezirkularisierung von linearisierten Vektoren in der Ligationsreaktion, wurden die 5' Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurden Vektoren nach der Restriktion mit 5 U/ μ g *calf intestinal phosphatase* (CIP) 30 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch eine Ligationsreaktion wurden zu klonierende DNA-Fragmente und Vektor-DNA mit T4 DNA Ligase kovalent verknüpft. Dazu wurden 50 ng Vektor und Insert im 3-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Die Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden wurde 2 h bei RT und die von stumpfen Enden in Eiswasser durchgeführt. Vor der Transformation von *E. coli* wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die RNA- und DNA-Konzentration wurde entweder anhand eines Agarosegels im Vergleich zum Größenstandard abgeschätzt oder photometrisch bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml einzelsträngiger DNA oder RNA (Sambrook *et al.* 2001). Der Quotient OD_{260}/OD_{280} diente als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Reine DNA besitzt einen Quotient A_{260}/A_{280} von 1,8 – 2,0; bei reiner RNA liegt er zwischen 1,9 – 2,1.

2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Fragmente (100 bp bis 17 kb) wurden zur analytischen Größenbestimmung bzw. für präparative Zwecke auf 0,8 - 1%igen Agarosegelen in 0,5x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren wurde der Agarosegellösung 0,5 μ g/ml EtBr und als Schutz der DNA vor UV-Schäden 30 μ g/ml Guanosin zugesetzt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10x Gelauftragspuffer versetzt. Die Gele wurden bei 8 - 10 V/cm Abstand Kathode/Anode an das Spannungsgerät angeschlossen. Die Proben sowie ein DNA-Standard wurden in 30 - 120 min elektrophoretisch aufgetrennt. DNA wurde mittels UV-Licht detektiert und mithilfe einer Gel-dokumentationsanlage aufgezeichnet.

2.2.3.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösung bzw. aus Agarosegelblöckchen wurde mit dem *MinElute PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt und mit EB-Puffer eluiert.

2.2.3.8 Aufreinigung von cPCRs im 96 well-Format

Die DNA-Aufreinigung von cPCRs aus Bakterienkolonien erfolgte über Aufreinigungsplatten im 96 well Format nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden in 50 µl EB-Puffer eluiert und anschließend sequenziert.

2.2.3.9 DNA-Sequenzanalyse

Sequenzreaktionen für die Auftrennung mit einem Kapillar-sequencer wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Methode beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977), wobei hier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zum Einsatz kamen. Die Sequenzen wurden mit der Software *SeqMan™/II* ausgewertet. Homologievergleiche (BLASTX, BLASTN) (Altschul *et al.* 1997) und Datenbankrecherchen erfolgten über die Internetseiten des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.3.10 Einstellung der Verunreinigung von Oligonukleotiden

Dirty bottle-Oligonukleotide wurden von der Firma ELLA bezogen. In Tab. 35 sind die theoretischen AS-Verteilungen dargestellt, die sich theoretisch durch den Grad der eingestellten Verunreinigung ergaben.

Tab. 35. Theoretische AS-Verteilung in den beiden *dirty bottle*-Oligonukleotiden.

A. Yes1-weak_dirty (5%). **B. Yes1-mut_dirty** (8,5%). Die Yes1-wt-AS stellt die höchste Wahrscheinlichkeit dar und ist rot markiert. Wahrscheinlichkeiten < 1% sind hellgrau markiert. # gibt Wahrscheinlichkeit für ein Stop-Codon an.

Bei Yes1-weak_dirty wurden pro Nukleotid 5% Verunreinigung eingestellt, so dass durchschnittlich pro Codon 85% wt erhalten blieb bzw. 15% nicht-wildtypisch sein sollen. Für das ganze Oligonukleotid (30 degenerierte Positionen) ergaben sich durchschnittlich 4,5 Nukleotid-Austausche. Da 25% der Austausche still sind, wird eine AS-Substitution von durchschnittlich 3,4 pro Oligonukleotid erwartet.

Bei Yes1-mut_dirty wurden die Einzelnukleotide zu 8,5% verunreinigt, wodurch 75% wildtypisch bzw. 25% nicht-wildtypische Codons entstehen sollten. Im ganzen Oligonukleotid (6 degenerierte Positionen) wurden somit durchschnittlich 4,6 Nukleotide ausgetauscht. Unter Berücksichtigung der stillen Austausche ergab sich im Mittel ein AS-Austausch von 3,4.

2.2.4 RNA-Techniken

2.2.4.1 *In vitro* Transkription (IVT)

Ausgehend von dsDNA mit T7-Promotor wurde mittels T7-RNA Polymerase ssRNA hergestellt (Schenborn *et al.* 1985). Die Ansätze (Tab. 36) wurden 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Analyse und Bestimmung der ssRNA-Konzentration wurde 1 µl der Reaktion auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Menge anhand des 2 \log DNA-Größenstandards abgeschätzt.

Tab. 36. Pipettierschema zur IVT

Komponenten	Endkonz.
RNA Polymerase	1x
Reaction Puffer (10x)	
PCR-Produkt	5,0 ng/µl
NTPs	4,0 mM
MnCl ₂	10,0 mM
RNase Inhibitor	1,0 U/µl
T7 RNA Polymerase	2,5 U/µl

2.2.4.2 mRNA Nachweis in Hefe

Mit dem EZNA Yeast RNA Kit (Omegabiotek) wurde aus 5×10^7 frisch gewachsenen Hefezellen nach Angaben des Herstellers Gesamt-RNA isoliert und durchschnittlich 75 µg in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zur spezifischen Anreicherung von mRNA wurden magnetische Partikel verwendet, an die Oligonukleotide aus 25 Thyminen gekoppelt waren (Dynabeads® Oligo(dT)₂₅, Invitrogen). Durch Hybridisierung der Thymine mit der polyadenylierten Hefe-mRNA konnten die Partikel mit daran gebundener mRNA durch magnetische Separation vom Überstand getrennt werden. Dazu wurden 50 µg Gesamt-RNA im Volumen von 100 µl mit 1 mg gewaschener Partikel inkubiert und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Auf diese Weise wurde die DNA-Verunreinigung (Plasmid, Genom) vollständig entfernt. Die Partikel mit gebundener mRNA wurden in 20 µl Wasser aufgenommen und direkt (ohne Elution) in eine reverse Transkription eingesetzt, zur Herstellung von cDNA und anschließender Amplifikation mittels *Taq* Polymerase. Die Pipettierschemata sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 37, Tab. 39). 5 µl des RT-PCR-Produkts wurde zur Analyse auf einem 1%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Negativkontrollen wurden ohne AMV Reverser Transkriptase angesetzt, um zu Überprüfen, ob die Amplifikation von DNA-Verunreinigungen oder wie erwartet von mRNA stattgefunden hat.

Tab. 37. Pipettierschema zur reversen Transkription

Komponente	Endkonz.
AMV Puffer (5x)	1x
Dynabeads Oligo(dT) ₂₅ mit daran gebundener mRNA	20,00% (v/v)
dNTPs	0,20 mM
MgSO ₄	1,00 mM
AMV Reverse Transkriptase	1,25 U/µl
Nach Erststrangsynthese RNase H	0,08 U/µl

Tab. 38. Programm zur cDNA-Synthese

Programmschritt	Zeit [sec]	Temp [°C]	Zyklen- zahl
Erststrangsynthese	3600	45	1
Denaturierung	300	94	1
Zweitstrangsynthese	1200	37	1
Denaturierung	300	95	1

Tab. 39. Pipettierschema zur PCR nach reverser Transkription

Komponente	Endkonz.
PCR Master Mix (2x)	1x
cDNA	10,0% (v/v)
Primer forward/reverse	0,5 µM

Die PCR-Reaktion nach reverser Transkription wurde wie in Tab. 34 aufgeführt, inkubiert.

2.2.4.3 Nachweis zur autokatalytischen Abspaltung der Ribozymsequenz

Zum Nachweis der autokatalytischen Ribozymabspaltung wurde ssRNA aus einer IVT-Reaktion (2.2.4.1) mit 5 mM MgCl₂ versetzt, 1,5 h bei 55°C inkubiert und die Reaktion im Anschluss auf einem 0,8%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.6).

2.2.4.4 Qβ Aktivitätstest *in vitro*

In einen Qβ-Aktivitätstest wurde ssRNA mit Qβ-spezifischen Enden eingesetzt, um diese durch die Qβ-Replikase über das Stadium der dsRNA zu amplifizieren.

Tab. 40. Pipettierschema zum Qβ-Aktivitätstest *in vitro*

Komponente	Endkonz.
TA Puffer (10x)	1x
ssRNA aus IVT	5,00 ng/µl
NTPs	4,00 mM
Qβ- <i>E. coli</i>	0,05 U/µl
bzw. Qβ-Hefe an Agarose*	75,00% v/v
RNase-Inhibitor	1,00 U/µl

* Zum Test der heterolog exprimierten Qβ-Hefe wurde statt Qβ-*E. coli* Agarosebeads mit daran gebundenen flag- Qβ-Komplexproteinen durchgeführt (2.2.5.9).

Die Reaktionen wurden 1 - 24 h bei 30°C inkubiert. Soweit nicht anders angegeben wurden die Reaktionen im Anschluss mit 0,025 U/µl DNase behandelt, damit dsDNA, die durch die IVT mitgeschleppt wird, im Gelauftrag nicht sichtbar wird. 50% der Reaktion wurden vergleichend mit 1 µl des 2log DNA-Standards auf einem 0,8% Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.6).

2.2.4.5 RNA cloning

Qβ amplifizierte RNAs wurde mithilfe des *ExactSTART™ End-Tagged Double-Strand cDNA Synthesis Kits for small RNA* kloniert. Die Schnittstellen-Primer zur gerichteten Klonierung wurden eigens konstruiert und die Synthesezeiten zur Amplifikation von bis zu 200 Nukleotid langen ssRNAs verlängert.

5 bis 16 µl der Qβ-amplifizierten potentiell doppelsträngigen RNA aus den Qβ *in vitro* Tests wurden bei 75°C für 5 min aufgeschmolzen, so dass ssRNA für die Klonierung zur Verfügung stand. Das 3' Ende

von ssRNA wurde mit Hilfe einer PolyA-Polymerase um ca. 20 Adenine verlängert, indem der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert wurde. Nach Aufreinigung über eine RNA-bindende Säule wurde an das 5' Ende der adenylierten ssRNA durch eine T4-RNA-Ligase ein RNA Akzeptor-Oligo ligiert. Dazu wurde der Ansatz 2 h bei 37°C inkubiert. Die modifizierte ssRNA wurde im Anschluss durch eine reverse Transkriptase und einem Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben während der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Für die Zweitstrangsynthese wurde der 5' Primer so designt, dass dessen 3'Bereich am Linker hybridisiert, der Bereich davor wird um eine Kpn I-Schnittstelle erweitert. Der 3' Primer wurde so gewählt, dass er am 5' Ende mit PolyA hybridisiert und zusätzliche Basen für eine Sac I-Schnittstelle mitbringt. Von der entstandenen cDNA wurde die Hälfte mit KpnI/SacI verdaut, gerichtet in pBlueskript ligiert und *E. coli* wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB_{Amp}-Agarplatten selektiert. Von den Bakterienklonen wurden mittels cPCR die Regionen zwischen den Schnittstellen spezifisch amplifiziert und sequenziert.

2.2.5 Proteinbiochemische Techniken

2.2.5.1 SDS-PAGE

Bei der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli 1970). Dazu wurden 4-20%ige Polyacrylamid-Gradientengele mit 5%igem Sammelgel verwendet. Die Proben wurden mit SDS-Laupuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und zusammen mit einem Protein-Größenstandard aufgetragen. Die angelegte Stromstärke bei der Elektrophorese in einer *Minigel-Twin* Apparatur betrug pro Gel 30 mA und dauerte ca. 1 h. Die Gele wurden nach dem Lauf entweder mit Coomassie-Lösung gefärbt oder in einen *Western Blot* eingesetzt.

2.2.5.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

SDS-Gele wurden nach dem Lauf 30 - 60 min in einer auf 50°C erwärmten Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in Entfärbelösung bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Zur Dokumentation wurden die Gele mittels Scanner abgelichtet.

2.2.5.3 Proteinnachweis mittels *Western Blotting* und Immunodetektion

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *Tank-Blot* Apparatur elektrophoretisch auf einer Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde ein Sandwich aus zwei Lagen Whatman 3MM Filterpapier, der Nitrocellulose, dem Gel und zwei weiteren Lagen Whatman-Papier aufgebaut. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1,5 h in Proteintransferpuffer. Im Anschluss wurde die Membran mit 5% Milchpulver/TBS-T 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Der Primärantikörper wurde in 5% Milchpulver/TBS-T laut Herstellerangaben verdünnt und die Membran damit üN bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit 1x TBS-T wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper-HRP-Konjugat, entsprechend verdünnt in TBS-T, für 2 h inkubiert. Nach drei 10-minütigen Waschschritten wurde das Antikörper-Enzym-Konjugat entweder (1) mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL) detektiert, wofür die Membran mit dem *BM Chemiluminescence Blotting Substrate* benetzt und im Chemilumineszenz *Imager* fotografiert

wurde oder (2) das Antikörper-Enzym-Konjugat wurde mittels DAB-Färbung nachgewiesen. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert HRP 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen, unlöslichen Präzipitat, das sich auf der Membran niederschlägt und somit spezifisch Proteinbanden anfärbt. Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran 3 - 5 min in der DAB-Färbelösung bei RT abgedunkelt inkubiert, die Reaktion nach Ausbildung einer intensiven Braunfärbung mit Wasser abgestoppt und die Membran zur Dokumentation eingescannt.

2.2.5.4 Proteinexpression in *E. coli* und native Aufreinigung

Die SH3-Varianten von Yes1 wurden N-terminal über einen Glycin-Serin-Linker mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert (pGEX4T1-Yes1) und Sam68 wurde N-terminal mit einem 6xHN-tag ((His-Asn)₆) gekoppelt (pEVH1-HN-Sam68). Die Fusionskonstrukte wurden im *E. coli* Expressionsstamm BL21 exprimiert. 10 ml LB-Medium wurden mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37°C bei 220 rpm geschüttelt. 200 ml Hauptkultur wurden auf eine OD₆₀₀ ~ 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6 kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonz.) wurde die Proteinexpression induziert. Die Expression von Sam68 wurde üN bei 4°C bzw. die der Yes1-Varianten wurde üN bei 30°C durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 4°C und 4.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und mit 80 µl Proteaseinhibitor-Cocktail und 2 µl Benzonase versetzt. Zum Zellaufschluss wurde die Bakteriensuspension in einem Glas-Rosettencylinder, auf Eis gekühlt, 5 min mit dem Ultraschall-Homogenisator (5 Zyklen, 65% Intensität) behandelt. Unlösliche Zellbestandteile wurden im 2 ml Reaktionsgefäß für 15 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde mit einem 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Zum Nachweis der erfolgreichen Überexpression wurde von der uninduzierten und induzierten Bakteriensuspension jeweils 0,1 OD₆₀₀-Einheiten mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bzw. mittels *Western Blot* analysiert.

Die Aufreinigung von 1 mg HN-Sam68 aus 2 l Kultur wurde mit 1 ml *TALON® Metal Affinity Resin* durchgeführt, wobei das Protein mit der immobilisierten Säulenmatrix einen Kobalt-Chelatkomplex ausbildet. Nach Äquilibrieren der Säule mit PBS wurde das Lysat über die Säule gegeben, 3x mit 5 ml PBS mit 5 mM Imidazol gewaschen und mit 3x1 ml PBS mit 500 mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen E1 und E2 wurden vereinigt und mit einer PD-10 Entsalzungssäule nach dem Prinzip des Größenausschlusses entsalzt. Nach Elution des gereinigten Proteins in 3x 1 ml wurden die Fraktionen E_{desalt}2 und E_{desalt}3 vereinigt und zur Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet.

Zur Aufreinigung von 1-3 mg GST-Yes1 wurde mit 1 ml *GST-Tag Purification Resin* verwendet. Nach Äquilibrieren der Säule mit PBS wurde das Lysat über die Säule gegeben, 3x mit 5 ml PBS gewaschen und mit 3x 1 ml PBS mit 33 mM Glutathion (Endkonz.) eluiert. Die Fraktion E2 wurde direkt zur Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet.

Pro Reinigungsfraktion wurden 5 µl mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert und die erfolgreiche Aufreinigung bestätigt.

2.2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen wurden mit BSA als Standardprotein bestimmt. Definierte BSA-Mengen wurden zusammen mit verschieden Volumina der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung wurden die Bandenstärken zwischen Proben- und Standardprotein mittels *Scion Image* quantifiziert und die Konzentration des aufgereinigten Proteins bestimmt.

2.2.5.6 Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels ELISA

Die Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Protein und Ligand. Je höher die Affinität, desto stärker die Bindung. Die Dissoziationskonstante (K_D) entspricht dem reziproken Wert der Affinität. Je stärker die Protein-Ligand-Wechselwirkung, desto niedriger der K_D -Wert

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante zwischen Sam68 und Yes1-Varianten wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) etabliert. Pro Ansatz wurde 1 µg HN-Sam68 in 100 µl PBS in die Vertiefung einer Kupfer-beschichteten 96 well-Platte (*Copper Coated Binding Capacity Plates*, Pierce) gegeben und 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Durch Ausbildung eines Kupfer-Chelatkomplexes wird Sam68 über den 6xHN-tag spezifisch an die Platte gebunden. Die Proteinlösung wurde im Anschluss entfernt und dreimal mit mind. 200 µl Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch eine einstündige Inkubation mit je 200 µl *Blocking*-Puffer abgesättigt. Nach Entfernen der Blocklösung und drei weiteren Waschschritten wurde je 100 µl einer Yes1-Verdünnungsreihe (zwischen 0,1 und 50 ng bei starken Bindern bzw. 0,1 bis 12 µg bei schwachen Bindern) zugegeben. Während der einstündigen Inkubation bei RT konnte die SH3-Domäne von Yes1 an die PxxP-Motive des gecoateten Sam68-Proteins binden. Die Yes1-Lösungen wurden anschließend abgezogen und die Platte fünfmal gewaschen. Je 100 µl eines anti-GST-HRP-Antikörpers (1:25.000 in *Blocking buffer*) wurden in jede Vertiefung gegeben und bei leichtem Schwenken für 1 h bei RT inkubiert. Nach sechs Waschschritten wurden 100 µl TMB-Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben. Das Enzym HRP setzt das TMB-Substrat zu einem blauen Farbstoff um. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt, wodurch der Farbstoff nach gelb umschlägt. Die Absorption der einzelnen Proben wurde im 96 well-Plattenauswerter bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 570 nm gemessen. Die Sättigungskurve (frei gegen gebunden) wurde mithilfe des *Scatchard plot* (gebunden gegen gebunden/frei) als Gerade dargestellt, deren Steigung dem negativen reziproken Wert der K_D entspricht.

2.2.5.7 Alkalische Lyse von Hefe

Alle Schritte des Hefezellaufbruchs wurden bei 4°C durchgeführt. Von einer Hefekultur der log-Phase ($OD_{600} \sim 1 - 3$) wurden 10 OD_{600} Einheiten geerntet, mit 1 ml H₂O gewaschen und das Zellpellet in 150 µl alkalischem Lysepuffer resuspendiert. Während der alkalischen Lyse wurden die Ansätze 10 min inkubiert, im Anschluss mit 150 µl 50% Trichloressigsäure versetzt und weitere 10 min inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 20.000 g abzentrifugiert, zweimal mit 1 M Tris überschichtet, zweimal mit 0,5 ml kaltem Aceton gewaschen und das Pellet in 100 µl 1-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteinproben wurden 10 min bei 95°C aufgekocht, scharf

abzentrifugiert und 20 µl des Überstandes (= 2 OD₆₀₀-Einheiten) für die Auftrennung per SDS-PAGE verwendet.

2.2.5.8 Herstellung von nativem Hefelysat

10 ml YPDA wurden mit Hefeeinzelkolonien angeimpft und üN bei 30°C und 190 rpm geschüttelt. Ausgehend von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft (OD₆₀₀ = 0,1) und 4 h geschüttelt. 30 ml der Hauptkultur wurden bei 3.000 g für 5 min zentrifugiert und zweimal mit 10 ml Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und zusammen mit 500 µg Glasperlen für 5 min auf Stufe 10 gevortext, um die Hefezellen aufzuschließen. Nach abzentrifugieren von Zelltrümmern bei 10.000 g für 2 min wurde der Überstand abgezogen.

2.2.5.9 Anreicherung der flag-Qβ-Replikasekomponenten aus Hefelysat

Aus den Hefestämmen AH109-Qβ, AH109-Qβ/CYCp-S1/CYCp-Hfq oder AH109-Qβ/ADH-S1/CYCp-Hfq wurde Lysat hergestellt (2.2.5.8) und der Überstand in eine Immunpräzipitation eingesetzt. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Agarose mit anti-flag gekoppelten Antikörpern (anti-Flag M2 Affinity Gel Suspension) wurde zweimal mit 0,5 ml 1x TBS gewaschen und bei 8.200 g für 30 sec zentrifugiert. Das Agarosesediment (20 µl) wurde mit 500 µl Qβ-Hefelysat resuspendiert und üN bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Proben wurden 30 sec bei 8.200 g zentrifugiert und dreimal mit 0,5 ml 1x TBS gewaschen. Auf diese Weise wurden flag-Proteine aus dem Hefelysat angereichert. Die Agarosepartikel mit daran gebundenen flag-Qβ-Komponenten wurden direkt in den Qβ *in vitro* Test (2.2.4.3) eingesetzt.

2.2.5.10 *In vitro* Translation

Zur Überprüfung der Korrektheit des ORFs des synthetisch hergestellten AID-Gens, wurde die AID ausgehend von dem Plasmid pIVEX-MCS_AID *in vitro* im RTS 100 *E. coli* HY Kit nach Angaben des Herstellers bei 30°C innerhalb von 2 h translatiert. Als Positivkontrolle wurde GFP translatiert (pIVEX-GFP). 20% des Produktes wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mittels anti-AICD-Antikörper (Abcam) detektiert.

Tab. 41. Pipettierschema zur *in vitro* Translation

Komponente	Endkonz.
Plasmid-DNA	200 ng
Reaktionsmix	20%
Reaktionspuffer	10%
Aminosäuremix	24%
Methionin	2%
<i>E. coli</i> Lysat	24%

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, ein autonomes kontinuierliches Evolutionssystem zu etablieren, kombiniert aus Mutations- und Selektionssystem. Dabei sollten auf Nukleinsäure-Ebene Mutationen in ein Protein-Protein-Interaktionspaar eingeführt und die resultierenden Protein-Mutanten direkt mittels *yeast two-hybrid* (Y2H) System durchmustert werden. Das Prinzip der Y2H Selektion und deren Anwendung in den Evolutionssystemen wird im Folgenden erläutert.

3.1 *In vivo* Selektion von Protein-Protein-Interaktionspartnern im *yeast two-hybrid* System

Das Y2H System ist eine sensitive Methode, um *in vivo* Protein-Protein-Interaktion nachzuweisen. Zur Selektion von Protein-Protein-Interaktionspartnern in der Bäckerhefe diente in dieser Arbeit ein Gal4-basiertes System (Fields *et al.* 1989). Gal4 ist ein Transkriptionsaktivator und wird für die Expression von Genen benötigt, die Galaktose umsetzen. Er besteht aus zwei teilbaren Domänen, die zusammen für die Funktionalität nötig sind: die N-terminale DNA-Bindedomäne (BD) und die C-terminale Aktivierungsdomäne (AD). Wie in Abb. 6 verdeutlicht, wird bei diesem System BD an ein Köderprotein (BD-bait) und AD an ein Beuteprotein (AD-prey) fusioniert. In der Regel werden die *bait*- und *prey*-Fusionen auf je einem Plasmid kodiert, die sowohl für *E. coli* als auch für Hefe jeweils unabhängige Selektionsmarker tragen (*shuttle*-Plasmid). Hefe-Kotransformanten, die beide Plasmide aufgenommen haben, werden auf Doppelselektivmedium (*Drop Out* = DO TrpLeu) selektiert. Meist handelt es sich bei dem *prey*-Protein um ein Gemisch aus Proteinvarianten, die mit dem *bait*-Protein unterschiedlich gut interagieren. Für die Selektion von echten Interaktionspartnern muss zusätzlich auf die Expression von einem bzw. mehreren Y2H Reportern selektiert werden. Findet zwischen BD-bait und AD-prey eine Protein-Protein-Interaktion statt, so kommen auch die beiden Gal4-Komponenten BD und AD in räumliche Nähe, binden an die *upstream activation sequence* (UAS) und die Expression des Reportergens durch die RNA Polymerase II wird aktiviert. Handelt es sich bei dem Reporter um ein Enzym aus dem Aminosäurereststoffwechsel, so kann die Hefezelle eines dafür auxotrophen Stamms nur wachsen, wenn Protein-Protein-Interaktion stattfindet. Somit kann bei entsprechender Selektion aus dem Proteingemisch ein gutes Bindepaar identifiziert oder aber auch eine bereits vermutete Interaktion verifiziert werden.

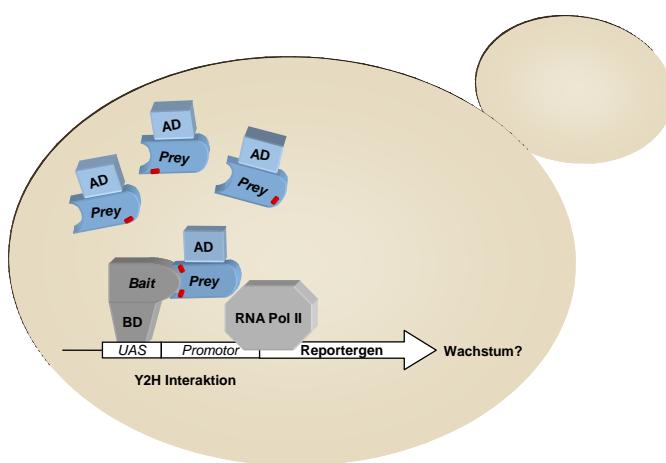


Abb. 6. Schematische Darstellung des Gal4-basierten yeast two-hybrid Systems. Details siehe Text. Rote Markierung symbolisiert Mutationen im prey-Protein.

Im Hinblick auf diese Arbeit sollte mithilfe des Y2H Systems aus einem Gemisch an Hefeklonen mit unterschiedlich affinen Interaktionspartnern diejenigen Hefeklone bevorzugt angereichert werden, die auf ihren Plasmiden Gene für gute Interaktionspartner kodieren und sich über schnelleres Wachstum durchsetzen. Die Kopplung von Genotyp und Phänotyp war eine essentielle Voraussetzung zur Etablierung eines Evolutionssystems.

Das Y2H System wurde ursprünglich dafür entwickelt, Hefen mit den beiden Plasmid-kodierten Interaktionspartnern zu transformieren und anschließend den Transformationsansatz auf Agarplatten auszuplattieren (Fields *et al.* 1989). Diese Selektionsmethode auf Platte funktioniert in der Regel recht gut, ist aber auf 10^3 Klone pro Platte beschränkt; werden Hefezellen zu dicht plattiert, ernähren sie sich von sterbenden Nachbarzellen (Kannibalismus/cross-feeding, Pfeiffer *et al.* 2004)), so dass keine echte Selektion mehr stattfindet. Für die Entwicklung eines kontinuierlichen Evolutionssystems, in dem die Mutation von Protein-Protein-Interaktionspartnern und die anschließende Selektion über mehrere Generationen hinweg stattfinden soll, war es notwendig, die verlaufende Selektion in Flüssigkultur durchzuführen. Nur dort kann kontinuierlich eine genügend hohe Klonanzahl durchmustert werden.

3.1.1 Protein-Protein-Interaktionsstärke und Wachstumsverhalten korrelieren in Flüssigkultur

Zur Selektion wurden zwei Y2H Hefestämme verwendet: AH109 und im späteren Verlauf der Arbeit war Y2HGold verfügbar. Die Genotypen sind identisch, mit Ausnahme der Y2H Reporter *lacZ* (AH109) bzw. *Aur1-C* (Y2HGold). Beide Hefestämme enthalten jeweils vier Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* und *lacZ* bzw. *Aur1-C*) als Y2H Selektionsmarker (Abb. 7), die von drei unabhängigen Promotoren (G1, G2 und M1) kontrolliert werden (Giniger *et al.* 1985; 1988). Gemeinsam ist den Promotorelementen lediglich die kurze Protein-bindende Sequenz in der UAS, an die die Gal4-DNA BD bindet. Selektiert man auf die Expression mehrerer Selektionsmarker gleichzeitig, verringert sich die Anzahl an falsch positiven Klonen. Da sich das Auslesen der *lacZ*-Expression nicht für die direkte Quantifizierung der Y2H Interaktion in Flüssigkultur eignete, wurde bevorzugt Y2HGold mit dessen alternativem Reporter *Aur1-C* verwendet, sobald er verfügbar war.

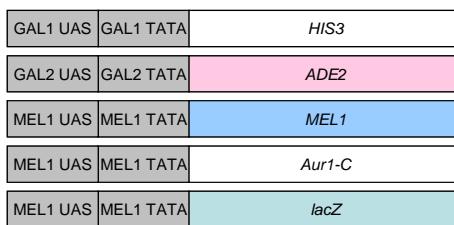


Abb. 7. Y2H Reportergene mit Promotorelementen. In den Y2H Stämmen sind bis zu vier der Reportergene im Genom integriert. Sie sind unter der Kontrolle von drei unabhängigen Gal4-Promotorelementen.

Wie bereits erwähnt, ist es notwendig, die Protein-Protein-Interaktion im Y2H mittels Kombination unabhängiger Reporter zu überprüfen, um falsch positive Ergebnisse so gering wie möglich zu halten. Bei den Reportern unterscheidet man generell zwischen Nährstoff-, Antibiotika- und Farbmarkern. Tab. 42 zeigt, welche Y2H Reporter bei den verwendeten Hefestämmen zur Auswahl standen. Bei Verwendung von Farbmarkern wachsen Hefeklone, egal ob Protein-Protein-Interaktion stattfindet oder nicht, jedoch ist eine visuelle Unterscheidung zwischen Interaktion und Nicht-Interaktion möglich.

Fehlende *ADE2*-Expression in Hefezellen führt zur Anhäufung von Stoffwechselprodukten, die in der Vakuole zu roten Pigmenten polymerisieren, weswegen die Hefekolonie rosa erscheint (Fisher 1969). *MEL1*-Expression führt zur Bildung des Enzyms α -Galaktosidase, welches X- α -Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galaktopyranosid) hydrolysiert und zur Blaufärbung der Kolonie führt.

Nährstoff- und Antibiotikamarker sind dazu geeignet zwischen Hefewachstum und Nicht-Wachstum zu unterscheiden. Das wichtigste Kriterium bei der Etablierung eines Selektionssystems war die graduelle Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp. Dazu wurden titrierbare Reporter genutzt, deren Expressionsstärke mit dem Wachstumsverhalten korrelieren. Je besser die *bait-prey*-Interaktion, desto mehr Reporter soll exprimiert werden, und desto schneller soll der Hefeklon wachsen, sich also schneller teilen als Hefeklone mit schwach interagierenden Proteinpaaren. Diese Sensitivität war bei dem Reporter *HIS3* gegeben. Je mehr von diesem Enzym des Histidin-Stoffwechsels produziert wird, desto besser kann der Hefeklon in Medium ohne Histidin wachsen. Um den Selektionsdruck zu erhöhen, kann 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) dem Medium zugesetzt werden, um Histidin zu limitieren (Klopotowski *et al.* 1965). 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor der Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase, dem Protein des *HIS3*-Gens.

Des Weiteren fand für die Selektion in Flüssigkultur ein zweiter titrierbarer Reporter Anwendung; *Aur1-C* kodiert für die mutierte Variante der Phosphatidylinositolceramidphosphoinositol-Transferase (IPC-Synthase), welche zur Sphingolipid-Biosynthese benötigt wird. Die Expression von *Aur1-C* vermittelt starke Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Aureobasidin A (AbA), das sonst schon in geringen Mengen toxisch auf Hefen wirkt. Im Hefestamm Y2HGold ist *Aur1-C* als Y2H Selektionsmarker mit entsprechender Expressionskassette in den *ura3-52* Lokus integriert (Nguyen, unveröffentlicht).

Tab. 42. Y2H Reportergene und ihre Verwendung bei der Selektion von Y2H Interaktionspartnern

Reportergen	Kategorie	Phänotyp bei Interaktion	Agarplatte	Flüssigkultur
<i>HIS3</i> (Imidazolglycerolphosphat Dehydratase; Histidin-Biosynthese-Stoffwechsel)	Nährstoff	Wachstum bei Abwesenheit von Histidin Titration mittels 3-Aminotriazol möglich	✓	✓
<i>ADE2</i> (Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase; Purin-Biosynthesestoffwechsel)	Nährstoff	Wachstum trotz Abwesenheit von Adenin	--	--
<i>MEL1</i> (α -Galaktosidase, sekretiert ins Periplasma, hydrolysiert Melibiose zu Galaktose und Glucose)	Farbmarker	Kolonie verfärbt sich nicht rosa, sondern bleibt weiß	✓	✓
<i>Aur1-C</i> (dominante Mutante der Inositolphosphorylceramid Synthase)	Antibiotikum	Vermittelt Resistenz gegenüber Aureobasidin A	✓	✓
<i>lacZ</i> aus <i>E. coli</i> (β -Galaktosidase, sekretiert nicht)	Farbmarker	Blaufärbung bei Anwesenheit von X- β -Gal (nach Zellaufschluss!)	--	--

Sowohl für die Selektion von Interaktionspartnern nach der Kotransformation als auch während der Selektion von Hefemutanten in Flüssigkultur wurden die Farbmarker *ADE2* oder *MEL1* mit den Selektionsmarkern *HIS3* und *Aur1-C* kombiniert. Konkret wurde ein Minimalmedium verwendet, in dem Histidin und Adenin fehlten und das zusätzlich 3-AT oder im Fall von Y2HGold Aureobasidin A (AbA) enthielt. Im Folgenden wird das Selektivmedium mit alleiniger Selektion auf die Plasmide als DO TrpLeu bezeichnet. Um die Selektionsbedingungen bezüglich Y2H Interaktion hervorzuheben, werden die weiteren Marker unterstrichen bzw. Zusätze mit angegeben (z. B. DO TrpLeuHis/3-AT oder DO TrpLeuHisAde/AbA).

Das Wachstumsverhalten von Hefekulturen in Minimalmedium mit hohem Selektionsdruck auf Y2H Interaktion (durch Zugabe von 3-AT- bzw. AbA) wurde im Folgenden anhand verschiedener Protein-Protein-Interaktionspaare ausgetestet.

3.1.1.1 Modellsystem p53 und großes SV40 T-Antigen

Eines der Interaktionspaare auf das in dieser Arbeit zurückgegriffen wurde, ist das Tumorsuppressor-Protein p53, das an einige virale Onkogene bindet, darunter auch an das große SV40 T-Antigen. Dabei handelt es sich um ein gut untersuchtes Protein-Protein-Interaktionspaar, dessen starke Interaktion im Y2H bereits überprüft wurde (Iwabuchi *et al.* 1993; Li *et al.* 1993).

In dem kommerziell erhältlichen Y2H Kit (Clontech) sind neben den Leervektoren pGBKT7-BD (Plasmidmarker *TRP1*) und pGADT7-AD (Plasmidmarker *LEU2*) für die Klonierung eigener BD-*bait* und AD-*prey* Fusionen auch ein Positiv- und Negativkontrollpaar enthalten. Als Positivkontrollpaar diente das murine p53, das an die DNA-Bindedomäne fusioniert ist (pGBKT7-p53) und das T-Antigen, das an die Aktivierungsdomäne kloniert wurde (pGADT7-T). Als Negativkontrolle diente das humane Lamin C, das mit der BD fusioniert wurde (pGBKT7-Lam). Lamin C bildet keine Komplexe und Interaktionen mit anderen Proteinen sind nicht bekannt (Bartel *et al.* 1993; Ye *et al.* 1995).

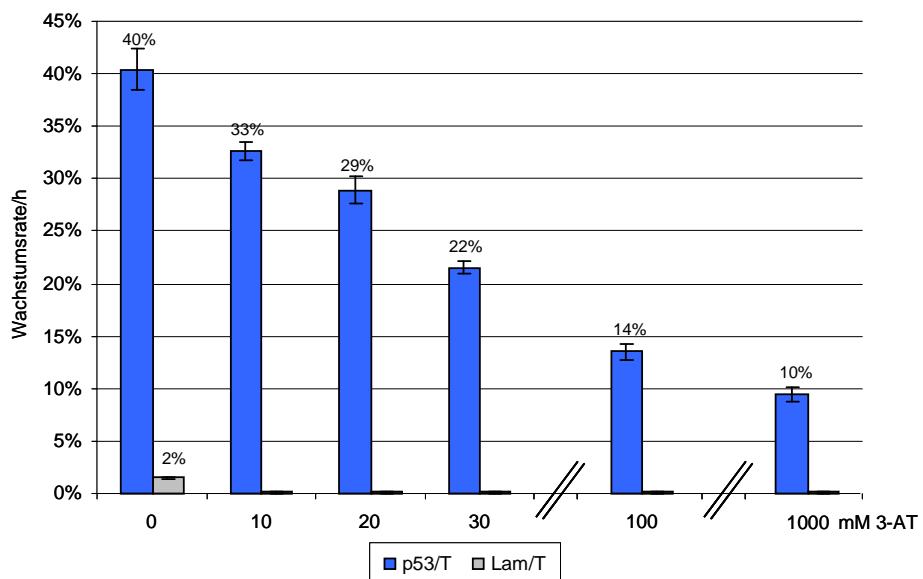


Abb. 8. Wachstumsraten von Hefe-Kotransformanten in Abhängigkeit von 3-AT. AH109 wurde mit pGADT7-T und pGBKT7-p53 bzw. pGBKT7-Lam kotransformiert (2.2.2.3) und auf DO TrpLeu Agarplatten selektiert. Je fünf Klone wurden in DO TrpLeuHis Flüssigmedium mit 3-AT über 48 h kultiviert und die Wachstumsrate bestimmt (2.2.2.5). Die Wachstumsraten der Hefen mit den unterschiedlichen Interaktionspaaren ließen sich mit 3-AT titrieren und korrelierten mit den vorhergesagten relativen Interaktionsstärken:

p53/T = starkes Interaktionspaar → schnelles Wachstum, hohe Wachstumsrate;

Lam/T = schwaches Interaktionspaar → langsames Wachstum, niedrige Wachstumsrate

Diese beiden Paare dienten in den ersten Protein-Protein-Interaktionsstudien als Positiv- und Negativkontrolle. Der Y2H Stamm AH109 wurde mit pGBKT7-p53 und pGADT7-T bzw. pGBKT7-Lam und pGADT7-T kotransformiert (2.2.2.3). Kotransformanten wuchsen auf DO TrpLeu Agarplatten. Nur die Positivkontrolle lieferte aufgrund der Y2H Interaktion Klone auf DO TrpLeuHis Agarplatten. Der Test auf Eigenaktivierung des Systems (pGADT7-T und pGBKT7-BD bzw. pGBKT7-p53 und

pGADT7-AD) war negativ, so dass mit diesen beiden Proteinpaaren das Wachstumsverhalten in Flüssigmedium DO TrpLeuHis mit steigenden Konzentrationen an 3-AT untersucht werden konnte. Die Zunahme der Absorption über 48 h wurde gemessen und daraus die Wachstumsrate berechnet (2.2.2.5). Wie in Abb. 8 ersichtlich, sinkt bei der Positivkontrolle die Wachstumsrate mit zunehmender Konzentration an 3-AT. Wie erwartet, zeigt die Negativkontrolle schon bei geringster Zugabe an 3-AT kein Wachstum mehr. Eine Titration der *HIS3*-Expression in Flüssigkultur war demnach gegeben. Zur Austestung der Empfindlichkeit des Y2H Systems wurden Interaktionspartner verschiedener Interaktionsstärken im Y2H System in Flüssigkultur miteinander verglichen. Da bei dem oben beschriebenen Paaren keine Partner bekannt waren, die auf mittelstarke Interaktion schließen ließen, wurde ein weiteres Modellsystem etabliert.

3.1.1.2 Modellsystem Sam68 und SH3-Domänen

Das zweite Interaktionspaar, das in dieser Arbeit Anwendung fand, ist die Interaktion des humanen Proteins Sam68 mit verschiedenen SH3-Domänen. Namengebend für Sam68 (*Src-associated protein during mitosis of 68 kDa*) war seine Bindung an die c-Src-Kinase während der Mitose (Fumagalli *et al.* 1994a; Taylor *et al.* 1994a). Sam68 enthält eine KH-Domäne (*heterogeneous nuclear ribonuclear protein K homology*), die an RNA-Bindung beteiligt ist (Itoh *et al.* 2002), und mehrere Prolin-reiche (PXXP)Motive, die bekannten *Src homology-3 (SH3)*-Bindestellen sehr ähnlich sind (Wong *et al.* 1992). Seine biologische Rolle ist vielfältig: Regulation von *RNA splicing*, nukleozytoplasmatischer Transport, mRNA Stabilität, Translation und Signaltransduktion, sowie Zellzyklus-Regulation (Fumagalli *et al.* 1994a; Taylor *et al.* 1994a; Richard *et al.* 1995; Resnick *et al.* 1997).

In der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Wagner (Universitätsklinikum Regensburg) wurde mittels *phage display* die Wechselwirkung zwischen Sam68 und diversen SH3-Domänen untersucht (Kellner *et al.* 2007, Asbach *et al.* 2010). Es zeigte sich, dass die SH3-Domäne von Yes1, einer Src (sarcoma)-Tyrosinkinase, sehr gut mit Sam68 interagiert. Nach Generierung einer Yes1-*library* wurde nach mehreren *penning*-Runden eine Variante (= Yes1-mut) mit sechs AS-Mutation im *RT-loop* selektiert, die 67-fach besser mit Sam68 interagiert als der Yes1-Wildtyp (Yes1-wt). Zudem konnte mittels *phage display* gezeigt werden, dass die SH3-Domäne von Ras-GAP, ein Protein der *GTPase-activating protein* Familie (Pomerance *et al.* 1996), nicht mit Sam68 interagiert bzw. SH3 von Intersectin 2, einem Protein der Clathrin-vermittelten Endozytose (Pucharcos *et al.* 2000), schwach mit Sam68 interagiert. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich die durch Phagen-ELISA ermittelten Interaktionsstärken (schwach – mäßig – stark – sehr stark) im Y2H System durch Abstufung der Wachstumsgeschwindigkeiten von Hefe-Kotransformanten widerspiegeln lassen. Dies war Voraussetzung, um in einem Evolutionssystem gut bindende Mutanten in einem Hefemutanten-Gemisch mit unterschiedlichsten Wachstumsraten anzureichern.

Die ursprünglichen Y2H Plasmide pGBK7 (Selektionsmarker *TRP1*, Kana^R) und pGADT7 (Selektionsmarker *LEU2*, Amp^R) besitzen einen 2 µm Hefe-*origin of replication* (ori), so dass von jedem Plasmid ca. 1.000 Kopien in einer Hefezelle enthalten sind. Passiert – im Hinblick auf die Kombination mit einem Mutationssystem – auf einem Plasmid eine Mutation im *prey*-Gen, so dauert es relativ lang bis sich dieses mutierte Gen/Plasmid durchsetzt. Im Gegensatz dazu gibt es *CEN/ARS* Plasmide, die in nur 2 - 3 Kopien pro Zelle vorliegen. Passiert die Mutation auf einem der Kopien, so

werden die Plasmide bei der nächsten Zellteilung auf Tochter- und Mutterzelle verteilt. Das mutierte Gen und die damit verbundene phänotypische Veränderung kann sich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit durchsetzen.

Weil in den Mutationssystemen die Mutation bevorzugt auf AD-prey gerichtet sein soll, wurden die verschiedenen prey-Gene mit der kompletten Y2H Kassette in das CEN/ARS-Plasmid pRS315 umkloniert (pRS315-AD). Dieser Vektor enthält zur Selektion in *E. coli* identisch zum ursprünglichen Vektor pGADT7 das Ampicillin-Resistenz (Amp^R)-Gen *bla* und zur Selektion in Hefe ebenfalls das *LEU2*-Gen. Die SH3-Domänen wurden mit AD fusioniert, wodurch pRS315-AD-Yes1-wt, pRS315-AD-Yes1-mut, pRS315-AD-Intersectin und pRS315-AD-RasGAP entstanden.

Zur prey-spezifischen Mutagenese, die im folgenden Kapitel näher erläutert wird, wurde im zweiten Y2H Plasmid pGBKT7 der starke *ADH1*-Promotor gegen den schwachen *CYC1*-Promotor ausgetauscht. Nach Fusion von Sam68 mit DNA-BD entstand das Plasmid pGBKT7-CYCp-Sam68.

Der Hefestamm AH109 wurde mit den Sam68/SH3-Plasmiden kcotransformiert. Zur Selektion der Plasmidaufnahme wurden die Transformationsansätze auf DO TrpLeu Agarplatten plattiert; zur Selektion von Y2H Interaktion auf TrpLeuHis/100 mM 3-AT/X- α -Gal. Die Spaltung von X- α -Gal ist durch die Expression des Y2H Reporters *MEL1* möglich und führt zur Blaufärbung der Hefekolonien auf Agarplatten (3.1.1). Dieser Farbmarker ermöglichte visuell eine graduelle Unterscheidung zwischen Protein-Protein-Interaktionsstärken auf Agarplatten. Die Hefen mit den Proteinpaaren Sam68/Intersectin und Sam68/RasGAP konnten auf Platten mit 100 mM 3-AT keine Kolonien ausbilden. Es zeigte sich klar, dass die Blaufärbung der Hefekolonien mit Sam68/Yes1-wt bzw. -mut mit der relativen Interaktionsstärke des *phage display* korrelierte. Um die relativen Interaktionsstärken mittels Y2H zu bestimmen, wurden Wachstumskurven von je zehn Hefeklonen aufgenommen (2.2.2.5) und die mittlere Wachstumsrate pro Stunde bestimmt (Abb. 9).

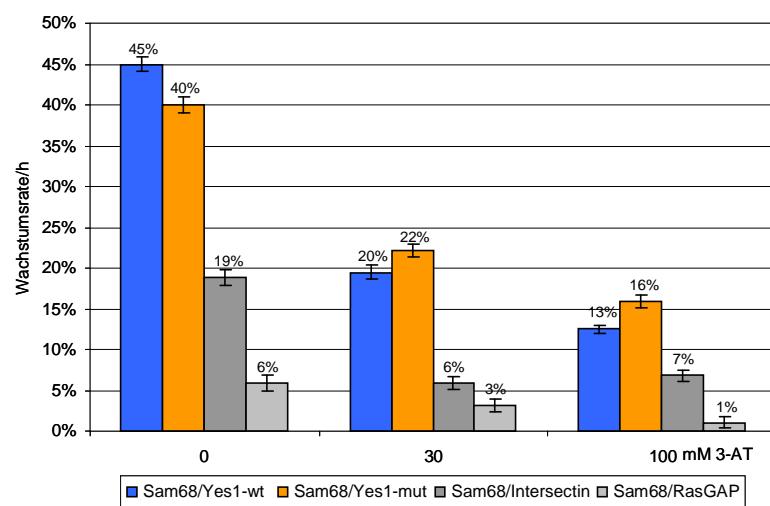


Abb. 9. Korrelation von Interaktionsstärke und Wachstumsrate. AH109 wurde mit pGBKT7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-prey kcotransformiert (2.2.2.3) und auf DO TrpLeu Agarplatten selektiert. Pro Kcotransformante wurden zehn Einzelklone in DO TrpLeuHis (+/- 3-AT) Flüssigmedium für 48 h kultiviert und die Wachstumsraten bestimmt (2.2.2.5). Die ermittelten Wachstumsraten der Hefekulturen korrelieren mit den relativen Protein-Protein-Interaktionsstärken des *phage displays*.

Hefen mit dem Nicht-Interaktionspaar Sam68/RasGAP konnten mit Zugabe von 100 mM 3-AT komplett an ihrem Wachstum gehindert werden. Auf den Transformationsplatten DO TrpLeuHis

konnten sie wie erwähnt keine Kolonien ausbilden, also nicht wachsen; in Flüssigkultur hingegen schon, wenn auch langsam. Dies röhrt daher, dass Vorkulturen von DO TrpLeu in DO TrpLeuHis überimpft wurden. Die Hefezellen hatten demnach noch intrazelluläre Histidin-Vorräte, die es ermöglichen, trotz fehlender Y2H Interaktion in Selektivmedium langsam zu wachsen. Zudem ist bekannt, dass Hefen Nährstoffe der sterbenden Nachbarklone nutzen (Kannibalismus/cross-feeding, Pfeiffer *et al.* 2004)). Hefen mit Sam68/Intersectin wuchsen besser als Hefen mit dem Nicht-Interaktionspaar aber langsamer als Hefen mit den beiden Sam68/Yes1-Paaren. Diese verhielten sich in DO TrpLeuHis-Medium relativ ähnlich. Durch Zugabe von 3-AT wurde deutlich, dass Yes1-mut besser mit Sam68 interagiert als Yes1-wt. Tab. 43 zeigt zusammenfassend die relativen Interaktionsstärken die im Y2H ermittelt wurden im Vergleich zu denen des *phage displays*.

Tab. 43. Relative Interaktionsstärken zwischen Sam68/S3H-Domänen

AH109-	Relative Interaktionsstärke im <i>phage display</i>		Y2H System
Sam68/Yes1-mut	+++	+++	
Sam68/Yes1-wt	++	++	
Sam68/Intersectin	+	+	
Sam68/RasGAP	-	(-)	

Mit den Wachstumstests basierend auf Y2H Interaktion konnte gezeigt werden, dass sich mit dem Y2H System die Protein-Protein-Interaktionsstärke im Wachstumsverhalten sowohl auf Agarplatte als auch in Flüssigkultur mit 100 mM 3-AT abbilden lässt. Protein-Protein-Interaktionstärke, Menge an exprimiertem Y2H Reporter und Wachstumsrate korrelierten. Somit war die Kopplung von Genotyp und Phänotyp in dem Modellsystem Sam68/S3H erfüllt.

Die Mutations-/Selektionssysteme sollten mit einem einfachen Modellsystem etabliert werden. Dabei sollten durch Punktmutationen in der kodierenden Sequenz *prey*-Proteinvarianten entstehen, die sehr viel besser mit *bait* interagieren als das ursprünglich eingesetzte *prey*-Protein. Über Wachstumsvorteile sollten Hefen mit den besseren Interaktionspartnern selektiert werden. Je größer die Wachstumsunterschiede, desto schneller erfolgt die Selektion. Um im Zuge der Etablierung die Dauer der Selektion zu reduzieren, wurden gezielt schlechte Yes1-Varianten hergestellt, die mit Sam68 verminderte Protein-Protein-Interaktion zeigen. Dazu wurden mittels qcPCR (2.2.3.1) gezielt Punktmutationen in Codons konservierter Aminosäuren von Yes1-wt eingefügt (Abb. 10). Die Auswahl der konservierten Bereiche wurde mithilfe von AS-Sequenzvergleichen verschiedener Tyrosinkinasen aus der Src-Kinase Familie getroffen (Martín-García *et al.* 2007).

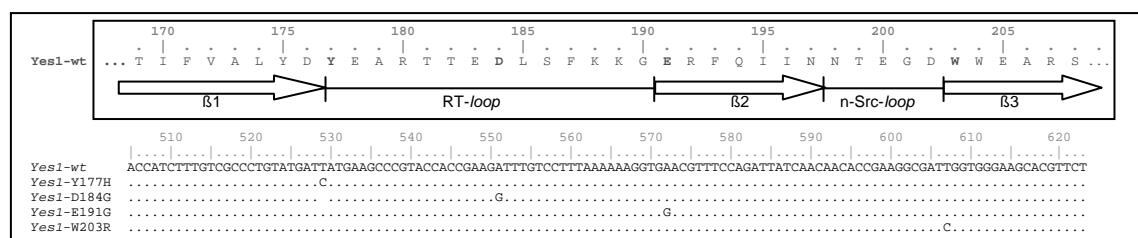


Abb. 10. Nukleotidsequenz-alignment zwischen der SH3-Domäne von Yes1-wt und deren Varianten. Die generierten Yes1-Varianten enthalten jeweils in unterschiedlichen konservierten Bereichen einen Nukleotidaustausch und sind entsprechend ihrem AS-Austausch benannt, wobei der ORF mit der Aktivierungsdomäne beginnt. Die AS-Sequenz von Yes1-wt ist über den Nukleotidsequenzen dargestellt, mit schematischer Darstellung der Sekundärstruktur.

Die relativen Interaktionsstärken zwischen Sam68 und der vier generierten Yes1-Varianten, die sich unmittelbar nach der Kotransformation von Y2HGold mit pGBKT7-CYCp und pRS315-AD-prey auf unterschiedlich stringenten Selektionsplatten zeigten, sind in Tab. 44 dargestellt. Die Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-Y177H bzw. Yes1-D184G war um 50% reduziert, die von Sam68/Yes1-E191G war auf 10% reduziert. Durch Mutation von W203R wurde das WW-Motiv zerstört und dadurch auch die Fähigkeit an das Prolin-reiche Sequenzmotiv (PXXP) von Sam68 zu binden (Chen *et al.* 1995), wodurch die Affinität zwischen Sam68 und Yes1 drastisch reduziert wurde. Da alle Agarplatten mit Selektionsdruck auf Y2H Interaktion leer blieben, wurde weder *HIS3* noch *Aur1-C* exprimiert, wodurch Yes1-W203R für die Etablierung von neuen Evolutionssystemen sehr geeignet war.

Tab. 44. Relative Y2H-Interaktionsstärken von Sam68/Yes1-Varianten auf Selektionsplatten

Kotransformation von Sam68/Yes1	Wachstum auf Selektionsplatten			Relative Y2H Interaktionsstärke
	DO TrpLeuHis	DO TrpLeuHis mit 100 mM 3-AT	DO TrpLeuHis mit 64 nM AbA	
Yes1-wt	++	++	++	100%
Yes1-Y177H	+	(+)	(+)	50%
Yes1-D184G	+	(+)	(+)	50%
Yes1-E191G	+	-	-	10%
Yes1-W203R	-	-	-	0%

Für die folgenden Evolutionsexperimente wurden die Wachstumsraten in Flüssigselektivmedium mit Einfluss von 3-AT bzw. AbA ermittelt (Abb. 11). Die Hefekulturen mit Sam68/Yes1-W203R wuchsen in DO TrpLeuHis sehr langsam und konnten mit Zugabe von 100 mM 3-AT bzw. 136 nM AbA schließlich komplett am Wachstum gehindert werden. Aufgrund der schwachen Interaktion mit Sam68 wird Yes1-W203R im Folgenden als Yes1-weak bezeichnet.

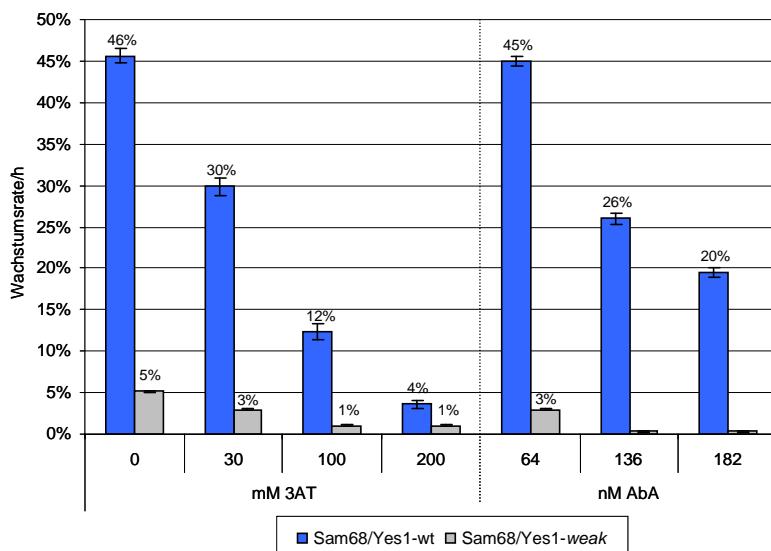


Abb. 11. Wachstumsraten von Y2HGold mit Sam68/Yes1-wt bzw. Sam68/Yes1-weak. Y2HGold wurde mit pGBKT7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-prey kotransformiert und auf DO TrpLeu Agarplatten selektiert. Je zehn Einzelklone wurden in DO TrpLeuHis mit 3-AT bzw. AbA Flüssigmedium über 48 h kultiviert. Die Wachstumsraten von beiden Interaktionspartnern lassen sich sowohl mit 3-AT als auch mit AbA titrieren. Hefen mit dem schwachen Interaktionspaar Sam68/Yes1-weak stellen ab 100 mM 3-AT bzw. 136 nM AbA das Wachstum ein.

Durch Veränderung des WW-Motivs (W203R) aufgrund einer Punktmutation wurde eine Yes1-Variante generiert, die mit Sam68 kaum Interaktion aufweist. Ausgehend von Yes1-weak sollte durch verschiedene Mutagenesesysteme Yes1-wt oder andere besser interagierende Varianten generiert und aufgrund der stärkeren Interaktion mit Sam68 und dem resultierenden Wachstumsvorteil der Hefen in DO TrpLeuHis (mit 3-AT/AbA) selektiert werden können.

3.1.2 Besseres Y2H Interaktionspaar setzt sich in Mischkultur durch

Das Y2H System sollte in dieser Arbeit dafür genutzt werden, um in Flüssigkultur schnell wachsende Hefen (mit guten Interaktionspartnern) unter einer Mehrheit langsamer wachsenden Hefen (mit schlechten Interaktionspartnern) anzureichern. In Vorversuchen wurde am Modellbeispiel Sam68/Yes1 geprüft, ob dies unter gegebenen Selektionsbedingungen möglich ist. In einer gemischten Hefekultur bestehend aus Hefen mit Sam68/Yes1-wt (starke Interaktion) und Sam68/Yes1-weak (schwache Interaktion) sollten nach Selektion nur Hefen mit Sam68/Yes1-wt überleben.

AH109 wurde mit pGBKT7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-Yes1-wt bzw. -Yes1-weak kotransformiert (2.2.2.3). Die beiden Vorkulturen AH109-Sam68/Yes1-wt bzw. AH109-Sam68/Yes1-weak wurden in zwei verschiedenen Anfangsverhältnissen gemischt, anschließend in DO TrpLeuHisAde kultiviert (2.2.2.10), die Wachstumsraten berechnet (2.2.2.5) und die Entwicklung verfolgt. Der praktische Wachstumsverlauf wurde mit dem theoretisch berechneten Verlauf der Selektion verglichen, wobei die in Abb. 11 gezeigten durchschnittlichen Wachstumsraten zu Grunde gelegt wurden: 46% bei Hefen mit Sam68/Yes1-wt und 5% bei Sam68/Yes1-weak. Zur Quantifizierung des vorliegenden Verhältnisses von Hefen mit Sam68/Yes1-wt und Sam68/Yes1-weak wurde Zellmaterial aus Flüssigkultur geerntet, Plasmide isoliert, diese durch Transformation von *E. coli* vereinzelt und die Yes1-Bereiche nach cPCR von 48 Bakterienklonen sequenziert (2.2.2.10).

Mischkultur im Verhältnis 1:100

Beim ersten Selektionswettbewerb wurde die Mischkultur im Zellzahl-Verhältnis $10^4:10^6$ (= AH109-Sam68/Yes1-wt : AH109-Sam68/Yes1-weak) angeimpft. Die beiden Kontrollkulturen enthielten jeweils die entsprechende Zellzahl der reinen Hefekultur (AH109-Sam68/Yes1-weak oder AH109-Sam68/Yes1-wt).

Laut theoretischer Berechnung sollte nach 35 Stunden die Mischkultur zu 100% aus Sam68/Yes1-wt bestehen. Tatsächlich gelang es nach 44 Stunden den anfänglichen Gehalt von 1% Yes1-wt auf 94% anzureichern. Nach 72 h (nach einmaligem Überimpfen im Verhältnis 1:100) konnten zu 100% Yes1-wt Sequenzen identifiziert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Kultur auch zu 100% aus Hefezellen mit Sam68/Yes1-wt bestand. Aufgrund des Farbmarkers *ADE2* konnte beobachtet werden, dass die Mischkultur anfangs rosa gefärbt war und nach dem Überimpfen in frisches Medium weiß blieb, so dass auch optisch die Selektion von Hefen mit starken Interaktionspartnern verfolgt werden konnte.

Die theoretisch und tatsächlich ermittelten Zeitpunkte an denen der starke Binder zu 100% in der selektierten Mischkultur enthalten ist, weichen um ca. 10 h voneinander ab. Durch Vergleich der Kontroll-Reinkulturen ließ sich dies damit erklären, dass Hefen wenn sie dünn angeimpft werden

($< 10^6$ Zellen/ml) langsamer wachsen als in der später dichteren Kultur. Die Anfangzellzahl wurde jedoch mit Absicht so niedrig eingestellt, damit die Mischkultur selten überimpft werden musste, um Verfälschungen zu vermeiden.

Mit diesem Versuch wurde erstmals gezeigt, dass aus einer Mischkultur mit einem anfänglichen Mischungsverhältnis von 1:100 der bessere Binder über Y2H-Interaktionsstärke selektiert werden kann.

Mischkultur im Verhältnis 1:10⁶

Im Hinblick auf die Situation im gekoppelten Mutations-/Selektionssystem, in dem sich eine Mutante gegen eine Vielzahl an Nicht-Mutanten durchsetzen können muss, wurde das Mischungsverhältnis im zweiten Selektionswettbewerb auf 1:10⁶ gesteigert (2.2.2.10). Rechnerisch wurde eine einzelne Hefezelle mit Sam68/Yes1-wt und eine Million langsam wachsender Hefezellen mit Sam68/Yes1-weak in Flüssigkultur gemischt und als Kontrolle wiederum Reinkulturen mit entsprechender Zellzahl angeimpft. Die Wachstumsraten der Misch- und Reinkulturen sowie der Sequenzanteil an Yes1-wt wurden ermittelt. Abb. 12 zeigt die theoretische Zellzahlentwicklung der beiden Interaktionspartner sowie die Yes1-wt-Anteile in der Mischkultur. Bedingt durch die geringe Anfangzellzahl ergibt sich eine lag-Phase, die zur Verschiebung der gesamten Wachstumskurve um ca. 8 h führt. Des Weiteren verhielt sich die Mischkultur entsprechend der vorhergesagten Wachstumsrate. Nach 47 h waren 97% und nach 68 h waren 100% der Sequenzen Yes1-wt. Somit wurde gezeigt, dass sich tatsächlich auch eine schnell wachsende Hefezelle unter einer Million langsamer wachsenden Hefezellen durchsetzen kann.

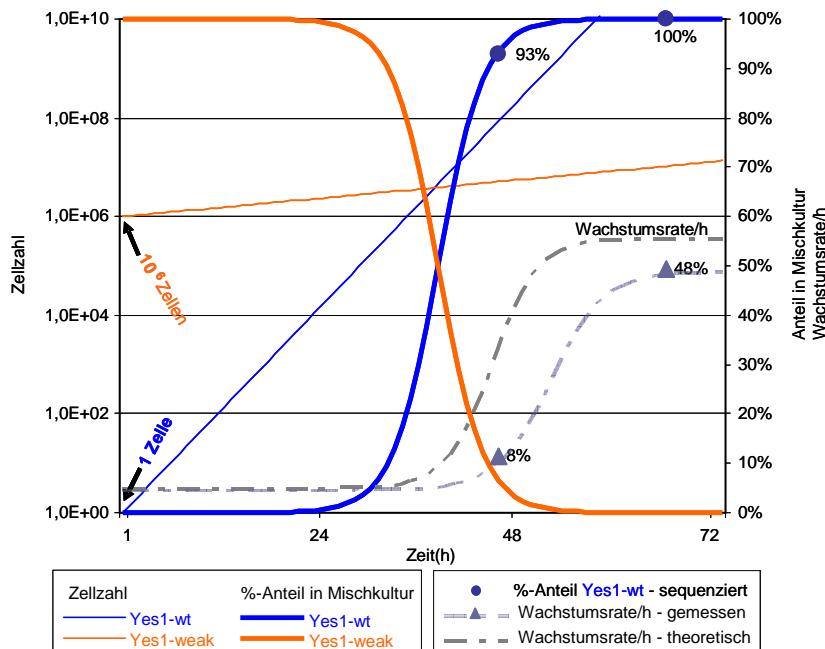


Abb. 12. Theoretische und praktische Entwicklung einer Hefemischkultur. AH109-Sam68/Yes1-wt und AH109-Sam68/Yes1-weak wurden im Zellzahl-Verhältnis 1:10⁶ gemischt und in DO TrpLeuHis selektiert. Die dünnen Linien (orange, blau) zeigen die Zunahme der Zellzahl der schnell und langsam wachsenden Klone. Die daraus resultierende Wachstumsrate ist in blauer Strichlinie dargestellt. Die dicken Linien (orange, blau) geben den prozentualen Anteil von Yes1-wt und Yes1-weak in der Mischkultur wider. Nach 47 und 68 h unter selektiven Wachstumsbedingungen wurden in der Gesamtkultur zu 93 bzw. 100% Yes1-wt Sequenzen identifiziert, was den Erwartungen entsprach, dass sich Hefen mit dem besseren Interaktionspaar anreichern und schließlich durchsetzen.

In diesen Selektionswettbewerben zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Wachstumsrate, sobald sich in der Mischkultur über 20% der schnell wachsenden Kultur angereichert hatte. Dies ließ wiederum darauf schließen, dass die Anreicherung von schneller wachsenden Mutanten in einer Hefekultur über den Anstieg der Wachstumsrate verfolgt werden kann.

Mit diesen Mischversuchen konnte insgesamt gezeigt werden, dass Hefen mit einem starken Interaktionspaar tatsächlich den Wachstumsvorteil in DO TrpLeuHis-Flüssigmedium dazu nutzen können, sich gegen Hefen mit einem schwachen Interaktionspaar durchzusetzen. In dem höheren Mischungsverhältnis hat es wie erwartet einige Stunden länger gedauert bis sich der bessere Interaktionspartner durchgesetzt hat.

3.1.3 Zusammenfassung Selektion von Protein-Interaktionspartnern in Flüssigkultur

In diesem Kapitel wurde das Y2H Selektionssystem in Flüssigmedium für die Anwendung im Evolutionssystem ausgetestet. Dabei ist folgendes festzuhalten:

- Interaktionpaare p53/T und Sam68/SH3-Domänen können für Etablierung der Mutationssysteme verwendet werden
- Protein-Protein-Interaktionsstärke korreliert mit Wachstumsrate
- *HIS3* und *Aur1-C* eignen sich als titrierbare Y2H Reporter in Flüssigmedium
- *ADE2* kann in Flüssigmedium als Farbmarker verwendet werden
- Y2H Selektion in Flüssigkultur ist nicht so stringent wie auf Agarplatten, aber funktioniert
- schneller wachsende Hefen mit starken Interaktionspartnern können sich in den Mischkulturen entsprechend den Erwartungen durchsetzen
- Anreicherung von schneller wachsenden Mutanten wird durch Anstieg der Wachstumsrate sichtbar

Fazit: Mithilfe der Y2H Marker *HIS3* und *Aur1-C* kann in Flüssigkultur graduell zwischen schwachen, mäßigen bzw. guten Proteinaffinitäten unterschieden werden. Folglich kann dieses Y2H Selektionssystem mit verschiedenen Mutationssystemen gekoppelt werden.

Wie in 1.2.1 erläutert, gibt es zwei Arten, um Mutationen in Nukleinsäuren einzufügen. Bei den gerichteten Systemen werden Mutationen gezielt innerhalb einer definierten Region in der Erbsubstanz eingefügt. Hingegen passieren bei den ungerichteten Systemen Mutationen an zufälligen Stellen im Genom bzw. in episomalen Plasmiden. In dieser Arbeit soll gezielt einer der beiden Protein-Protein-Interaktionspartner verändert werden. Für diesen Zweck ist sicherlich ein gerichtetes Verfahren zu bevorzugen. Der Nachteil einer ungerichteten Mutagenese wird im Folgenden kurz aufgezeigt.

3.2 Ungerichtete Mutagenese durch Ethylmethansulfonat

Die Zufallsmutagenese wird auch heute immer noch angewendet, um das Genom verschiedenster Organismen wie *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* oder *S. cerevisiae* zu verändern. Dabei werden UV-Strahlung (James *et al.* 1977), Transposons (Takahashi *et al.* 2001) und chemische Mutagene wie Ethylmethansulfonat (EMS) (Hapala *et al.* 2005) genutzt, um zufällige DNA-Mutationen einzufügen. Auf diese Weise werden Organismen mit veränderten Eigenschaften generiert und entsprechend der gesuchten Funktion durchmustert.

3.2.1 Das mutagene Agens Ethylmethansulfonat

Ethylmethansulfonat (EMS) gehört zur Gruppe der alkylierenden Agenzien. EMS kann Ethylreste auf Guanin übertragen wodurch O6-Ethylguanin entsteht (Abb. 13). Diese veränderte Base kann mit ihrem Cytosin-Partner nur noch zwei Wasserstoffbrücken ausbilden. Bei der DNA-Replikation paart O6-Ethylguanin mit Thymin (zwei Wasserstoffbrücken) und im folgenden Replikationszyklus paart Thymin mit Adenin. So wird aus dem ursprünglichen G-C Basenpaar ein A-T Paar (Haughn *et al.* 1990; French *et al.* 2006). EMS fügt also als Folge von Nukleotid-Substitutionen zufällig Mutationen ein.

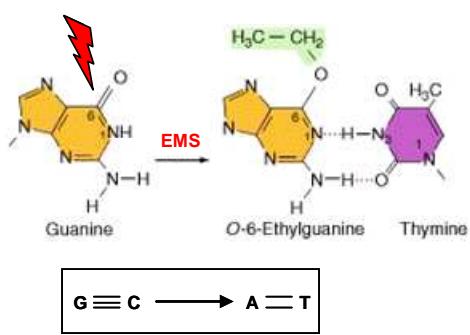


Abb. 13. Alkylierung von Guanin durch EMS.
Erläuterungen siehe Text.
Quelle: <http://www.immuneweb.com>

In Hefe ist die EMS-induzierte Mutagenese eine beliebte Methode, um beispielsweise Bioethanol-Produzenten herzustellen (Mobini-Dehkordi *et al.* 2008). Eine Hefekultur wird mit 3 - 5% EMS für 20 - 60 min geschüttelt (Amberg *et al.* 2005) und die Mutationsreaktion anschließend durch die Zugabe von Natriumthiosulfat (Endkonz. 4%) abgestoppt. Je länger die Hefezellen in EMS inkubiert werden, desto mehr Mutationen etablieren sich, doch desto höher wird auch die Mortalitätsrate. Mutationen werden also in der Regel innerhalb kurzer Zeit eingefügt und im Anschluss daran die resultierenden Mutanten durchmustert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf dem mutagenen Agens EMS ein ungerichtetes, aber kontinuierliches Mutationssystem entwickelt und Hefemutanten mit verbesserten Wachstumseigenschaften selektiert.

3.2.2 EMS-induzierte Wachstumsraten-Steigerung aufgrund genomischer Mutationen

Ziel dieser Arbeit war es, Mutationen kontinuierlich einzufügen, denn Mutation und Selektion sollen über mehrere Generationen hinweg stattfinden, um schrittweise ein Interaktionspaar zu verbessern. Da EMS in hohen Konzentrationen abhängig von der Dauer der Behandlung toxisch wirkt, wurde zunächst ermittelt, bei welcher EMS-Konzentration die Hefekultur zwar überleben kann und dennoch genügend viele DNA-Mutationen eingefügt werden.

AH109 wurde mit pGBKT7-p53 (Plasmidmarker *TRP1*) und pGADT7-T (Plasmidmarker *LEU2*) (3.1.1.1) kotransformiert (2.2.2.3). EMS sollte die DNA von einem oder beiden Interaktionspartnern so verändern, dass die Protein-Protein-Interaktion verbessert wird. Schneller wachsende Mutanten sollten in Selektionsmedium angereichert werden.

AH109-p53/T wurde in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT angeimpft. EMS wurde zu 1%, 0,1% und 0,01% bzw. 0% zugesetzt (2.2.2.11). Von den vier Kulturen wurde die Zunahme der Absorption über die Zeit gemessen. Abb. 14 zeigt den Wachstumsverlauf über 80 Stunden hinweg. Es war deutlich erkennbar, dass die Kultur mit 1% EMS (dunkelblau) nach 24 h nicht mehr wuchs, sondern die Hefezellen abstarben. Der Zusatz von 0,01% EMS schien hingegen wenig Einfluss auf das Wachstum zu haben; die Wachstumskurve gleicht der der Kontrolle ohne EMS-Zusatz (hellblau). Die Hefekultur mit 0,1% EMS wuchs anfangs langsam und erhielt nach 47 und 72 h einen Wachstumsschub (Pfeil), was vermuten ließ, dass sich zu diesen Zeitpunkten neue Mutanten mit verbessertem Wachstum angereichert hatten.

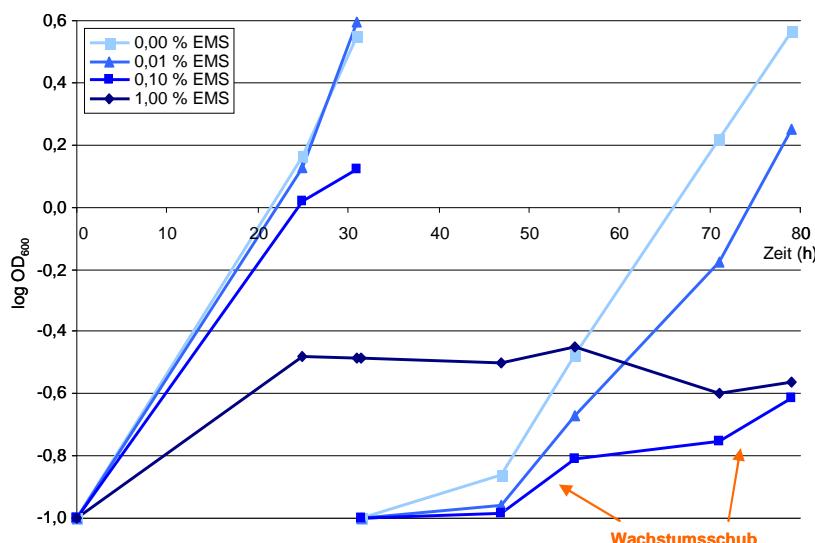


Abb. 14. Einfluss der EMS-Konzentration auf das Wachstum von Hefen. AH109-p53/T wurde mit 0 - 1% EMS für insgesamt 80 h in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT kultiviert, wobei die stationären Hefekulturen nach 32 h in frisches Medium überimpft wurden (2.2.2.11). Die steigende EMS-Konzentration wirkt sich negativ auf die Vitalität der Hefekultur aus. Der Zusatz von 0,10% EMS wirkte mutagen, wodurch sich in der Hefekultur Wachstumsschübe zeigten.

Für weitere Analysen wurden die vier EMS-Kulturen ausplattiert, mit rechnerisch 10^6 Hefen auf DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Platten. Wildtypische AH109-p53/T-Klone bildeten in der Regel auf Agarplatten mit 100 mM 3-AT nach 3 Tagen Kolonien im Durchmesser von 2 mm aus (14% Zuwachs/h), ohne 3-AT dauert es hingegen nur 2 Tage (42% Zuwachs/h). Die Platten der EMS-Kulturen wurden lediglich 2 Tage bebrütet. Sind Mutanten entstanden, die tatsächlich schneller wachsen als Wildtyp, sollten sie schon nach 2 Tagen auf 100 mM 3-AT Platten merklich größer gewachsen sein.

Von der 1% EMS-Kultur hat (wie aus der Wachstumskurve in Abb. 14 bereits ersichtlich) kein einziger Klon überlebt, die Agarplatten blieben leer. Bei der 0% EMS-Kultur bzw. 0,01% EMS-Kultur haben 10^5 bis 10^6 Kolonien überlebt, die als schwacher Rasen sichtbar wurden. Bei der 0,1% EMS-Kultur war ein schwacher Hintergrund von 3.000 Kolonien erkennbar; zusätzlich tauchten interessanterweise

100 große Kolonien auf, die deutlich schneller gewachsen waren (Durchmesser ca. 2 mm). Diese großen Kolonien waren die potenziell EMS-mutierten Klone, die weiter untersucht wurden. Ob dieses verbesserte Wachstum auf bessere Protein-Protein-Interaktion zwischen p53 und T-Antigen zurückzuführen ist, oder ob Veränderungen des Genoms stattgefunden haben, wurde bei den anschließenden Analysen geklärt.

Der EMS-mutierte Hefestamm mit dem Interaktionspaar p53/T wird im Folgenden als AH109-EMSMut-p53/T bezeichnet. Die Wachstumsraten von zehn Einzelklonen im Vergleich zu AH109-p53/T wurden in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT und DO TrpLeu bestimmt. Die Wachstumsraten der zehn EMSmut-Klone schwankten in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT zwischen 23 und 38% Zuwachs/h. Im Mittel war die Wachstumsrate der EMSmut-Klone etwa doppelt so hoch wie die der nicht-mutierten Klone (Abb. 15A). Bei Selektion auf die beiden Plasmidmarker (ohne Y2H Interaktion) zeigten sowohl EMS-mutierte Klone als auch nicht-mutierte Klone identische Wachstumsraten (ohne Abbildung). Somit wiesen die EMS-mutierten Hefeklone nicht generell besseres Wachstum auf, sondern speziell in Histidin-freiem Medium.

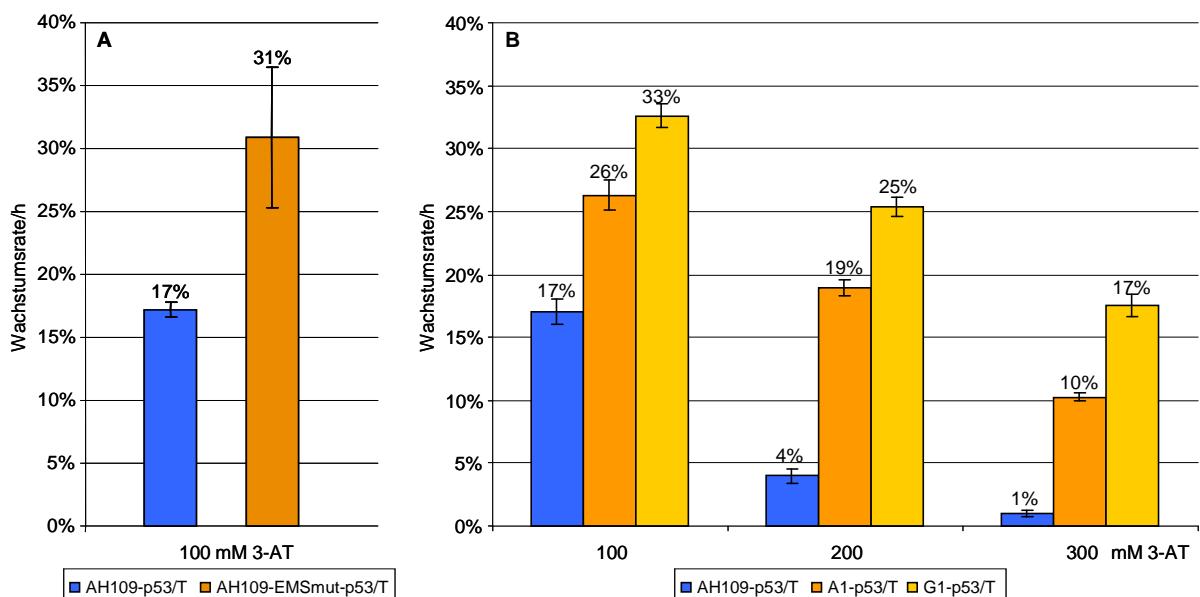


Abb. 15. Gesteigerte Wachstumsraten EMS-mutierter Hefeklone. AH109-EMSMut-p53/T wurden im Vergleich zu AH109-p53/T in DO TrpLeuHis mit 3-AT für 48 h kultiviert. **A.** Die Wachstumsrate zehn mutierter Hefeklone war im Mittel doppelt so hoch wie die der nicht-mutierten Hefekulturen. **B.** Die Wachstumsrate der beiden EMS-mutierten Einzelklone A1 und G1 war unter stringenten Bedingungen stets höher als die von AH109-p53/T.

Um die anschließenden Analysen einzugrenzen, wurden aus den zehn getesteten AH109-EMSMut-p53/T Klonen zwei Klone (A1, G1) ausgewählt, die in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT die größten Wachstumsraten zeigten. Wachstumstests in stringentem Selektionsmedium machten deutlich, dass die Wachstumsraten von A1 und G1 durch 3-AT titriert werden konnten (Abb. 15B). Während AH109-p53/T bei 300 mM 3-AT nicht mehr wuchsen, wiesen die EMSmut-Stämme noch eine beachtliche Wachstumszunahme von 10% (A1) bzw. 17% (G1) pro Stunde auf. Somit beeinträchtigt 3-AT das Wachstum von A1 und G1 weniger stark als das von AH109-p53/T. Die reduzierte Empfindlichkeit war ein Hinweis darauf, dass in den EMS-Mutanten mehr HIS3 exprimiert wird. Dies konnte wie angestrebt aufgrund verbesserter p53/T-Interaktion verursacht worden sein. Dann müsste die Mutation in der

prey oder *bait* DNA stattgefunden haben und auf den Plasmiden identifiziert werden können. So wurde zunächst überprüft, ob das Einbringen der potentiell mutierten Y2H Plasmide in einen wildtypischen Hefestamm den Effekt der verbesserten Y2H Interaktion zeigt (Abb. 16, rechter Pfad). Dazu wurden beide Plasmid-Arten aus AH109-EMSmut isoliert und in *E. coli* vereinzelt (2.2.2.8, 2.2.1.5). Der wildtypische Hefestamm AH109 wurde im Anschluss mit jeweils potentiell mutierten und unmutierten Plasmidpräparationen (p53mut/T bzw. p53/Tmut) ktransformiert (2.2.2.3). Die Wachstumsraten/h von jeweils zehn unabhängigen Ktransformanten war in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT identisch zu den Kontrollkulturen AH109-p53/T (15%). Da den Hefen keine Wachstumsvorteile vermittelt wurden, haben folglich auf den Plasmiden (bzw. in p53 oder T) keine Mutationen stattgefunden. Die durch EMS ausgelöste Mutation konnte ebenso genomisch ein beliebiges Enzym des Histidin-Biosynthesestoffwechsels verändert haben, so dass Wachstum in Histidin-freiem Medium möglich wurde. Deswegen wurde des Weiteren untersucht, ob der EMSmut-Hefestamm mit frisch transformierten Plasmiden in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT besser wachsen kann (Abb. 16, linker Pfad).

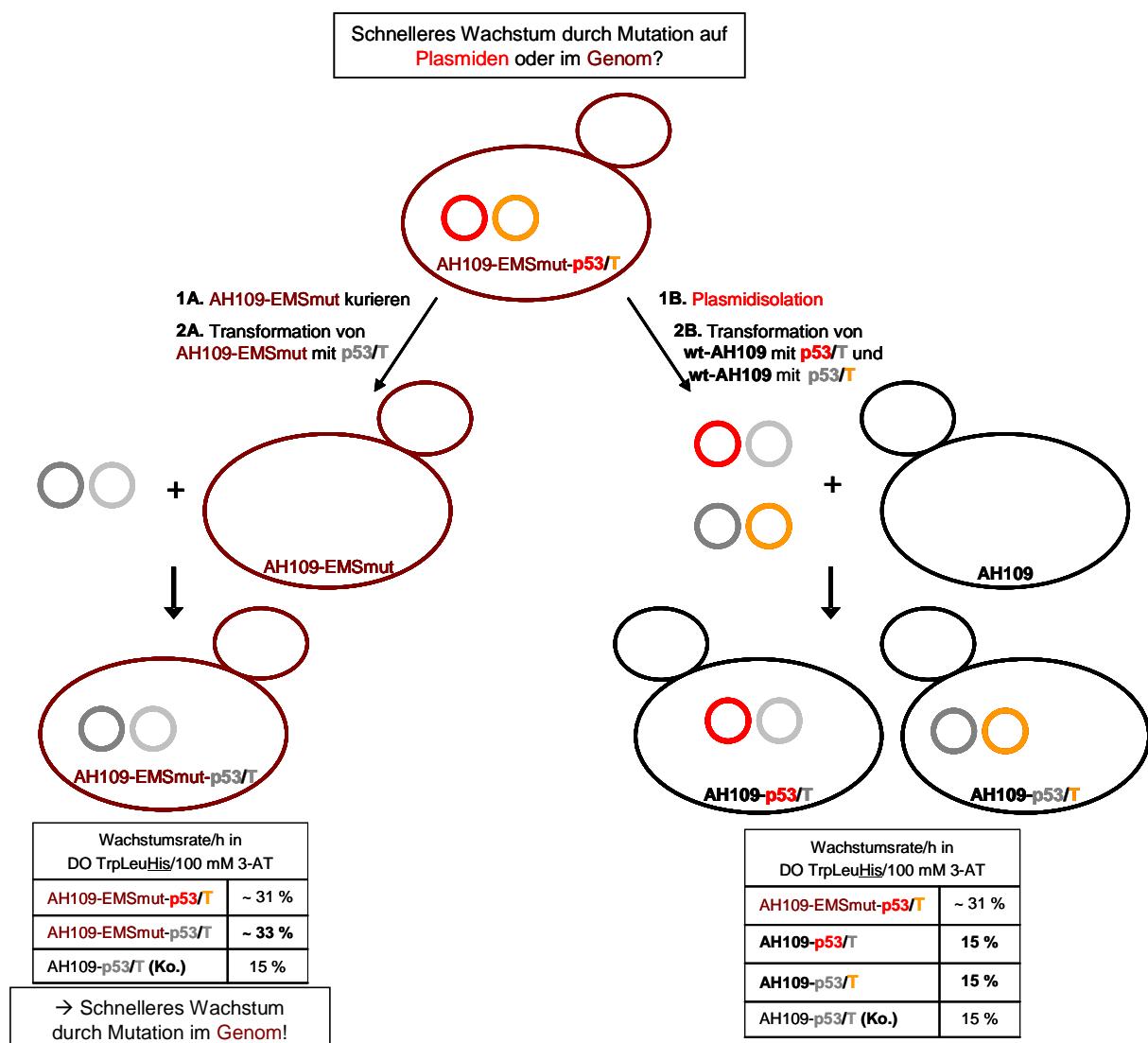


Abb. 16. Überblick der durchgeföhrten Analysen von AH109-EMSmut-p53/T zur Klärung ob EMS eines der Plasmide oder das Hefegenom verändert hat. Details siehe Text.

Für die Analysen des potentiell mutieren Hefestammes wurde dieser von den Plasmiden kuriert (2.2.2.7). So entstanden die beiden AH109-EMSmut-Stämme A1kur und G1kur. Sie zeigten in Minimalmedium (inklusive aller Aminosäuren) das gleiche Wachstumsverhalten wie AH109. Hat tatsächlich im Genom eine Basenveränderung stattgefunden, so verhilft sie dem Hefestamm nicht generell zu besserem Wachstum, sie ist Histidin-spezifisch.

Jeweils zwei Klone von A1kur und G1kur wurden mit den Y2H Plasmiden pGADT7-T-Antigen und pGBKT7-p53 kotransformiert (2.2.2.3). Zum Größenvergleich der Kolonien wurde der wildtypische Hefestamm AH109 ebenso kotransformiert. Die Selektion erfolgte auf DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Agarplatten. Tatsächlich formten die Kotransformanten A1kur- und G1kur-p53/T nach 2 Tagen Inkubation größere Kolonien als AH109-p53/T. Pro Hefestamm wurden fünf Kotransformanten in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Flüssigmedium angeimpft, um die Wachstumsraten zu ermitteln (2.2.2.5). Daraus war klar ersichtlich, dass die Kotransformanten der EMSmutkur-Stämme doppelt so schnell wuchsen wie die des wt-Stamms. Diese Tatsache bestärkte den Verdacht, dass die Mutation im Genom eine Veränderung herbeiführte, die A1/G1 zu besserem Wachstum ohne Histidin befähigt. Mögliche Gene dafür wären am Histidin-Biosynthesestoffwechsel beteiligte. Die Mutationen ortsgenau zu lokalisieren lag jedoch außerhalb des Ziels dieser Arbeit.

Durch Kopplung von EMS-induzierter Mutagenese und Y2H Selektion wurden Hefen selektiert, die in Histidin-freiem Medium schneller wachsen als wt-Hefen. Dass die Mutationen nicht in den Y2H Partnern BD-p53 oder AD-T-Antigen stattgefunden haben, sondern genomicscher Natur waren, verdeutlicht, dass das Selektionsergebnis vom *screening*-System abhängt: „*You get what you screen for.*“ (Schmidt-Dannert *et al.* 1999). Nur wenn Mutationen ortsgereichtet in die Interaktionspartner eingeführt werden, ist die Wahrscheinlichkeit groß genug, dass die selektierten Hefen aufgrund verbesserter Y2H Interaktion besser wachsen.

3.2.3 Zusammenfassung EMS-induzierte, ungerichtete Mutagenese

- kontinuierliche *in vivo* Mutagenese mit EMS wurde etabliert
- Hefemutanten mit Wachstumsvorteilen in Selektivmedium wurden generiert und selektiert
- EMS-induzierte Mutationen fanden wie erwartet ungerichtet statt: Hefegenom statt *bait*-/*prey*-Genabschnitte wurden mutiert

Fazit: Zur Verbesserung von Protein-Protein-Interaktionspartnern wird die Etablierung eines gerichteten Mutationssystems bevorzugt!

Im Folgenden wird die Entwicklung von gerichteten DNA- bzw. RNA-Mutationssystemen vorgestellt.

3.3 Gerichtete Mutagenese durch RNA abhängige RNA-Replikasen

Das Genom von RNA-Viren wird durch RNA-abhängige RNA Polymerasen (RdRP, Replikase) repliziert. Diese Enzyme zeichnen sich durch hohe Fehlerraten aus, was auf deren fehlender *proof reading*-Aktivität beruht. Ohne DNA-Zwischenstadium läuft die Replikation schnell und einfach ab. Aufgrund dessen wurde die Etablierung eines autonomen RNA-Replikons bestehend aus RNA und Replikase vorangetrieben. Ziel dieser Arbeit war es, in Hefe ein kontinuierliches Evolutionssystem zu entwickeln, bestehend aus der Y2H Selektionsmethode und einem gerichteten Mutationssystem, das basierend auf einem RNA-Replikon folgendermaßen ablaufen sollte: BD-*bait* und die zu verändernde AD-*prey* DNA werden in den Hefezellkern geschleust, dort zu mRNA transkribiert und ins Zytoplasma ausgeschleust. Dort soll gezielt nur die einzelsträngige AD-*prey* mRNA in den fehlerbehafteten Replikationszyklus eintreten. Eine Replikase repliziert den Plusstrang der einzelsträngigen RNA (ssRNA) indem sie den Minusstrang bildet, der wiederum als *template* zur Plusstrangsynthese dient. Da die Replikase keine *proof reading*-Aktivität besitzt, werden die RNA-Replikate z. T. fehlerhaft repliziert (rote Markierung, Abb. 17). Fehler häufen sich mit jedem Replikationszyklus an. Die daraus resultierenden (+)RNA-Moleküle dienen gleichzeitig als *templates* für die Translation. Es entstehenden AD-*prey* Proteinvarianten. Je besser die Protein-Protein-Interaktion zwischen *bait* und *prey*-Varianten, desto mehr Y2H Reporter (*HIS3*, *Aur1-C*) wird exprimiert und umso besser kann die Hefezelle mit dem guten Interaktionspaar in Selektivmedium wachsen. Durch die kontinuierliche RNA-Replikation werden über mehrere Generationen hinweg *prey*-Varianten erzeugt, die sich an verschiedensten Positionen zum ursprünglich eingesetzten *prey* unterscheiden und letztendlich durch Selektion des besten Protein-Protein-Interaktionspaars zum perfekten Binder evolviert werden.

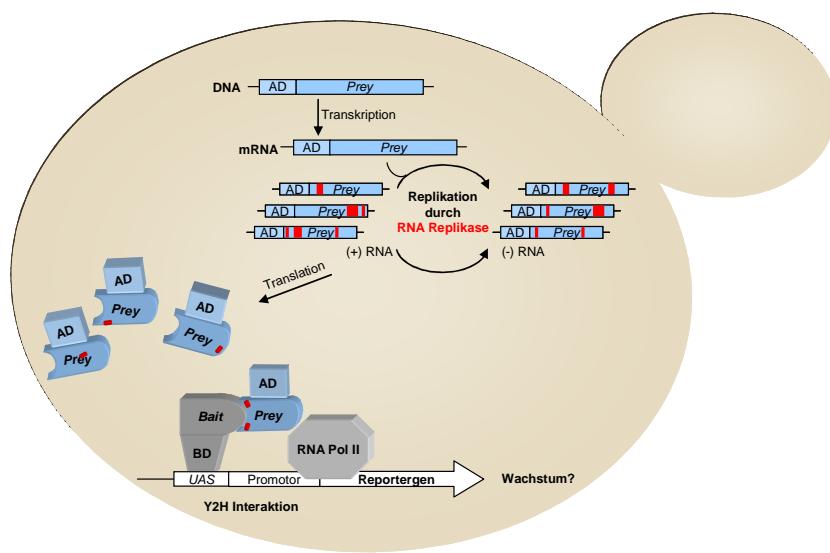


Abb. 17. Kontinuierliches Evolutionssystem kombiniert aus autonomer RNA-Replikation und Y2H Selektion. Erklärung siehe Text.

Für die Etablierung von RNA-Replikons wurden RdRP sowohl von Hefe-eigenen Viren (autologe) als auch von Viren aus anderen Wirtsorganismen (heterologe) ausgetestet.

3.3.1 RNA-Replikasen aus den Hefeviren 20S und 23S

In nahezu allen *S. cerevisiae* Laborstämmen persistieren nicht-infektiöse Viren, die ihrem Wirt keinen Schaden zufügen und deswegen meist unentdeckt bleiben. Die endogenen Narnaviren 20S und 23S wurden erstmals 1971 aus sporulierenden Hefen mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Kadowaki *et al.* 1971a, b). Unter Stressbedingungen wie bei der Kultivierung während der Sporulation in Stickstoffmangel-Medium wird in einer infizierten Hefezelle die sonst niedrige Kopienzahl (zwischen fünf und 20) auf einige tausend erhöht (Garvik *et al.* 1978; Wesolowski *et al.* 1984). Die Viren werden horizontal durch Kreuzung übertragen oder vertikal während der Meiose an die Tochterzellen weitergegeben. Narnaviren sind die einfachsten Viren, die bislang bekannt sind. Sie besitzen keine Virushülle und auf ihrem (+)ssRNA Genom ist lediglich ein einziges Protein kodiert, nämlich die Replikase (Matsumoto *et al.* 1990, 1991). Da Narnaviren nicht in Viruspartikeln verpackt sind, wurde anfänglich angenommen, dass sie lediglich aus nackter RNA bestehen, was namengebend war: naked RNA = NaRNA (Widner *et al.* 1991). Allerdings wurde durch neuere Studien gezeigt, dass die Replikase mit den Genom-Enden über nicht-kovalente Bindungen einen Ribonukleoprotein-Komplex (1:1) ausbildet. Durch ausgeprägte Sekundärstrukturen wird die genomische RNA stabilisiert und so zusätzlich vor Abbau geschützt. Die Narnaviren existieren auf diese Weise als autonomes Replikon im Zytosol der Hefezelle, wobei die Replikase über dsRNA-Zwischenstadien für die Amplifikation des Virusgenoms sorgt (García-Cuéllar *et al.* 1995; Solórzano *et al.* 2000).

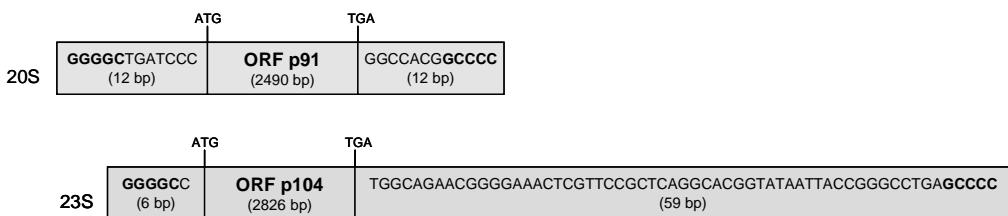


Abb. 18. Schematische Darstellung der cDNA Sequenz der 20S und 23S Hefeviren. 5' und 3' UTRs sind jeweils in ihrer vollen Sequenz dargestellt, wobei die *inverted repeats* durch Fettdruck hervorgehoben sind.

Die RNA Genome von 20S bzw. 23S bestehen aus 2514 bzw. 2891 Nukleotiden und besitzen an den Enden *inverted repeats* in Form von 5'GGGGC-GCCCC3' (Abb. 18), die für die Bindung der Replikase und zugleich für die Replikation zwingend erforderlich sind (Poch *et al.* 1989). Die Replikasen werden aufgrund des Molekulargewichts als p91 (91 kDa) bzw. p104 (104 kDa) bezeichnet (Rodríguez-Cousíño *et al.* 1991) und besitzen jeweils vier Aminosäuremotiv, die für RNA abhängige RNA Polymerasen typisch sind. Die Expression von viraler cDNA oder viraler cDNA in reverse-Orientierung zusammen mit der entsprechenden Replikase in *trans* führte zur Etablierung eines autonom replizierenden Replikons in einem ursprünglich Virus-freien Hefenstamm (Esteban *et al.* 2003, 2005). Aus diesen *in vivo* Experimenten ging hervor, dass beide Replikasen ein distinktes 3' RNA-Ende benötigen, um mit der Replikation zu starten. Dies wurde erreicht, indem eine selbst abspaltbare Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus (HDV) an das 3' Ende des Virusgenoms kloniert wurde (Perrotta *et al.* 1996). Das 5' Ende des Genoms hingegen kann verlängert sein, wird

jedoch in Länge und Sequenz durch die jeweilige Replikase im Laufe der Amplifikation wiederhergestellt (Esteban *et al.* 2003, 2005).

Interessanterweise können 20S und 23S sowohl einzeln vorkommen als auch in einem Hefestamm koexistieren (López *et al.* 2002; Esteban *et al.* 2003). Dies bedeutet, dass die Replikase ihr eigenes Genom jeweils sehr spezifisch amplifiziert, um ihre eigene Existenz zu sichern. Es wurde gezeigt, dass die Replikasen nicht austauschbar sind, also das 20S Genom durch p104 bzw. das 23S Genom durch p91 nicht repliziert werden kann (García-Cuéllar *et al.* 1995). Durch *footprinting*-Analysen konnte ermittelt werden, dass die Replikase p91 spezifisch mit dem zweiten *stem loop* des 5' Endes und dem letzten *stem loop* am 3' Ende in Kontakt steht (Abb. 19) und schwachen Kontakt mit der Mitte des RNA-Genoms aufnimmt (Fujimura *et al.* 2004, 2007), um so die nötige Stabilität zu gewährleisten.

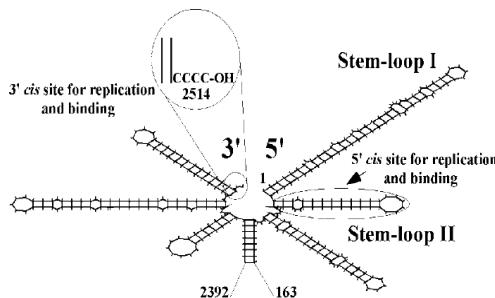


Abb. 19. Sekundärstruktur des 20S RNA Genoms. p91 bindet am *stem loop II* sowie am letzten *stem loop* am 3' Ende. Diese Bindestellen sind für die Replikation des Virusgenoms essentiell. Nach Esteban *et al.* (2008)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, basierend auf den autologen Replikasen p91 bzw. p104 die Etablierung eines autonomen Replikons in Hefe vorangetrieben. Da die Plasmid-kodierten Replikasen ihr eigenes *template*, also ihr eigenes Genom, replizieren können auch wenn sie in *trans* exprimiert werden (Esteban *et al.* 2003, 2005), so sollte es möglich sein, den ORF der Replikase in der cDNA durch *AD-prey* zu ersetzen, so dass *AD-prey* (m)RNA repliziert wird und sich somit ein autonomes, fehlerbehaftetes Replikase/*AD-prey* Replikon etabliert. Aufgrund fehlender *proof reading*-Aktivität sollten dadurch *AD-prey* Varianten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene entstehen, die gleichzeitig im Hinblick auf verbesserte *bait-prey*-Interaktion mittels Y2H System selektiert werden sollen.

Die Herausforderung beim Aufbau dieses Hefeviren-basierten Replikationssystems bestand darin, das *AD-prey template* so anzupassen, dass es spezifisch durch die Replikase p91 bzw. p104 repliziert wird. Zur Etablierung des Hefeviren-Replikons wurde zunächst unabhängig vom Y2H System statt *AD-prey* ein Testreporter verwendet. Erst wenn dieses vereinfachte System der autonomen Replikation der Testreporter-RNA durch die Hefe-Replikase gewährleistet ist, sollte das Hefeviren-Replikations-/Mutationssystem mit dem Y2H gekoppelt werden. Als Testreporter wurde *LEU2opt* (1,1 kb) ausgewählt. Um spontane Rekombination mit genomicscher DNA zu vermeiden, wurde die Gensequenz von *LEU2* so optimiert, dass sie möglichst unähnlich zum wildtypischen Gen ist. Durch Einfügen von stillen Mutationen ist *LEU2opt* auf DNA-Ebene nur noch zu 79% mit dem wt-Gen identisch. Auf AS-Ebene gleichen sich *LEU2* und *LEU2opt* zu 100%.

Da nicht bekannt ist, welche *template*-Erkennungssequenz genau nötig ist, um von Hefevirus-Replikasen spezifisch gebunden und amplifiziert zu werden, wurde basierend auf unterschiedlichen

Literaturhinweisen, der ORF von *LEU2opt* mit definierten, aber unterschiedlich langen 20S bzw. 23S Virusgenomanteilen fusioniert (Tab. 45). Zum einen wurde der Reporter nur mit den UTRs der Viren flankiert (Gruppe 1 bzw. A; Tab. 45). Zudem wurde *LEU2opt* am 5' oder 3' Ende mit dem kompletten Virusgenom fusioniert (Gruppen 6, 7 bzw. E, F; Tab. 45) oder mit Sequenzen, die Teile des viralen Replikase-ORFs enthielten (Gruppen 2 – 5 bzw. B - D; Tab. 45). Zur Erzeugung von distinkten 3' Enden wurde generell die Ribozymsequenz von HDV an die 3' Enden der Virusenden flankierten Reporterkonstrukte kloniert.

Tab. 45. Virusgenomanteile, mit denen *LEU2opt* flankiert wurde und Auswirkung auf Leu2opt-Aktivität (Grau hinterlegte Gruppen vermittelten als Expressionskassetten in Hefe Leucin-Prototrophie)

Virus	Gruppe	Anzahl bp des Virusgenoms		Leu2opt-Aktivität
		5'	3'	
20S	1	12	12	+
	2	102	1260	+
	3	327	26	-
	4	327	36	-
	5	1515	228	+
	6	2514	327	-
	7	327	2514	-
23S	A	6	6	+
	B	6	75	+
	C	300	36	-
	D	300	75	-
	E	2891	300	-
	F	300	2891	-

Beim Anfügen längerer 5' Sequenzen als 12 bzw. 6 bp (= UTR) wurden auch Teile des viralen Replikase-Leserahmens abgedeckt. Diese wurden entweder direkt oder über einen Glycin-Serin-Linker [(EGGGS)₄] mit *LEU2opt* fusioniert und mit bzw. ohne natürlichem Virus-Startcodon kloniert. Insgesamt wurden 19 Konstrukte mit 20S- Virusenden, sowie zehn Konstrukte mit 23S-Virusenden hergestellt. Diese wurden als Expressionskassetten mit einem *ADH1*-Promotor und *LEU2*-Terminator auf dem Plasmid pGBK7 (mit Hefe-*origin of replication*, *ori*) in Hefezellen eingebracht, um zunächst die generelle Leu2opt-Funktionalität zu überprüfen. Als Hefestamm wurde sowohl der Y2H Stamm AH109 verwendet, der wie die meisten Laborstämme bereits 20S und 23S Viren trägt, als auch der Virus-freie Hefestamm 2928-4 (R. Esteban, Spanien). Nach konstitutiver Expression in Hefe vermittelten lediglich die 23S-Konstrukte der Gruppen A und B Leucin-Prototrophie (Tab. 45). Die 5' Enden von *LEU2opt* ließen sich nur um die 5' UTR des 23S-Virus (6 bp) verlängern, um die Funktionalität von Leu2opt zu erhalten. Von den 20S-Konstrukten vermittelten die Gruppen 1, 2 und 5 Leucin-Prototrophie. Hierbei konnte das 5' Ende von *LEU2opt* zwar mit 1515 oder 102 bp, aber nicht mit 327 bp Virussequenzanteil oder dem kompletten 20S-Virusgenom verlängert werden. Über den Grund für die fehlende Leu2opt-Aktivität bei den Gruppen 3, 4, 6 und 7 (Tab. 45) kann nur spekuliert werden (4.1.1). In nachfolgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Leu2opt mit unterschiedlich langen Virusanteilen ausschließlich am 3' Ende ausnahmslos aktiv ist und dessen Proteinfunktion nicht beeinträchtigt wird, wenn am 5' oder 3' Ende das *Kana*^R- oder *ADE2*-Gen fusioniert ist. Somit scheinen beide Enden von *LEU2opt* generell fusionierbar zu sein. Sowohl von *LEU2opt*-Konstrukten die aktives Leu2opt produzieren (Gruppen 1, 2, 5 bzw. A, B; Tab. 45) als auch von jenen, die keine Leucin-Prototrophie vermittelten (Gruppen 3, 4, 6, 7 bzw. C-F; Tab. 45), konnte in

Hefe polyadenyierte *LEU2opt*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 20), so dass alle *templates* transkribiert wurden. Da die Konstrukte zur Überprüfung der Leu2opt-Funktionalität auf pGBK7, einem Plasmid mit Hefe-*ori*, in die Hefezelle eingeschleust wurden, waren die Hefen in diesem Testsystem nicht auf Replikation der *LEU2opt*-Virusenden *templates* durch die Replikasen angewiesen. Diese Experimente lassen damit den Schluss zu, dass bei den Konstrukten der Gruppen 3, 4, 6, 7 bzw. C-F (Tab. 45) die Translation durch die Virussequenz gestört bzw. verhindert wird, möglicherweise da die mRNAs sequenzabhängig eine starke Sekundärstruktur ausbilden (4.1.1).

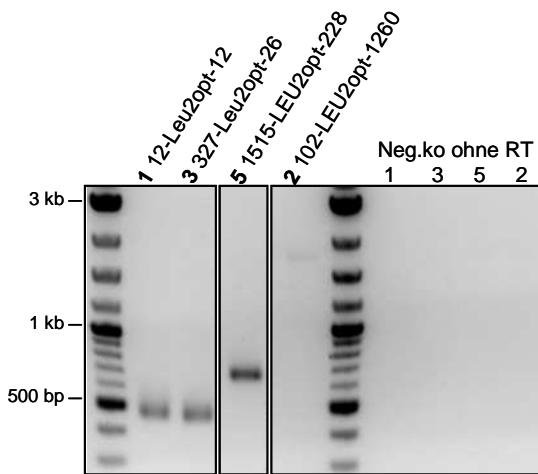


Abb. 20. Nachweis von *LEU2opt*-Virusende mRNA in Hefe. *LEU2opt* wurde mit 20S-Virusanteilen flankiert, als Expressionskassetten auf pGBK7 in AH109 eingebracht (2.2.2.3) und mittels *ADH1*-Promotor exprimiert. Polyadenyierte mRNA wurde aus Hefetransformanten angereichert, über RT-PCR in cDNA umgeschrieben und über PCR amplifiziert (2.2.4.2). Das Konstrukt aus Gruppe 3 wird wie Konstrukte der Gruppen 1, 2 und 5 zwar transkribiert, vermittelt aber den Hefen keine Leucin-Prototrophie. Negativkontrollen (Neg.ko) wurden ohne Zugabe von reverser Transkriptase (RT) durchgeführt und zeigen, dass keine Amplifikation der Plasmid-DNA stattgefunden hat. Bezeichnung der Proben entspricht Gruppennummer in Tab. 45.

Die Reporterkonstrukte, die nach Transformation von Hefen mit Plasmiden mit Hefe-*ori* Leucin-Prototrophie vermittelten (Gruppen 1, 2, 5 bzw. A, B; Tab. 45), waren als Reporter-Konstrukte für die Etablierung eines Replikons geeignet. Als Test dafür wurden diese funktionellen *LEU2opt*-Expressionskassetten auf ein Plasmid ohne Hefe-*ori* kloniert (pSc). Der ORF der Replikasen p91 bzw. p104 wurde zwischen den starken *TEF1*-Promotor und den *CYC1*-Terminator auf pGBK7 kloniert. Die Koexpression von Replikase und Reporterkonstrukt mit entsprechenden Virusenden ließ jedoch in keinem Fall Hefeklone auf Leucin-freiem Agarmedium wachsen. Somit ist davon auszugehen, dass in keinem der transformierten Hefestämme (AH109, 2928-4) Leucin-Prototrophie vermittelt wurde und sich folglich auch endogen kein Replikon etabliert hatte. Da das 3' Ende der Reporterkonstrukte ein empfindlicher Punkt bezüglich Replikationserfolg ist (Esteban *et al.* 2003, 2005), wurde überprüft, ob wie vorgesehen definierte 3' CCC-Enden durch intramolekulare Abspaltung der Ribozymsequenz nach der Transkription entstehen. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, konnte die autokatalytische Ribozymabspaltung *in vitro* induziert werden, somit war die neu synthetisierte Ribozymsequenz korrekt und richtig kloniert, so dass tatsächlich distinkte 3' Virusenden entstanden.

Die Beschaffenheit der 5' und 3' Virusenden, die den *LEU2opt*-Reporter flankieren, scheint offensichtlich kritisch für die Expression von *LEU2opt* einerseits und für die Replikation des

Transkripts andererseits zu sein. Da es durch Anfügen definierter Virussequenzanteile nicht gelungen ist, Replikons bestehend aus dem *template* *LEU2opt*-Virusende und Replikase zu etablieren, entwickelte sich die Idee eines *directed evolution*-Ansatzes zur gezielten Optimierung von einem *template* mit perfekten Enden (4.1.1). Die Durchführung wurde jedoch im Interesse von weiter fortgeschrittenen Projekten zurückgestellt.

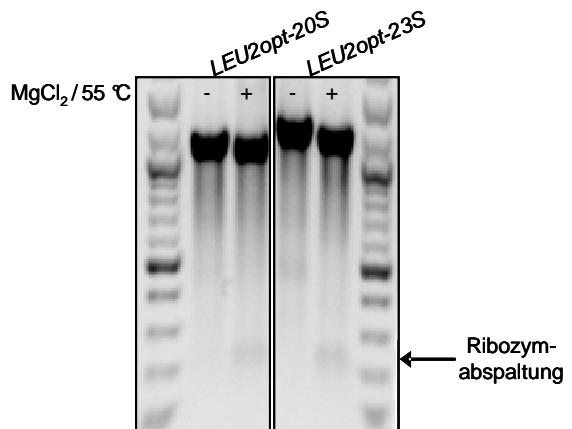


Abb. 21. Nachweis zur autokatalytischen Abspaltung der Ribozymsequenz nach *in vitro* Transkription und Induktion. *LEU2opt* flankiert mit 5' und 3' UTRs von 20S bzw. 23S und HDV Ribozym am 3' Ende wurde hinter den T7-Promotor kloniert. *LEU2opt-20S* und *LEU2opt-23S* wurden *in vitro* transkribiert. Die intramolekulare Abspaltung der Ribozymsequenz wurde *in vitro* durch Zugabe von MgCl₂ und Inkubation bei 55°C induziert (2.2.4.3).

Ein großer Vorteil des Hefevirus-Replikons ist die garantiertere Funktionalität der Replikase in ihrem natürlichen Wirt der Bäckerhefe. Durch die Herstellung von Reporterkonstrukten mit definierten Virusenden konnte folgendes erarbeitet werden:

- *LEU2opt* wurde als Testreporter mit definierten Virussequenzen flankiert
- nicht alle *LEU2opt*-Konstrukte vermittelten in Hefe Leucin-Prototrophie, obwohl mRNA vorhanden ist
- Virussequenz scheint erheblichen Einfluss auf Translationseffizienz zu nehmen, evtl. über Ausbildung von Sekundärstrukturen
- über Anfügen definierter Virussequenzen an die Enden des Testreporters *LEU2opt* konnte in Hefe kein Replikon etabliert werden
- Ansatz der *directed evolution* bietet Möglichkeit, ein *template* mit perfekten Enden zu generieren und selektieren

Fazit: Da über den genauen Mechanismus der Hefeviren-Replikation, der essentiellen Sequenzmotive der RNA *templates* und das Zusammenspiel mit dem Translationssystem bislang nur wenig Fakten vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit des Weiteren mit heterologen Virusreplikasen gearbeitet, über deren *template*-Eigenschaften bereits mehr Details zur Verfügung standen.

3.3.2 RNA-Replikasen P2 aus Phi6 und NS5B aus HCV

Die RNA-Replikasen P2 aus dem Bakteriophagen Phi6 und NS5B aus dem Hepatitis C Virus (HCV) sind in ihrem Replikationsmechanismus sehr ähnlich und recht gut erforscht (Butcher *et al.* 2001; van Dijk *et al.* 2004). Die ssRNA oder ssDNA *templates* benötigen für die Erkennung durch P2 lediglich

5'GGAAAAAA3'-Enden. Eine modifizierte P2-Version aufgereinigt aus *E. coli* (Finnzymes) wird für die Produktion von dsRNA angeboten. Durchgeführte *in vitro* Tests zeigten allerdings, dass ssRNA mit den spezifischen Enden zwar zum Doppelstrang aufgefüllt, aber nicht amplifiziert, sprich vermehrt wird. Dieses Kriterium ist jedoch die Voraussetzung für ein kontinuierliches Mutationssystem. Da dies bei der P2-Replikase selbst *in vitro* unter kontrollierten Reaktionsbedingungen nicht gegeben war, womöglich weil bislang unbekannte Kofaktoren zur Amplifikation nötig sind, wurde von der Etablierung eines Replikations-/Mutationssystems in *S. cerevisiae* basierend auf P2 bzw. ihrer verwandten Replikase NS5B abgesehen.

3.3.3 RNA-Replikase Q β aus dem *E. coli* Phagen Q β

Ein noch beliebteres Forschungsobjekt ist die Q β -Replikase aus dem *E. coli* Phagen Q β . Diese Replikase wurde vor rund 45 Jahren entdeckt (Haruna *et al.* 1965) und kam aufgrund seiner hohen Fehlerrate bereits in diversen *in vitro* Evolutionsexperimenten zum Einsatz, wie im Folgenden erläutert wird. Es war eine Herausforderung das System der Q β -Replikation auf die Ansprüche in *S. cerevisiae* anzupassen, um ein autonomes Replikations-/Mutationssystem zu generieren.

Der Enterobakteriophage Q β gehört zur Gruppe der einzelsträngigen (+)RNA-Viren. Diese besitzen ein lineares, einzelsträngiges RNA-Genom, dessen Orientierung der der mRNA entspricht. Das Q β -Genom umfasst 4215 bp; darauf sind vier Strukturproteine kodiert: *major coat protein*, *minor coat protein*, ein Protein zur Partikelreifung und eine Replikase (Beekwilder *et al.* 1995; 1996)

3.3.3.1 Aufbau, Funktion und Anwendung der Q β -Replikase

Q β benutzt wie alle (+)ssRNA-Viren die ssRNA direkt für die Translation der darauf kodierten Proteine, darunter auch die Replikase. Diese Replikase stellt über doppelsträngige Zwischenstufen RNA-Kopien her. Die gebildeten Plus- und Minus-Stränge liegen nicht als Duplex vor, sondern bleiben einzelsträngig (Weissmann *et al.* 1968) und bilden zur Stabilisierung eine *panhandle*-Struktur aus (Haruna *et al.* 1965). Die RNA-Replikation verläuft ohne DNA-Zwischenstadium.

Die Replikation des Q β -Genoms wird von einem Proteinkomplex durchgeführt, dessen Untereinheiten als alpha (74 kDa), beta (64 kDa), gamma (47 kDa) und delta (33 kDa) bezeichnet werden (Kondo 1975). Nur die β -Untereinheit, die RNA-Replikase, wird von dem Q β Phagen selbst kodiert. Die anderen drei Untereinheiten werden vom Wirt kodiert und sind dort an der Proteinbiosynthese beteiligt. Die α -Untereinheit ist identisch zu S1, einem 30 S ribosomalem Protein. Kondo schließt aus seinen Versuchen, dass S1 für die Synthese des Minus-RNA-Strangs aus dem Plusstrang benötigt wird. Andere *in vitro* Experimente zeigten, dass S1 nur für die Synthese des eigenen Q β -Genoms erforderlich ist (Blumenthal *et al.* 1980). Die Untereinheiten γ und δ sind identisch zu den Elongationsfaktoren EF-Tu bzw. EF-Ts. Diese beiden sind für die Initiation der RNA-Synthese nötig, nicht für die Elongation. Zusätzlich wurde noch ein weiterer Kofaktor entdeckt (de Fernandez *et al.* 1968): bei dem *host factor of Q β* (Hfq) handelt es sich um ein kleines Wirtsprotein (11 kDa), welches zu einem Hexamer multimerisiert. Der Hfq-Komplex bindet spezifisch an Q β -RNA im Verhältnis 1:1 und erlaubt ihre spezifische RNA-Replikation bei niedrigen GTP-Konzentrationen (de Fernandez *et al.* 1972; Blumenthal 1980).

In weiteren *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass beide Kofaktoren S1 und Hfq an Sequenzen der Q β -RNA nahe dem 3' Ende binden und für die Initiation der Q β -RNA Synthese benötigt werden (de Fernandez *et al.* 1972; Kamen *et al.* 1972; Senear *et al.* 1976). Somit wurde gefolgert, dass sowohl S1 als auch Hfq an der Erkennung des 3' Endes der Q β -RNA durch ihre eigene Replikase beteiligt sind. Neuere Untersuchungen untermauern diese Vermutungen weiter. So wurde gezeigt, dass S1 die Erkennung des Q β -Plusstranges durch die Q β -Replikase steuert, indem es mit zwei internen RNA-Abschnitten interagiert (Schuppli *et al.* 1997). Die Interaktion der Q β -Replikase mit dem 3' Ende, an dem die Minusstrangsynthese beginnt, wird durch Hfq gesteuert. Dabei wird die Replikation stimuliert, indem Hfq das 3' Ende des Q β -Plusstrangs aufschmilzt.

Nach Expression und Aufreinigung aus *E. coli*-Lysat (Blumenthal *et al.* 1979) konnte die Funktion der Q β -Replikase *in vitro* bereits eingehend studiert werden. Bei den kurzen RNA Sequenzen 6 S (Banerjee *et al.* 1969), *midivariant* MDV-1 (Kacian *et al.* 1972) und RQ135 (Munishkin *et al.* 1991) handelt es sich um kurze RNA-Sequenzen, die bevorzugt amplifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die RNA-Amplifikation *in vitro* isothermal (bei 37°C) und exponentiell verläuft, so dass aus einem Molekül des Q β -Genoms in weniger als einer Stunde 10⁴ Moleküle generiert werden und aus kurzen RNA-*templates* bis zu 10¹⁰ Kopien in 10 min entstehen (Chetverin *et al.* 1995). Sowohl Plus- als auch Minusstrang dienen als *template*, solange das Enzym in molarem Überschuss vorliegt (Haruna *et al.* 1965). Die Q β -Amplifikation findet Anwendung in der zellfreien Proteinsynthese durch Amplifikation von mRNA (Wu *et al.* 1992; Morozov *et al.* 1993; Chetverin *et al.* 1995). Des Weiteren wird die Q β -Replikase zur Detektion spezifischer Gene genutzt, indem Sonden-RNA amplifiziert wird und mit dem Zielgen hybridisiert (Lizardi *et al.* 1988; Shah *et al.* 1995; Tyagi *et al.* 1996). Aufgrund der hohen Mutationsrate (1 Mutation pro 700 bp) wird die Q β -Replikase eingesetzt, um *ex vivo* RNA-Bibliotheken herzustellen (Kopsidas *et al.* 2006, 2007). Diese Bibliotheken wurden mittels *ribosome display* durchmustert und auf diese Weise konnten für Antigene verbesserte Antikörper identifiziert werden. Die Mutagenese mittels Q β -Replikase wurde bislang nur im zellfreien System durchgeführt. In diesem Teil der Arbeit wurde die Etablierung eines Q β -Replikons in *S. cerevisiae* begonnen.

3.3.3.2 Prinzip des autonomen Q β -Replikons in *S. cerevisiae*

Basierend auf den zahlreichen Berichten der Q β -basierten *in vitro* Mutagenese, sollte das autonome Q β -Replikon in Hefe folgendermaßen ablaufen: eine Hefezelle wird mit AD-*prey* DNA transformiert, im Zellkern transkribiert und die mRNA ins Zytoplasma exportiert. Dort tritt die einzelsträngige mRNA in den autonomen Q β -Replikationszyklus ein. Der Q β -Enzymkomplex repliziert (+)RNA indem er den Minusstrang ((-)RNA) bildet, der wiederum als *template* zur Plusstrangsynthese dient. Da die Q β -Replikase keine *proof reading*-Aktivität besitzt, werden die RNA-Replikate z. T. fehlerhaft sein (rote Markierung, Abb. 22). Fehler häufen sich mit jedem Replikationszyklus an. Die daraus resultierenden (+)RNA-Moleküle werden gleichzeitig als *template* für die Translation benutzt. Es entstehenden AD-*prey* Proteinvarianten. Je besser die Protein-Protein-Interaktion zwischen *bait* und *prey*-Varianten, desto mehr Reporter (*HIS3*, *Aur1-C*) wird exprimiert und umso schneller kann die Hefezelle mit dem guten Interaktionspaar in Selektivmedium wachsen. Durch die kontinuierliche Q β -Replikation werden über mehrere Generationen hinweg *prey*-Varianten erzeugt, die sich an verschiedenen Positionen

zum ursprünglichen *prey* unterscheiden und letztendlich zum perfekten Binder evolviert werden, indem sich das beste Protein-Protein-Interaktionspaar durchsetzt.

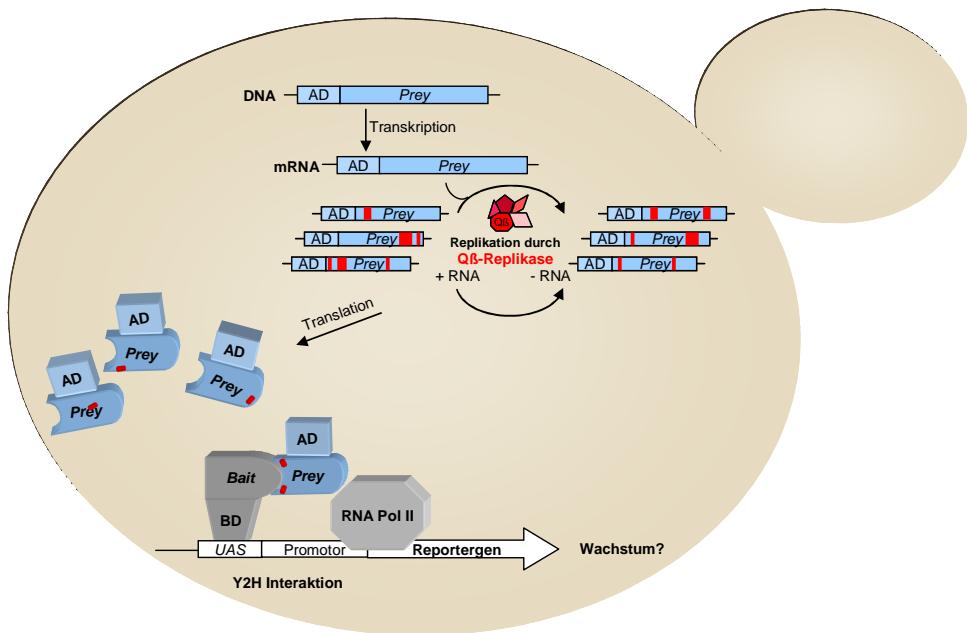


Abb. 22. Kontinuierliches, zielgerichtetes Evolutionssystem kombiniert aus Q β -Replikation und Y2H Selektion. Details siehe Text.

Somit galt es folgende Einzelschritte zu etablieren:

1. Design von *templates*, die die Q β -Replikase spezifisch erkennt und amplifiziert
2. Expression der funktionellen Q β -Replikase in Hefe
3. Etablierung eines autonomen RNA-Replikons *in vitro*
4. Etablierung eines autonomen RNA-Replikons *in vivo*

3.3.3.3 Amplifikation von Q β -*templates* im *in vitro* Test

Die erste Herausforderung zur Etablierung des Q β -Replikations-/Mutationssystems in Hefe war es ein *template* zu konstruieren, das von der Q β -Replikase spezifisch erkannt und repliziert wird. In der Hefezelle soll ausschließlich oder zumindest bevorzugt *prey*-RNA in einem komplexen Gemisch aus Hefe-mRNAs, rRNAs, tRNAs und zahlreichen anderen kleinen RNAs amplifiziert werden. Das Design Q β -spezifischer *templates* wurde unabhängig vom Y2H System an einem Testreporter optimiert. Erst wenn dieses vereinfachte System von Replikase und Testreporter-RNA gewährleistet war, sollte das Q β -Mutationssystem mit dem Y2H gekoppelt werden. *LEU2opt* (1,1 kb) wurde als Testreporter ausgewählt und dessen Enden entsprechend modifiziert, damit die *LEU2opt*-RNA durch die Q β -Replikase spezifisch amplifiziert wird.

Q β benötigt für die Amplifikation seines Genoms keinen Primer oder Promotor. Die Q β -Replikase erkennt den Q β -RNA-Strang spezifisch und repliziert ihn. Der genaue Mechanismus der Strangerkennung ist trotz intensiver Forschung seit den 60er Jahren nicht bis ins Detail geklärt. Die Q β -Replikase kann *in vitro* zwischen RNA-Sequenzen unterscheiden. Eine solche Differenzierung bei der Wahl der *template*-RNA ist sicher notwendig, um im Wirtsbakterium sicherzustellen, dass

bevorzugt das eigene Q β -Genom amplifiziert wird, um die eigene Existenz zu sichern. Wodurch die Unterschiede in der *template*-Wahl zustande kommen bzw. welche Eigenschaften oder Sequenzmerkmale eine RNA haben muss, um von der Q β -Replikase repliziert zu werden, ist nach wie vor unbekannt. Allen *templates* gemeinsam sind lediglich die 5'GGG und 3'CCC Enden, die auch das Q β -Genom selber flankieren. Somit scheint dieses Motiv zwar essentiell (Ugarov *et al.* 2003), aber nicht unbedingt ausreichend für die spezifische Strangerkennung zu sein.

Tab. 46. Amplifikationseffizienz von *LEU2opt* mit verschiedenen Enden im *in vitro* Test

Q β - <i>template</i>	5'Erk.seq.	3'Erk.seq.	Referenz der Enden	<i>LEU2opt</i> -Amplifikation
T1	GGG	CCC	Q β -Genom	+++
T2	GGG	CCCA	Tretheway <i>et al.</i> (2001)	++
T3	GGG	GAGTTGAGGGCTCTGCTTGCCCTCACTCC	Schuppli <i>et al.</i> (1997)	+
T4	GGG-RQ135/left	RQ135/right-CCC	Morozov <i>et al.</i> (1993)	+++
<i>LEU2opt</i>	--	--	--	+

In der Literatur findet man verschiedenste *in vitro* getestete kleine RNAs, die von der Q β -Replikase aus *E. coli* bevorzugt amplifiziert werden. Zudem sind Sequenzen des Q β -Genoms bekannt, an denen Kofaktoren binden und die Replikation hervorrufen. Daher wurde der Testreporter *LEU2opt* mit verschiedenen Enden flankiert (Tab. 46). Es wurden kurze Enden ausgewählt: 5'GGG/CCC3' (Q β -Genom) bzw. 5'GGG/CCCA3' (Tretheway *et al.* 2001). Zudem wurde eine 35 bp lange Sequenz des 3' Endes des Q β -Genoms ausgewählt, da festgestellt wurde, dass Hfq in diesem Bereich bindet und für die Aufschmelzung der RNA sorgt (Schuppli *et al.* 1997). Zudem erwies sich RQ135 als gutes Q β -*template*, was möglicherweise an der starken Sekundärstruktur liegt, die sie zusätzlich zu den 5'GGG/CCC3'-Enden aufweist (Abb. 23). Diese 135 bp lange Sequenz ging aus einer *in vitro* Q β -Reaktion ohne zugesetztes *template* hervor (Munishkin *et al.* 1991). Nach Flankierung von Ziel-RNA mit RQ135-Hälften (links: 53 bp und rechts: 80 bp) konnte eine Ziel-RNA effizient amplifiziert werden (Morozov *et al.* 1993; Kopsidas *et al.* 2007). Analog dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit der Testreporter *LEU2opt* mit den beiden RQ135-Hälften flankiert.

Der ORF von *LEU2opt* (1,1 kb) wurde mit diesen vier ausgewählten Q β -Enden flankiert (Tab. 46). Die Enden sollten der Q β -Replikase als Erkennungssequenz dienen und die dazwischen liegende Sequenz möglichst gut amplifizieren.

Bevor das Replikationssystem in Hefe etabliert wurde, wurden die verschiedenen Q β -*templates* in einem *in vitro* Test bezüglich ihrer Amplifikationseffizienz verglichen. *In vitro* können im Gegensatz zum komplexen Hefeorganismus die Amplifikationsbedingungen optimal eingestellt werden. Der Q β -Replikasekomplex kann, aus *E. coli* aufgereinigt, kommerziell erworben werden (Epicentre). Diese wird im Folgenden als Q β -*E. coli* bezeichnet. Der Q β -*E. coli* Enzymkomplex enthält zu gleichen Teilen EF-Tu, EF-Ts, Q β und S1. Der Hfq-Kofaktor ist darin (laut Hersteller sowie eigener *Western Blot*-Analysen) nicht enthalten. In Q β *in vitro* Tests wurde ssRNA eingesetzt (2.2.4.4), die durch T7-basierte Transkription hergestellt wurde (2.2.4.1). Dazu wurde lineare Q β -*template*-DNA verwendet, die einen T7-Promotor besitzt und mit genau der letzten Base der entsprechenden Erkennungssequenz endete, um ein definiertes 3' Ende zu garantieren, an dem die Replikase mit der Amplifikation beginnen kann.

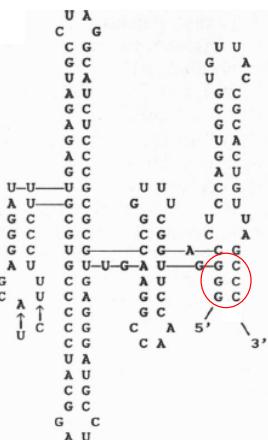


Abb. 23. Sekundärstruktur der RQ135-Sequenz. Die einzelsträngige RNA bildet intramolekulare Basenpaarungen aus, so dass eine stabile Sekundärstruktur entsteht. Die rote Markierung verweist auf die 5'GGG/CCC3' Enden, die allen Q β -templates gemeinsam ist. Nach (Munishkin *et al.* 1991)

Die *in vitro* Testansätze wurden bei 30°C (Temperaturoptimum von Hefe) 1 h lang inkubiert und im Anschluss im Agarosegel aufgetrennt (2.2.4.4). Die eingesetzte ssRNA lief im Vergleich zum dsDNA-Standard bei ca. 700 bp. Durch Q β -*E. coli* wurden die einzelsträngigen *templates* mit Q β -Erkennungssequenzen zum Doppelstrang aufgefüllt (T1 bis T4, Abb. 24), so dass diese Q β -Produkte auf einer Höhe von 1,1 kb (T1 bis T3) bzw. 1,2 kb (T4) erschienen. In geringem Maße wurde *LEU2opt* ohne Erkennungssequenz von Q β -*E. coli* erkannt und zum Doppelstrang aufgefüllt. Aus der beobachteten Amplifikationseffizienz lässt sich schließen, dass die einfachen Q β -Enden (T1, T2) von Q β -*E. coli* sehr gut erkannt werden. Das längere 3' Ende des Q β -Genoms (T3) hatte keinen positiven Effekt auf die Q β -Aktivität; die Herstellung von Doppelsträngen fand noch ineffizienter statt als bei der Kontrolle *LEU2opt* ohne Erkennungssequenz.

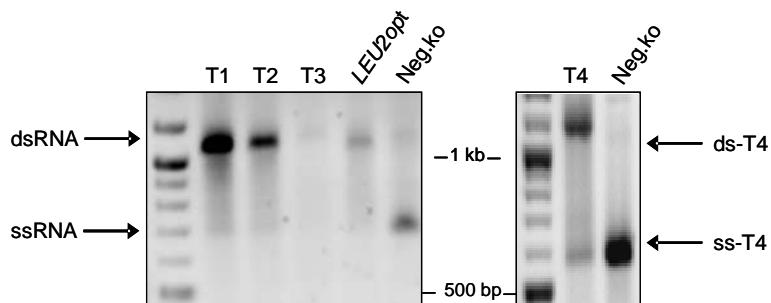


Abb. 24. Amplifikationseffizienz von *LEU2opt*-RNA mit verschiedenen Enden durch Q β -*E. coli*. ssRNA wurde mit Q β -*E. coli* 1 h bei 30°C inkubiert (2.2.4.4). Pro Spur wurden 5 μ l aufgetragen und im 0,8% Agarosegel aufgetrennt. T1 bis T4: *LEU2opt* flankiert mit versch. Q β -Enden (Tab. 46) Eingesetzte ssRNA läuft auf der Höhe von 700 bp. Das dsRNA-Produkt der Q β -Amplifikation läuft auf der Höhe von 1,1 kb (T1 bis T3) bzw. 1,2 kb (T4) im Vergleich zum dsDNA-Standard. Neg.ko = Negativkontrolle ohne Q β -*E. coli*.

Der Amplifikationsvergleich zwischen den *templates* T1 bis T4 wurde dreimal wiederholt. Die relativen Amplifikationseffizienzen sind in Tab. 46 zusammengetragen. T1 (GGG-*LEU2opt*-CCC) ist ein sehr gutes *template* für die Q β -Replikase und T4 (*LEU2opt*-RQ135) wird etwas schlechter amplifiziert, was möglicherweise auf den Größenunterschied von 100 Nukleotiden zurückzuführen ist. Da die Amplifikation in Hefe etabliert werden sollte, musste sichergestellt sein, dass die einzelsträngige

Reporter-RNA möglichst stabil ist, also vor Nukleaseabbau geschützt und dadurch lange für die Translation zur Verfügung steht. Für die weiteren Versuche wurden deswegen die LEU2opt-templates T1 und T4 (RQ135 mit kleeblattartiger Sekundärstruktur) benutzt.

Die zweite Herausforderung zur Etablierung eines Q β -Replikons bestehend aus *template* und RNA-Replikase war es, die Komponenten des Q β -Replikasekomplexes in Hefe funktionell zu exprimieren. Dies wird im Folgenden beschrieben.

3.3.3.4 Expression des Q β -Replikasekomplexes in *S. cerevisiae*

Das autonome Q β -Replikationssystem ist in *E. coli* relativ einfach, da es lediglich aus Replikase und RNA besteht; die benötigten Kofaktoren werden vom Wirt zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Q β -Replikon *de novo* in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* etabliert werden. Dazu musste die Q β -Untereinheit inklusive aller *E. coli* Kofaktoren in Hefe exprimiert werden.

Aus den *in vitro* Studien war insgesamt bekannt, dass EF-Tu, EF-Ts sowie die Q β -Einheit für die Amplifikation von RNA zwingend erforderlich sind. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass aus einer Fusion von EF-Ts – EF-Tu – Q β ein funktioneller Replikasekomplex gebildet wird (Kita *et al.* 2006). Die Fusion der drei Komponenten wurde für diese Arbeit auf die Expression in *S. cerevisiae* und deren Proteinnachweis angepasst. Der gesamte Genabschnitt EF-Ts – EF-Tu – Linker – Q β -flag wurde auf die *codon usage* von *S. cerevisiae* angepasst. Weil sich in der Klonierung massive Probleme ergaben, wurde ein Teil der DNA-Sequenz im Bereich des Linkers nachträglich wieder in die ursprünglich publiziert wt-Sequenz geändert (8.2.2). Wie in Abb. 25A dargestellt, wurde diese Genfusion für die Expression in Hefe zwischen den starken *TEF1*-Promotor und den *CYC1*-Terminator kloniert. Diese Expressionskassette wurde in den integrativen Vektor pRS306N kloniert. Damit konnte das Fusionskonstrukt über den *URA3* Lokus in das Genom von AH109 integriert werden und Integranden mittel Nourseothricin-Resistenz selektiert werden (2.2.2.9). Durch die genomische Integration der Q β -Fusion in den *URA3* Lokus von AH109 wurde ein Hefestamm erzeugt, in dem Ts-Tu-Q β konstitutiv exprimiert werden (AH109-Q β).

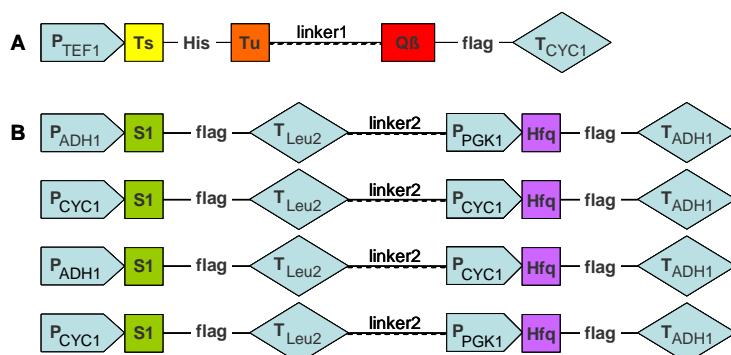


Abb. 25. Schematische Darstellung der Expressionskassetten des Q β -Replikasekomplexes bestehend aus Promotor, Gen (flag-markiert) und Terminator. P = Promotor; T = Terminator. A. Fusionskonstrukt bestehend aus EF-Ts, EF-Tu und Q β -Untereinheit. His = Histidin-Codon. P_{TEF1} sorgt für starke Genexpression. **B.** Alternative Konstrukte zur Expression von S1 und Hfq. Sie unterscheiden sich in ihrer Promotoren und damit in der Menge an produziertem Protein. P_{ADH1} und P_{PGK1} sorgen für starke Expression der Gene, P_{CYC1} dagegen führt zu schwacher Expression der Gene.

Aufgrund der Literaturangaben war es fraglich, ob die beiden Kofaktoren S1 und Hfq tatsächlich nötig sein würden, um im komplexen Hefeorganismus eine spezifische Amplifikation eines *templates* stattfinden zu lassen. S1 und Hfq binden an das 3' Ende der Q β -RNA und werden für die Amplifikation der Q β eigenen RNA benötigt, allerdings nicht zwingend für andere kleinere RNAs (Wu *et al.* 1992; Morozov *et al.* 1993; Chetverin *et al.* 1995). Die Idee für die Konstruktion eines Q β -*templates* war, einen Reporter mit Sequenz des Q β -Genoms zu flankieren, um gerichtet diese spezifische RNA zu amplifizieren. Für die spezifische Strangerkennung in Hefe sollten S1 und Hfq zumindest nicht von Nachteil sein, so dass auch die Gene dieser beiden Kofaktoren auf die *codon usage* von *S. cerevisiae* optimiert wurden. Zur Expression von S1 und Hfq in Hefe wurden je vier Expressionskassetten generiert (Abb. 25B), die sich in den Promotoren und damit der Expressionsstärke unterschieden (Tab. 47).

Tab. 47. Korrelation zwischen Hfq-Expressionsstärke und Hefewachstum

S1		Hfq		Hefe-wachstum
Promotor	Expression	Promotor	Expression	
<i>ADH1</i>	stark	<i>PGK1</i>	stark	schlecht
<i>CYC1</i>	schwach	<i>CYC1</i>	schwach	gut
<i>ADH1</i>	stark	<i>CYC1</i>	schwach	gut
<i>CYC1</i>	schwach	<i>PGK1</i>	stark	schlecht

Über einen DNA-Linker verbunden wurden die vier verschiedenen S1- und Hfq-Expressionskassetten zusammen auf jeweils einen Vektor kloniert. Um die Expression beider Gene zu überprüfen, wurden sie zunächst auf das *CEN/ARS*-Plasmid YCplac111 kloniert und AH109 damit transient transformiert. Zwischen den vier Transformationsstämmen waren Wachstumsunterschiede erkennbar, die mit der Stärke des Promotors zur Expression von Hfq korrelierten (Tab. 47). Beide Hefestämme mit PGKp-Hfq wuchsen sehr langsam, so dass die erhöhte Menge an Hfq in der Hefezelle einen negativen Einfluss auf das Wachstum zu haben schien.

Pro Transformationsstamm wurden je zwei Klone ausgewählt und im *Western Blot* mittels flag-tag Nachweis analysiert (2.2.5.3). Sowohl S1 als auch Hfq konnten detektiert werden, wobei die Expressionsstärke mit dem verwendeten Promotor korrelierte (Abb. 26).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die S1/Hfq-Konstrukte auf *CEN/ARS*-Plasmiden in Hefe exprimiert werden, wurden die Expressionskassetten in das Hefegenom integriert. Dies war nötig, damit das Q β -Mutationssystem mit dem Y2H System gekoppelt werden konnte, für welches zwei weitere Plasmide nötig sind. Jedoch stehen in den Y2H Stämmen nur drei Selektionsmarker (*TRP1*, *LEU2*, *HIS3*) zur Verfügung. Die ersten beiden wurden zur Selektion der Y2H Plasmide benötigt; der dritte diente als Reporter für die Y2H Interaktion. Somit musste die Q β -Replikase inklusive ihrer Kofaktoren ins Hefegenom integriert werden.

Wegen der Wachstumsbeeinträchtigung durch PGKp-Hfq wurden für die Integration lediglich die beiden Expressionskassetten mit den schwachen *CYC1*-Promotoren verwendet: CYCp-S1–CYCp-Hfq und ADH β -S1–CYCp-Hfq. Da nicht bekannt war, in welchem Verhältnis S1 zu den anderen Faktoren des Replikasekomplexes vorliegen muss, wurden beide Konstrukte mit starkem *ADH1*- und schwachem *CYC1*-Promotor verwendet.

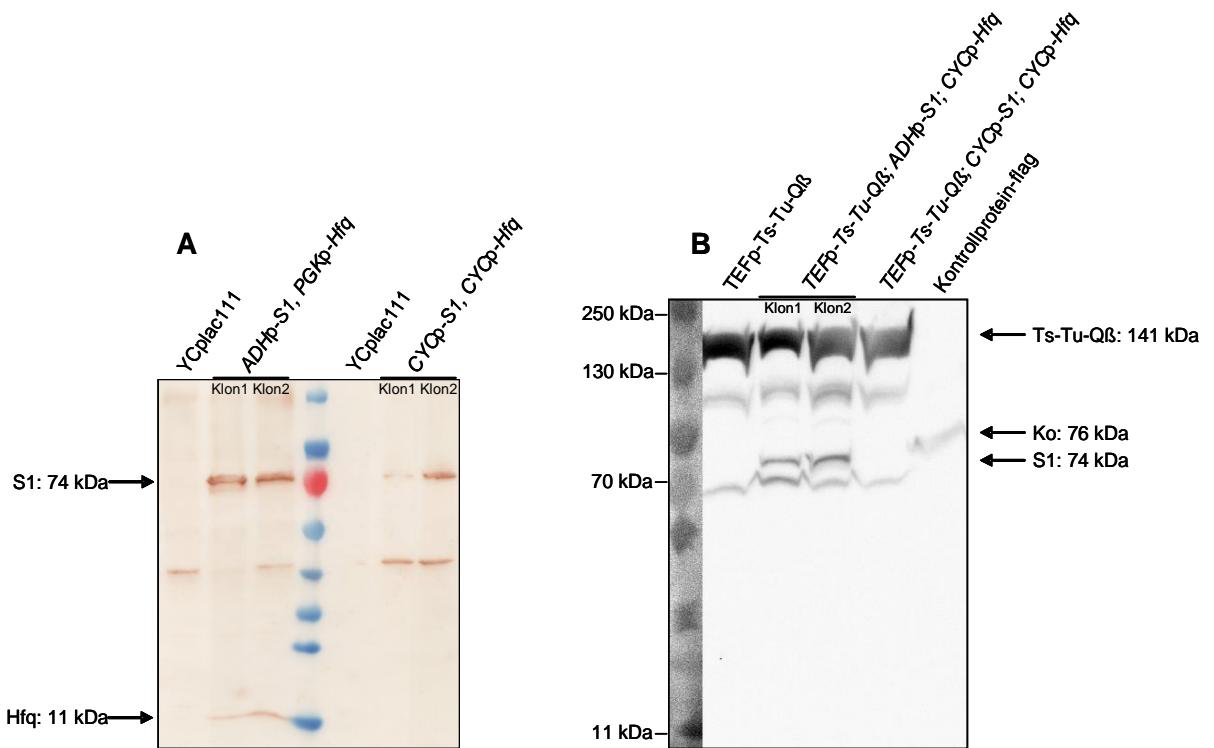


Abb. 26. Expressionsnachweis der Replikasekomponenten (Tu, Ts, Q β , S1, Hfq) im Western Blot. Pro Spur wurde Hefelysat von 4×10^7 Zellen aufgetragen und im 4-20% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.7, 2.2.5.1, 2.2.5.3). Proteinnachweis mittels anti-flag Antikörper (1:500, 2.2.5.3). **A.** Kofaktoren S1 und Hfq auf YCplac111-CEN-Plasmid. Linke Seite: S1 und Hfq werden von starken Promotor *ADH1* bzw. *PGK1* exprimiert. Rechte Seite: S1 und Hfq werden von dem schwachen *CYC1*-Promotor exprimiert. Die Proteingrößen entsprechen den Erwartungen. Detektion mittels DAB-Färbung. **B.** Integrierte Kofaktoren Tu-Ts-Q β , S1 und Hfq. Q β -Fusion wird durch starken *TEF1*-Promotor exprimiert und erscheint als prominente Bande. Proteinmenge von S1 und Hfq nach Expression durch schwachen *CYC1*-Promotor liegt unter der Nachweisgrenze. Chemilumineszenz-Nachweis; Exp. 1 min.

Die S1/Hfq-Expressionskassetten wurden in den integrativen Hefevektor pRS305K kloniert. Damit wurden die Kofaktoren über den *LEU2* Lokus in das Genom von AH109 und AH109-Q β (s. o.) integriert und Integranden mittels KanMX-Resistenz selektiert (2.2.2.9). Insgesamt wurden drei verschiedene Q β -Hefestämme generiert, in denen Komponenten des Q β -Replikationssystems konstitutiv exprimiert werden: AH109-Q β , AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq und AH109-Q β /CYCp-S1/CYCp-Hfq. Je zwei Integranden wurden im *Western Blot* auf die Expression der flag-markierten Proteine analysiert (2.2.5.7, 2.2.5.1, 2.2.5.3). Das Fusionsprodukt Ts-Tu-Q β war auf der entwickelten Nitrocellulosemembran als dominante Bande auf der erwarteten Höhe von 141 kDa deutlich erkennbar (Spuren 1-4, Abb. 26B). Zwei Abbruchfragmente auf der Höhe von 100 und 70 kDa wurden zusätzlich detektiert. S1 konnte bei starker Expression (Spur 2 und 3, Abb. 26B) auf der erwarteten Höhe von 74 kDa detektiert werden. Bei Expression durch den schwachen *CYC1*-Promotor fiel die Proteinmenge sowohl von S1 (Spur 4, Abb. 26B) als auch von Hfq (Spuren 2 bis 4, Abb. 26B) unter die Nachweisgrenze. Da die S1/Hfq-Expression auf den CEN/ARS-Plasmiden eindeutig gezeigt werden konnte (Abb. 26A), ist anzunehmen, dass aufgrund der verminderten Kopienzahl (eine Kopie im haploiden Hefegenom statt 2 - 3 durch CEN/ARS-Plasmid) die Proteine im *Western Blot* nicht nachgewiesen werden konnten, aber dennoch exprimiert wurden.

Die drei Q β -Stämme AH109-Q β , AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq und AH109-Q β /CYCp-S1/CYCp-Hfq wurden im Weiteren für die Etablierung eines Q β -Replikons genutzt.

Um ein Q β -Replikon in Hefe aufzubauen sind zwei Komponenten nötig. Zum einen ein geeignetes *template*, das von der Q β -Replikase erkannt und spezifisch amplifiziert wird und zum anderen eine funktionelle Replikase. Durch *in vitro* Tests mit Q β -*E. coli* wurden T1 und T4 als geeignete Q β -*templates* identifiziert (3.3.3.6). Des Weiteren wurden die Komponenten des Q β -Replikasekomplexes in Hefe erfolgreich exprimiert. Für die Etablierung eines Q β -Replikons standen sowohl Enzym als auch *templates* zur Verfügung. Somit konnten die Aktivitäten der drei in Hefe exprimierten Q β -Replikasen (Q β -Hefe) *in vitro* unter definierten Bedingungen getestet werden.

3.3.3.5 Heterolog exprimierter Q β -Komplex ist *in vitro* aktiv

Die Expression der einzelnen Q β -Komponenten in Hefe konnte erfolgreich nachgewiesen werden (3.3.3.4). Da sich der heterolog exprimierte Enzymkomplex nicht in seiner natürlichen Umgebung (*E. coli*), sondern in einem neuen Wirt – der Hefe – befand, wurde *in vitro* überprüft, ob er aktiv ist.

Zunächst wurde Hefelysat aus Q β -exprimierenden Hefestämmen hergestellt (2.2.5.8). Dieses Q β -haltige Hefelysat wurde in verschiedenen Mengen in einen Q β *in vitro* Test (2.2.4.4) anstelle der gekauften Q β -*E. coli* eingesetzt. In Hefelysat ist sehr viel ribosomale RNA enthalten, die im Agarosegel mit zwei prominenten Banden bei 900 bp und 1,4 kb im Vergleich zum dsDNA-Standard sichtbar wurde. Aufgrund des starken rRNA-Hintergrunds im Agarosegel war nicht zu erkennen, ob die Q β -spezifischen *templates* repliziert wurden. Denn sowohl die einzel- als auch die doppelsträngigen *LEU2opt*-RNAs laufen im Agarosegel auf Höhe der ribosomalen Hefe-RNAs. Deshalb wurde eine neue Methode zum Nachweis der Aktivität etabliert.

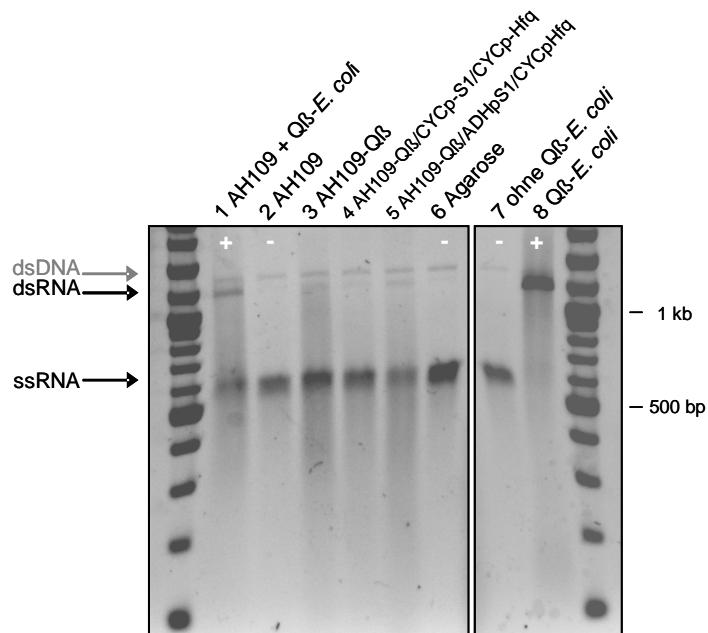
Da die Enzymkomponenten Ts-Tu-Q β , S1 und Hfq jeweils mit einem C-terminalen flag-tag exprimiert wurden und der Expressionsnachweis im *Western Blot* mit anti-flag Antikörper positiv war (3.3.3.4), konnte der flag-tag zur Anreicherung der flag-markierten Komponenten unter nativen Bedingungen aus dem Hefelysat genutzt werden (2.2.5.9). Von Q β -exprimierenden Hefestämmen wurde Hefelysat hergestellt und mit anti-flag Agarose inkubiert. Die flag-markierten Proteine wurden an anti-flag Antikörper gebunden, die wiederum an Agarose gekoppelt waren. Die Agarose konnte durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand abgezogen werden. Das gewaschene Agarosematerial mit den daran gebundenen flag-Proteinen wurde direkt in den Q β *in vitro* Test anstelle von Q β -*E. coli* eingesetzt (2.2.4.4). Zu beachten ist, dass von den angereicherten Q β -Komplexen die Proteinmenge nicht bestimmt wurde, so dass in diesem Test die Aktivitäten von Q β -Hefe und Q β -*E. coli* nicht identisch sind.

Das ssRNA-*template* T4 wurde in einen *in vitro* Aktivitätstest eingesetzt, dessen Ansätze inklusive Kontrollen in Tab. 48 aufgeführt sind. Nach 1 h Inkubation bei 30°C wurden die Reaktionen auf einem Agarosegel analysiert (2.2.4.4).

Tab. 48. Ansätze der *in vitro* Aktivitätstests mit angereicherter Q β -Replikase aus Hefe im Vergleich zur Aktivität der Q β -Replikase aus *E. coli* (Epicentre)

Ansatz	Agarose	Lysat aus Hefestamm	Kontrolle
1 AH109+Q β - <i>E. coli</i>	ja	AH109	Positiv-
2 AH109	ja	AH109	Negativ-
3 AH109-Q β	ja	AH109-Q β	
4 AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq	ja	AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq	
5 AH109-Q β /CYCp-S1/CYCp-Hfq	ja	AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq	
6 Agarose	ja	--	Negativ-
7 ohne Q β - <i>E. coli</i>	nein	--	Negativ-
8 Q β - <i>E. coli</i>	nein	--	Positiv-

Es zeigte sich, dass das eingesetzte einzelsträngige LEU2optRQ135-*template* (= T4) in den Ansätzen mit Q β -Hefe repliziert wurde, so dass dsRNA gebildet wurde (Ansatz 3, 4 und 5; Abb. 27). Bemerkenswert war, dass die Replikation auch ohne die Kofaktoren S1 und Hfq (Ansatz 3, Abb. 27) stattgefunden hatte. Die Reaktionen liefen insgesamt nicht vollständig ab, auch nicht bei der Kontrolle mit AH109-Agarose mit Q β -*E. coli* (Ansatz 1, Abb. 27), im Gegensatz zur Kontrolle mit Q β -*E. coli* ohne Agarosebeads (Ansatz 8, Abb. 27). Somit war festzustellen, dass die Agarosebeads (oder daran gebundene Komponenten des Hefelysats) die *in vitro* Reaktion in ihrem Ablauf tendenziell negativ beeinträchtigen. Aus diesem ersten Versuch ließ sich erkennen, dass die in Hefe exprimierte Q β -Replikase *in vitro* aktiv ist, auch ohne die beiden Kofaktoren S1 und Hfq. Die fünf verschiedenen Komponenten des Q β -Replikasekomplexes wurden demnach korrekt exprimiert und konnten sich in Hefe zu einem funktionellen Komplex zusammenfinden.

**Abb. 27.** *In vitro* Aktivitätsnachweis des Q β -Replikasekomplexes nach Anreicherung aus Hefelysat. ssRNA LEU2optRQ135 wurde mit Q β -gebundenen Agarosebeads 1 h inkubiert (2.2.4.4). 5 μ l des Gesamtansatzes wurden auf einem 0,8% Agarosegel analysiert. Ohne DNase-Verdau, daher dsDNA (= *template* für *in vitro* Transkription) sichtbar. Links: Anreicherung der flag-Proteine der in Hefe exprimierten Q β -Faktoren über Agarosebeads. Rechts: Kontrollen ohne Agarosebeads.

Der *in vitro* Aktivitätstest wurde des Weiteren mit dem *template* LEU2opt ohne Q β -spezifischen Enden durchgeführt. Hier war wie erwartet keine Replikation der ssRNA erkennbar (ohne Abbildung). Überraschend war hingegen, dass bei der Durchführung mit T1 (GGG-LEU2opt-CCC) auch keine

Replikation stattfand (ohne Abbildung). T1 wurde scheinbar durch Q β -Hefe weniger effizient erkannt bzw. zum Doppelstrang aufgefüllt als durch Q β -*E. coli*.

Da die Reaktionen von Q β -Hefe nicht vollständig abgelaufen sind – erkennbar an der noch vorhandenen ssRNA auf Höhe von 700 bp – wurden die Ansätze länger als 1 h inkubiert und die Q β -Replikation im zeitlichen Verlauf beobachtet. Dafür wurde der Q β *in vitro* Test mit LEU2optRQ135 als *template* angesetzt, da es sich am besten amplifizieren ließ. Lysat aus den beiden Hefestämmen die S1 und *Hfq* exprimierten (AH109-Q β /ADH β -S1/CYCp-Hfq, AH109-Q β /CYCp-S1/CYCp-Hfq) und Lysat aus AH109 (Negativkontrolle) wurde verwendet. Zu vier Zeitpunkten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h) wurden Proben entnommen und im Agarosegel analysiert (Abb. 28). Wie erwartet blieb in dem Negativkontrollansatz mit AH109-Lysat die ssRNA (700 bp) über die komplette Reaktionszeit unverändert erhalten. Durch Q β -Hefe wurde bereits nach 30 min die eingesetzte ssRNA zu dsRNA (1,2 kb) repliziert. Die replizierte dsRNA vermehrte sich jedoch nicht mit Dauer der Reaktion, sondern ab einer Reaktionszeit von 2 h wurden unspezifische kleinere RNAs bevorzugt amplifiziert, die bezogen auf die Größe des dsDNA Standards zwischen 100 und 600 bp groß waren. Dabei schien die Amplifikation mit Hefelysat aus AH109-Q β /CYCp-S1/CYCp-Hfq weniger effektiv zu sein. Die Expression von S1 mit dem starken *ADH1*-Promotor schien sich demnach positiv auf die Q β -Aktivität auszuwirken.

Der Effekt der bevorzugten Amplifikation von kleinen RNAs war auch in den Kontrollansätzen mit Q β -*E. coli* zu beobachten (ganz rechts, Abb. 28). Aus Experimenten ohne exogen zugesetzte *templates* wurden durch Q β -Hefe analog zu Ansätzen mit Q β -*E. coli* kurze RNAs (100 – 250 Nukleotide) gebildet. Wie in der Literatur beschrieben, neigt die Q β -Replikase dazu, große *templates* während der Replikation zu verkürzen (Mills *et al.* 1967; Kacian *et al.* 1972; Munishkin *et al.* 1991) bzw. *de novo* (Sumper *et al.* 1975) schnell amplifizierbare Sequenzen zu generieren. Aufgrund der *in vitro* Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass auch die heterolog in Hefe exprimierte Q β -Replikase diese Eigenschaft aufweist (4.1.2).

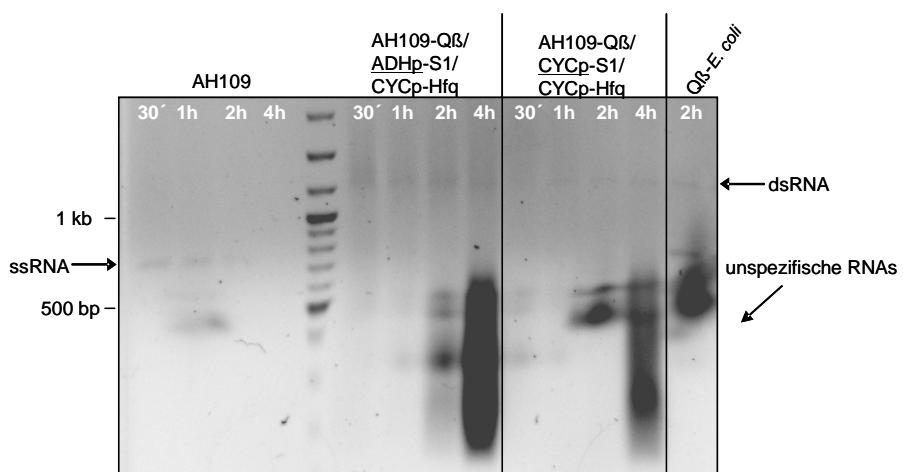


Abb. 28. Zeitlicher Verlauf der *in vitro* Amplifikation mit Q β -Hefe. ssRNA LEU2optRQ135 wurde mit Q β -gebundener Agarose bis zu 4 h inkubiert (2.2.4.4). je 5 μ l des Gesamtansatzes wurden auf einem 0,8% Agarosegel analysiert. Negativkontrolle AH109: wt-Hefestamm ohne Q β -Proteine; Positivkontrolle Q β -*E. coli*. In den Ansätzen mit Q β -Hefe bzw. Q β -*E. coli* (rechts vom Standard) entsteht in Abhängigkeit der Zeit dsRNA und große Menge an kleinen, unspezifischen RNAs der Größe 100 bis 600 bp (im Vergleich zum dsDNA-Standard).

Die evolvierten RNA-Fragmente aus *in vitro* Tests mit Q β -Hefe wurden in cDNA umgeschrieben. 10 - 200 bp großen cDNA Stücke wurden kloniert und sequenziert (2.2.4.5, 2.2.3.9). Durch Sequenzvergleich im Nukleotidblast ergab sich, dass es sich dabei v. a. um kurze Bereiche von ribosomaler RNA aus Hefe handelte (18S, 25S). Unter 132 lesbaren Sequenzen waren vier kurze Sequenzen (15 – 26 bp), denen keine bekannte Sequenz zugewiesen werden konnte. Ihr Potential als Q β -spezifische Erkennungssequenzen wurde *in vitro* im Vergleich zu LEU2opt-RQ135 getestet. Es stellte sich heraus, dass die neu identifizierten kurzen RNA-Fragmente sich nicht besser für die Amplifikation von *LEU2opt* eigneten. Für die Etablierung des Q β -Replikons *in vivo* wurde demnach die RQ135-Sequenz beibehalten.

3.3.3.6 Anpassen der Q β -*templates* an Gegebenheiten in der Hefezelle

Die Etablierung eines autonomen Q β -Replikons im komplexen Hefeorganismus war eine Herausforderung. Da die Q β -Replikase nur ssRNA als *template* verwenden kann, muss in der Hefezelle ssRNA mit entsprechender Q β -Erkennungssequenz vorhanden sein. Dieses ssRNA *template* muss entweder in die Hefezelle eingebracht oder in ihr selbst generiert werden. Des Weiteren muss das Q β -*template* in einem Gemisch aus diversen Hefe-RNAs und -DNAs von dem funktionsfähigen Q β -Komplex gebunden und in hohem Maße amplifiziert werden. Die resultierende (mutierte) RNA muss danach translatierbar sein. Für die Etablierung des Systems *in vivo* wurde weiterhin *LEU2opt* als Testreporter genutzt. Nur diejenigen Hefen sollten auf Leucin-Mangelmedium wachsen können, in denen funktionelles Leu2-Protein gebildet wird. Wenn einer dieser Einzelschritte von *template*-Erkennung, Amplifikation oder Translation nicht funktioniert, wachsen keine Hefeklone auf Leucin-Mangelmedium.

In Anlehnung an die Q β *in vitro* Tests wurden Hefen entweder direkt mit T7-transkribierter *LEU2opt*-RQ135 RNA elektroporiert (2.2.2.4) oder aber mit einem Hefepromotor-DNA-Konstrukt transformiert, welches in der Hefe zu mRNA transkribiert wird und dann als Q β -*template* fungieren kann. Bei der Verwendung eines DNA-Reporterkonstruktus war es wichtig, dass dieses nicht in Form von DNA an die Tochterzelle weitergegeben werden kann, sondern lediglich als funktionelles RNA-Replikon. Um dies zu gewährleisten, wurden nur DNA-Reporterkonstrukte verwendet, die über keinen Hefe-*ori* verfügen, welcher für eine Replikation von transakter DNA in der Hefezelle zwingend erforderlich ist. Die DNA-Konstrukte wurden sowohl linear als auch zum Schutz vor Nukleaseabbau zirkulär in die Hefen eingebracht. Der Aufbau der getesteten Reporterkonstrukte ist in Tab. 49 zusammengestellt.

Tab. 49. Q β -*templates*, die zur Etablierung des Replikons *in vivo* getestet wurden

Art des <i>templates</i>	Prom.	5'Erk.seq.	IRES nach Zhou et al. (2001)	Reporter	PolyA	3'Erk.seq.	Ribozym	Term.
ssRNA	-	RQ135l	-	LEU2opt	-	RQ135r	-	-
DNA	ADH ρ	RQ135l	-	LEU2opt	-	RQ135r	-	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	-	LEU2opt	-	RQ135r	-	-
DNA	ADH ρ	RQ135l	YAP1 (1 - 164)	LEU2opt	-	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (1 - 508)	LEU2opt	-	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (160 - 508)	LEU2opt	-	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (250 - 390)	LEU2opt	-	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	YAP1 (1 - 164)	LEU2opt	PolyA	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (1 - 508)	LEU2opt	PolyA	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (160 - 508)	LEU2opt	PolyA	RQ135r	Ribozym	LEUt
DNA	ADH ρ	RQ135l	p150 (250 - 390)	LEU2opt	PolyA	RQ135r	Ribozym	LEUt

Eukaryontische mRNAs werden für gewöhnlich posttranskriptional modifiziert, indem sie am 5' Ende ein Cap erhalten und am 3' Ende polyadenyliert werden (bei Hefen bis zu 150 Adenine) (Wormington 1993). Zwar kann die Translation von nicht modifizierten RNAs stattfinden, jedoch ist ihre Effizienz bis zu 1.000-fach verringert (Russell *et al.* 1991; Everett *et al.* 1992). Aus diesem Grund wurden die Q β -*templates* zur Steigerung der Translationseffizienz entsprechend angepasst. Alternativ für das 5' Cap gibt es Hefe-eigene IRES (*internal ribosomal entry sites*)-Sequenzen, die als Signal für den Translationsstart Hefe-fremder Gene genutzt wurden (Zhou *et al.* 2001; Thompson *et al.* 2001; Seino *et al.* 2005; Reineke *et al.* 2008). Dabei handelt es sich um einen DNA-Bereich vor einem ORF, der durch die Ausbildung einer spezifischen Sekundärstruktur von Ribosomen erkannt und gebunden wird. Der 5' nicht-translatierte Bereich der Hefegene YAP1 und p150 (Zhou *et al.* 2001) wurde in die Q β -*templates* eingebaut. Das fehlende PolyA-Signal wurde durch eine Abfolge von 25 bzw. 50 Adeninen ersetzt. Zusätzlich wurde eine Hepatitis Delta Virus Ribozymsequenz (Perrotta *et al.* 1996) zwischen RQ135rechts und Terminator kloniert. Nach Transkription der DNA spaltet sie sich autokatalytisch ab, so dass ein distinktes 3' Ende entsteht und die Q β -Replikase direkten Zugang zu ihrer Erkennungssequenz hat (Abb. 29).

Die diversen DNA-*templates* (Tab. 49) wurden zur Kontrolle der Expression auf Plasmide mit Hefe-*ori* kloniert (pRS313) und für die Etablierung des Replikons auf Plasmide ohne (pSc). AH109 und die drei Q β -exprimierenden Hefestämme wurden mittels PEG/LiAc transformiert, jeweils mit und ohne anschließender Regeneration von 2 h, 4 h oder 16 h. Hefen mit pRS313-Konstrukten wuchsen auf Leucin-freiem Medium, was zeigt, dass die Leu2-Expression bzw. die Funktionalität des Enzyms durch die Modifikationen nicht beeinflusst wurden. In keinem Fall wuchsen Hefen mit pSc-IRES-LEU2opt-Konstrukten. Somit konnte durch Modifikation von *LEU2opt* in der Hefe kein Replikon etabliert werden (4.1.2).



Abb. 29. Schematisch Darstellung der IRES-Konstrukte zur Q β -Amplifikation und Translation in Hefe. In der transkribierten mRNA spaltet sich die Ribozymsequenz autokatalytisch ab und sorgt für ein distinktes 3' Ende der RQ135r Sequenz. Damit dient es als *template* für die Q β -Replikase. Die Amplifikate besitzen eine IRES-Sequenz, an die die Ribosomen binden können und den Reporter exprimieren. Die PolyA-Sequenz sorgt für die Stabilisierung der RNA. Die 135 bp lange Q β -Erkennungssequenz wurde in zwei Hälften aufgeteilt. RQ135_{links}, RQ135_{rechts}.

Die IRES-Expressionskassetten wurden zusätzlich mit dem alternativen Testreporter *TRP1opt* (678 bp) ausgetestet. *TRP1opt* wurde (analog zu *LEU2opt*) so unähnlich zum wildtypischen *TRP1*-Gen wie möglich optimiert, um homologe Rekombination mit dem Genom zu vermeiden. Die AS-Sequenzen sind identisch, die Basensequenz von *TRP1* und *TRP1opt* stimmt insgesamt mit dem des wt-Gens nur noch zu 68% überein. Doch auch die Transformation mit den IRES-*TRP1opt*-Konstrukten brachte keine Hefekolonien auf den Selektionsplatten DO Trp hervor.

Somit ließ sich das Q β -Replikon *in vivo* mit keinem der ausgetesteten *templates* etablieren. Es bleibt festzuhalten, dass die Transkription ausgehend vom Promotor stattfindet, da bei den Kontrollen

funktionelles Leu2-Protein gebildet wurde. Es liegt nahe, dass der Ablauf zwischen Transkription – Replikation oder Replikation – Translation blockiert ist. Entweder findet die Replikase ihr spezifisches *template* in der Unmenge an Hefe-RNAs nicht, die Replikation findet nicht effizient genug statt oder das Reporter-*template* kann nach der Q β -Amplifikation nicht (korrekt) translatiert werden (4.1.2).

3.3.3.7 Zusammenfassung Q β -Replikon

- Q β -Replikasekomplex aus EF-Tu, EF-Ts, Q β , S1, Hfq wurde in Hefe *de novo* zu einem korrekt gefalteten Enzymkomplex aufgebaut (Q β -Hefe)
- Q β -Hefe besitzt ähnliche Eigenschaften wie Q β -*E. coli*: ssRNA *templates* werden amplifiziert, allerdings wird bei Selektionsdruck auf schnelle Amplifikation das *template* schrittweise verkürzt und kurze RNA-Moleküle werden bevorzugt amplifiziert
- RNA *templates* und verschiedenste DNA-Expressionskassetten wurden in Q β -exprimierende Hefestämme eingebracht, jedoch etablierte sich daraus *in vivo* kein autonomes Q β -Replikon

Fazit: Basierend auf Q β -Hefe und LEU2optRQ135 konnte *in vitro* zum ersten Mal ein funktionelles Replikon etabliert werden. Ohne funktionelles Replikon *in vivo* wurden keine Hefeklone ausgebildet, so dass die Funktionalität der Teilschritte Transkription, *template*-Findung, Amplifikation, Translation nicht analysiert werden konnten. Da die DNA-basierten Mutationssysteme erfolgversprechender waren, wurde deren Entwicklung in Bezug auf die Etablierung von Evolutionssystemen intensiver vorangetrieben.

3.4 Erfolgreiche Etablierung von zielgerichteten Evolutionssystemen in der Bäckerhefe durch Kopplung von Replikation, Mutation und Selektion

Zur Etablierung eines kontinuierlichen Evolutionssystems in *S. cerevisiae* bestehend aus Mutations- und Selektionssystem wurden neben den herausfordernden RNA-basierten (3.3) auch DNA-basierte Strategien zur Mutagenese entwickelt. Durch Kombination der zielgerichteten *prey*-DNA Mutagenese und Y2H Selektion wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Evolutionssysteme etabliert.

3.4.1 Sequenzspezifische, Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese

Bei der sequenzspezifischen, Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese sollte die Mutation des *prey*-Anteils gezielt stattfinden, indem *mismatch*-Oligonukleotide in die DNA eingebaut werden. Damit die Mutation/Selektion kontinuierlich stattfinden kann, sollten diese *prey*-spezifischen Oligonukleotide mit Basenaustauschen auch kontinuierlich aus dem Kulturmedium aufgenommen werden. Die *mismatch*-Oligonukleotide werden in den Zellkern der Hefezelle geschleust und werden mit dem nächsten Replikationszyklus in die DNA eingebaut, indem sie über die homologen Bereiche mit der Ziel-DNA hybridisieren, so dass *prey* DNA- bzw. Protein-Varianten entstehen (rote Markierung, Abb. 30). Je besser die Protein-Protein-Interaktion zwischen *bait* und *prey*-Varianten, desto mehr Reporter (*HIS3*, *Aur1-C*) wird exprimiert und umso besser kann die Hefezelle mit dem guten Interaktionspaar in Selektivmedium wachsen. Durch die kontinuierliche Oligonukleotid-Aufnahme werden über mehrere Generationen hinweg *prey*-Varianten erzeugt, die sich an verschiedenen Positionen zum Original-*prey* unterscheiden und letztendlich zum perfekten Binder evolvieren. *Survival of the fittest* – das beste Protein-Protein-Interaktionspaar setzt sich durch.

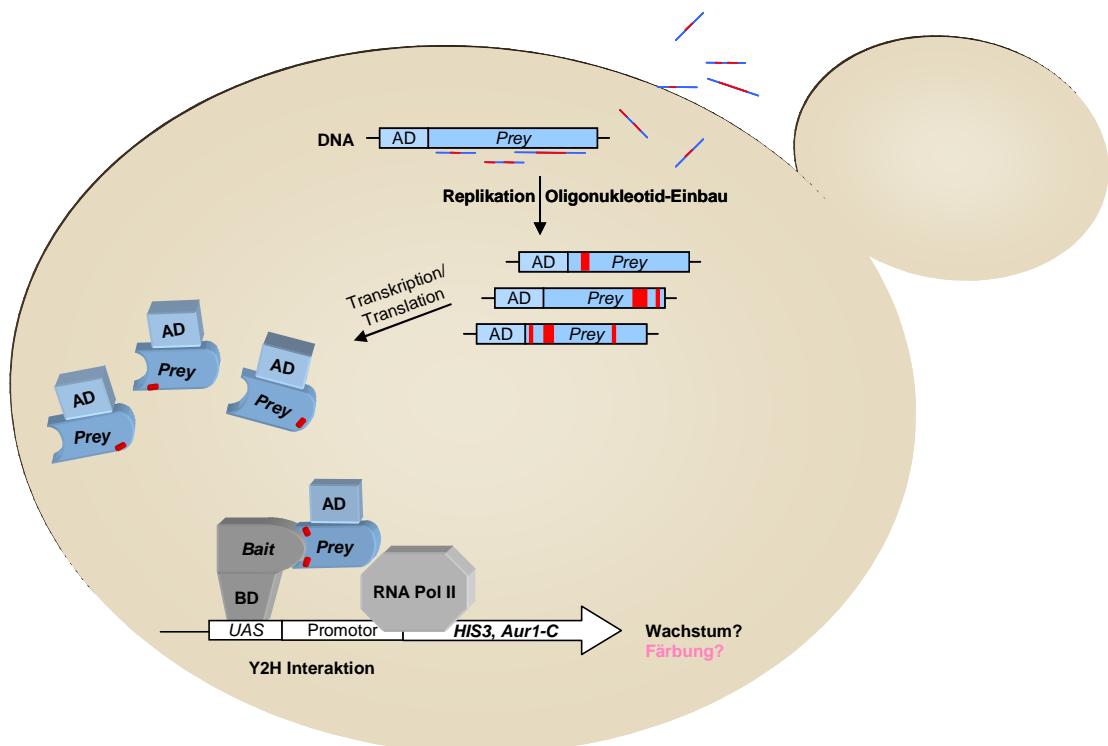


Abb. 30. Kontinuierliches, zielgerichtetes Evolutionssystem bestehend aus sequenzspezifischer, Oligonukleotid-vermittelter Mutagenese und Y2H Selektion. Details siehe Text.

Zur Etablierung dieses kontinuierlichen, zielgerichteten Evolutionssystems basierend auf Oligonukleotid-Einbau galt es folgende Teilschritte zu etablieren:

1. kontinuierliche Aufnahme von *prey*-spezifischen Oligonukleotiden durch die Hefe aus dem Medium
2. gezielter Einbau der aufgenommenen Oligonukleotide mit Misspaarungen in die *prey*-DNA
3. Selektion von Hefen mit besser interagierenden Proteinpaaren über das Wachstumsverhalten

3.4.1.1 Vorarbeiten zur Transformation von Hefe mit Oligonukleotiden

Site-directed mutagenesis ist eine einfache Methode zur ortsgerichteten DNA-Mutation durch Verlängerung von *mismatch*-Primern (Hutchison *et al.* 1978). Basierend auf dieser *in vitro* Methode wurde die Transformation von *S. cerevisiae* mit Oligonukleotiden etabliert, um genomische DNA gezielt zu verändern (Moerschell *et al.* 1988). Dabei wurde beobachtet, dass es Unterschiede in der Bevorzugung des Stranges gibt: *sense* und *antisense*-Oligonukleotide werden unterschiedlich gut bzw. Oligonukleotide werden bevorzugt am *lagging strand* eingebaut (Kow *et al.* 2007). Daraus erwuchs die Vorstellung, dass sich die transformierten Oligonukleotide in der Replikationsgabel an die einzelsträngige DNA anlagern und als Primer für die Synthese der Okazakifragmente fungieren. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass zusätzlich zum Ereignis der Oligonukleotid/DNA-Paarung auch Komponenten der DNA-Reparatur für die Etablierung der Oligonukleotid-Basenaustausche von entscheidender Bedeutung sind (Cole-Strauss *et al.* 1999; Rice *et al.* 2001; Liu *et al.* 2002; Dekker *et al.* 2003; Maguire *et al.* 2007). Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass die DNA-Replikation ein sehr wichtiger von vielen weiteren zellulären Prozessen ist, die als Voraussetzung für den Einbau von Oligonukleotiden notwendig sind.

Auch wenn der genaue Mechanismus bislang ungeklärt ist, konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotide in genomische DNA eingebaut werden. Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Etablierung des Oligonukleotid-basierten Mutagenesystems überprüft, ob der Oligonukleotid-Einbau auch in Vektor-DNA möglich ist. Dies war insofern eine Herausforderung, da sich ein mutierter Vektor – wenn mehr als eine Kopie pro Zelle vorliegt – gegenüber nicht mutierten Kopien durchsetzen muss. Im Gegensatz dazu wirkt sich eine Mutation im haploiden Genom zu 100% aus.

3.4.1.2 Einbau transformierter Oligonukleotide in Plasmid-kodiertes Gen *LEU2optNSM*

Zunächst wurde experimentell ermittelt, ob ein Plasmid-kodiertes Gen in *S. cerevisiae* durch Transformation mit einem Oligonukleotid mutiert werden kann. Dies wurde anhand der Reversion des defekten Nährstoffmarkers *LEU2optNSM* (*non sense mutation*) zu *LEU2opt* getestet.

LEU2optNSM wurde für diesen Test aus dem optimierten Gen *LEU2opt* (3.3.1) hergestellt. *LEU2opt* wurde - flankiert von dem starken *ADH1*-Promotor und *LEU2*-Terminator - auf das *CEN/ARS*-Plasmid pRS313 (Plasmidmarker *HIS3*) kloniert. Ausgehend von pRS313-AL_*LEU2opt* wurde mittels qcPCR (2.2.3.1) das Start-Methionin ATG zu ACG (Threonin) verändert und so pRS313-AL_*LEU2optNSM* generiert. Hefeklone mit diesem Plasmid konnten zwar auf DO His Agarplatten wachsen, aber wie erwartet nicht auf DO Leu, im Gegensatz zu Transformanten mit pRS313-AL-*LEU2opt*. Durch Transformation und Einbau eines Oligonukleotids zur Reparatur kann *LEU2opt* aus *LEU2optNSM* gezielt wiederhergestellt werden. Die Reversion von *LEU2optNSM* zu *LEU2opt* durch die Punktmutation von ACG → ATG diente zur Bestimmung der Mutationsrate.

3.4.1.2.1 Einfügen von Punktmutationen

Zur gezielten Generierung von *LEU2opt*-Revertanten wurden Oligonukleotide hergestellt, die nach Einbau in *LEU2optNSM* zusätzlich zur Wiederherstellung des Startcodons eine stille Basenmutation verursachten. Dadurch konnte zwischen spontaner Mutation und tatsächlichem Einbau des Oligonukleotids differenziert werden (Reversionsrate = Einbaurate + Spontanmutationsrate). Es wurden neun Oligonukleotide verwendet, die sich in Länge (20mer, 30mer oder 40mer) und Position der Punktmutationen (nähe 5' oder 3' Ende bzw. mittig) unterschieden. Abb. 31 zeigt die kürzesten und eines der längsten Oligonukleotide mitsamt ihrer Nukleotid-Austausche (grau hinterlegt) und Position relativ zum Zielgen *LEU2optNSM*.

Da die Literatur widersprüchliche Aussagen bezüglich der Strangbevorzugung lieferte (Moerschell *et al.* 1988; Kow *et al.* 2007), wurden die Oligonukleotide sowohl in *forward* (fwd) als auch in *reverse* (rev)-Orientierung transformiert und zusätzlich als fwd/rev-Oligonukleotidpaar. 5×10^7 Zellen des Leucin-auxotrophen Hefestamms AH109-LEU2optNSM wurde mittels PEG/LiAc-Methode mit 1 nmol Oligonukleotiden ($= 6 \times 10^{14}$ Moleküle) transformiert und nach Regeneration üN in Vollmedium zur Selektion von Revertanten auf DO HisLeu Agarplatten plattiert, die 2 Tage inkubiert wurden (2.2.2.12). Ohne Regenerationsschritt üN entstanden keine Revertanten, was dafür spricht, dass die Replikation eine bedeutende Rolle spielt.

Leu2opt	M	S	A	P	K	L	I	V	V	L	P	...
	-20	-10	+1	+10	+20	+30						
LEU2optNSM	...	AGCATA	CAATCA	AACTCC	CAGAATT	CACG	TCTG	CCTC	AAAAAG	ATTG	TGTT	ACCA...
LEU2opt.fwd1			CAACTCC	CAGAATT	CATG	TCA						
LEU2opt.fwd2				GAATT	CATG	TCA	GCTC	AAA				
LEU2opt.fwd3					CATG	TCA	GCTC	AAA	AAAG			
LEU2opt.fwd8			ATCA	AACTCC	CAGAATT	CATG	TCA	GCTC	AAA	AAAG	ATG	TGTT

Abb. 31. Nukleotidsequenz-alignment zwischen LEU2optNSM und Oligonukleotiden mit zwei Basenaustauschen. *LEU2optNSM* trägt durch die Veränderung des Startcodons zu ACG eine *non-sense*-Mutation (unterstrichen). Die Oligonukleotide *LEU2opt.fwd1* bis *fwd3* sind 20 Nukleotide lang, *Leu2opt.fwd8* ist 40 Nukleotide lang. Sie enthalten jeweils das korrekte Startcodon, sowie eine stille Mutation an der 3. Position der folgenden Aminosäure Serin. Die Basenaustausche im Vergleich zur *LEU2optNSM*-Sequenz sind grau hinterlegt.

Die Plasmide von bis zu zehn *LEU2opt*-Revertanten, also Klone die auf DO HisLeu Agarplatten wuchsen, wurden analysiert, um zwischen tatsächlichem Oligonukleotid-Einbau und spontaner Mutation zu differenzieren. Dabei musste berücksichtigt werden, dass das *LEU2optNSM*-Gen auf einem *low copy*-Vektor (*CEN/ARS*) kodiert ist, welcher in der Hefezelle in 2 - 3 Kopien vorliegt. Eine Kopie mit funktionellem *LEU2opt* reicht aus, um der Hefezelle das Wachstum auf Leucin-freiem Medium zu ermöglichen. Die direkte Analyse mittels cPCR von Hefe-Revertanten mit einem Vektorgemisch aus *LEU2opt* und *LEU2optNSM* und anschließender Sequenzierung des *LEU2optNSM*-Genabschnitts konnten deswegen nicht genutzt werden. Somit wurden aus den Revertanten Plasmide präpariert (2.2.2.8) und durch Transformation von *E. coli* vereinzelt (2.2.1.5). Erst durch cPCRs von Bakterieneinzelklonen (pro Hefeklone 16 lesbare Sequenzen) und anschließender Sequenzierung (2.2.3.1, 2.2.3.9) konnte das Verhältnis von Einbaurate (*LEU2opt-still*) zu Spontanmutationsrate (*LEU2opt*) bestimmt werden. Die Spontanmutationsrate ist vernachlässigbar, wenn die Einbaurate um Zehnerpotenzen höher ist. Abb. 32 zeigt die

Mutationsraten von drei unabhängigen Transformationen im Überblick. Die spontane Mutationsrate lag bei 1×10^{-8} . Die 20mer Oligonukleotide wurden nicht in die Zielsequenz eingebaut; vermutlich waren die homologen Bereiche zu kurz. Die 30mer Oligonukleotide mit mittigen Basenaustauschen wurden – wenn auch wenig effektiv (5×10^{-8}) – eingebaut. Die Transformationsansätze mit den längsten 40mer Oligonukleotiden mit mittigem Basenaustausch (*LEU2opt.fwd8.rev8*) lieferten die höchste Oligonukleotid-Einbaurate von 6×10^{-7} . Durch Modifikation der Oligonukleotide mittels Phosphorylierung des 5' Endes konnte die Mutationsrate auf 2×10^{-6} gesteigert werden.

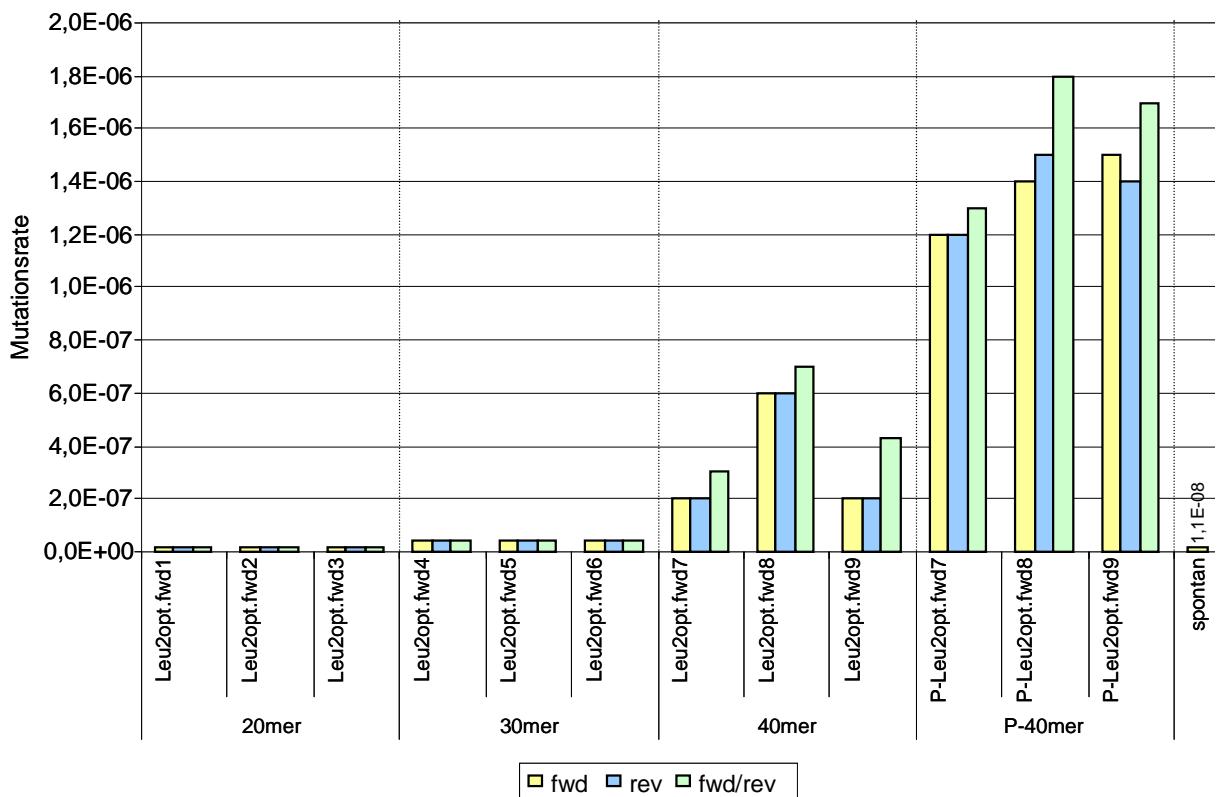


Abb. 32. Mutationsraten durch mismatch-Oligonukleotid-Transformation. 5×10^7 Hefezellen (AH109-LEU2optNSM) wurden mit 1 nmol Oligonukleotiden transformiert, üN regeneriert und LEU2opt-Revertanten auf DO Leu Agarplatten selektiert (2.2.2.12). Die *LEU2optNSM*-Genregion der Revertanten wurden sequenziert (2.2.3.9), um die Mutationsrate zu bestimmen.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass auch Plasmid-DNA in Hefe durch Einbau von transformierten Oligonukleotiden sequenzspezifisch mutiert werden kann. Da phosphorylierte Oligonukleotidpaare (fwd/rev) mit mittigen Nukleotid-Austauschen am effektivsten eingebaut wurden, wurden für die folgenden Experimente zum Einfügen von multiplen Basenaustauschen phosphorylierte Oligonukleotide verwendet, die sowohl am 5' als auch am 3' Ende mit mind. 12 Nukleotiden zu 100% mit der Zielsequenz hybridisierten.

3.4.1.2.2 Einfügen multipler Basenaustausche

Da basierend auf Oligonukleotid-Einbau ein Mutagenesesystem aufgebaut werden sollte, wurden in den folgenden Experimenten vier verschiedene Oligonukleotide so gestaltet, dass nach Einbau mehrere Mutationen hintereinander in das *LEU2optNSM* Gen eingefügt wurden. Abb. 33 zeigt die Oligonukleotide mit den verschiedenartigen Basenaustauschen und Positionen relativ zum Zielgen.

LEU2opt	M	S	A	P	K	K	I	V	V	L	P	G	D	H	V	G	Q	E	I	T	A	E	A	I	K...
	-20	-10	+1	+10	+20	+30	+40	+50	+60	+70															
LEU2optNSM	...	TACAATCAACTCCAGAATTCA <u>CG</u> CTGCTCCAAAAAAAGATTGTTTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGCTATCAA...																							
LEU2opt.fwd8		ATCAACTCCAGAATTCA <u>G</u> C <u>G</u> CTCCAAAAAAAGATTGTTTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGC																							
Oligomut1.fwd		GCTCCAAAAAA <u>A</u> T <u>C</u> GTTGTTTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGC																							
Oligomut2.fwd		TTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGC																							
Oligomut3.fwd		ACAGGAAATTACTGCTGAAGC																							
Oligomut4.fwd		ATCAACTCCAGAATTCA <u>G</u> C <u>G</u> CA <u>C</u> CTTA <u>G</u> TTTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGC																							
		ATCAACTCCAGAATTCA <u>G</u> C <u>G</u> CA <u>C</u> CTTA <u>G</u> TTTACCAAGGTGATCATGTAGGTCAAGAAATTACTGCTGAAGC																							

Abb. 33. Nukleotidsequenz-alignment zwischen LEU2optNSM und Oligonukleotiden mit multiplen Nukleotidaustauschen. LEU2optNSM trägt durch die Veränderung des Startcodons zu ACG eine *non-sense*-Mutation (unterstrichen). Der Nukleotidaustausch an Position +2 für die Reversion von LEU2optNSM zu LEU2opt sowie die stille Mutation an Position +6 zur Unterscheidung von Spontanrevertanten sind jeweils grau hinterlegt. Weitere gezielte Nukleotidaustausche in den Oligonukleotiden sind gelb markiert. Der NNK-Bereich in Oligomut4.fwd kennzeichnet die Variabilität der Positionen (N = A, C, G oder T; K = G oder T).

Die Transformation von AH109-LEU2optNSM und die Revertanten-Selektion sowie deren Plasmidanalyse erfolgte analog zu den Versuchen mit den Nukleotidaustauschen (3.4.1.2.1). In Tab. 50 sind die Oligonukleotidpaare aufgeführt, die aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften und Kombinationen neue Erkenntnisse liefern sollen bezüglich Einbau von zwei Oligonukleotiden, die sich (nicht) überschneiden oder mehrere Nukleotidaustausche zur Folge haben. Neben der Wiederherstellung des Startcodons und der stillen Mutation an der benachbarten Aminosäure Serin sollten weitere Mutationen eingeführt werden. Diese Mutanten werden allgemein als LEU2opt-still-Varianten bezeichnet.

Tab. 50. Oligonukleotidpaare und Fragestellung bezüglich der Einbaueffektivität in LEU2optNSM

Transf.-Ansatz	Oligonukleotidpaar1 Oligonukleotidpaar2	Anzahl Nukleotid- Austausche	Überlappungs- bereich der O.-Paare	Erwarteter Genotyp	Wie hoch ist Einbaurate ...?
T1	LEU2opt.fwd8/.rev8	2	-	LEU2opt-still	(Positivkontrolle)
T2	LEU2opt.fwd8/.rev8 Oligomut1.fwd/rev	2 2	11	LEU2opt-still LEU2opt-still-Variante	des 2. Oligonukleotids
T3	LEU2opt.fwd8/.rev8 Oligomut2.fwd/rev	2 2	0	LEU2opt-still LEU2opt-still-Variante	des 2. Oligonukleotids
T4	Oligomut3.fwd/rev	8	-	LEU2opt-still-Variante	aufgrund 8 Nukleotid-Austauschen
T5	Oligomut4.fwd/rev	13	-	LEU2opt-still-Variante	aufgrund 13 Nukleotid-Austauschen (degenerierter Bereich, 4x NNK)
T6	-	-	-	(LEU2opt)	(Negativkontrolle)

In Abb. 34 sind die Sequenzanalysen von je sieben unabhängigen Transformationen zusammengefasst. Es sei daran erinnert, dass in einer einzelnen Hefezelle 2 - 3 Kopien eines CEN/ARS-Plasmids enthalten sind, wobei eine Kopie des funktionellen LEU2opt-Gens ausreicht, um der Hefezelle Prototrophie zu vermitteln. Deshalb kann der Anteil dieses Gens/Plasmids in den Heferevertanten minimal 33% betragen. Erst durch Ausdehnung der Selektionszeit auf Leucin-freiem Medium steigt der Anteil auf 100% an, da nur diejenigen Nachkommen überleben, die eine funktionelle Genkopie vererbt bekommen. Der Negativkontrollansatz T6 zeigt die Entstehung von einigen wenigen spontanen Mutanten (LEU2opt, orange, Abb. 34). Insgesamt wurden die Oligonukleotidpaare in allen fünf Ansätzen effektiv eingebaut. In den Sequenzen von T1 bis T5 war

die LEU2opt-still-Mutation, die durch den Einbau der Oligonukleotide hervorgerufen wurden, zu 36 - 63% nachweisbar (grün bei T1 bis T3 und blau bei T4 und T5, Abb. 34). Oligonukleotide, deren Einbau für das Wachstum nicht zwingend notwendig waren (Zusatzoligonukleotide Oligomut1 in T2 bzw. Oligomut2 im T3, blau, Abb. 34) wurden zu 3% nachgewiesen. Da darauf kein Selektionsdruck angelegt wurde, fand man diese Sequenzen wie erwartet weniger häufig. Es zeigt aber, dass der gleichzeitige Einbau von zwei Oligonukleotiden möglich ist. Obwohl Oligonukleotide mit mehreren Nukleotid-Austauschen im zentralen Bereich (8 Einzelpositionen bei T4 und 12 degenerierte Positionen bei T5, blau, Abb. 34) schlechter mit dem Zielgen hybridisieren, wurden sie zu 55 bzw. 60% in *LEU2optNSM* eingebaut. Dies ließ darauf schließen, dass für den effektiven Einbau von Oligonukleotiden ins Plasmid der mittlere Bereich frei wählbar ist, um beliebige Mutationen in das Zielgen einzuführen und an den Enden 15 – 20 Nukleotide für die Hybridisierung ausreichen.

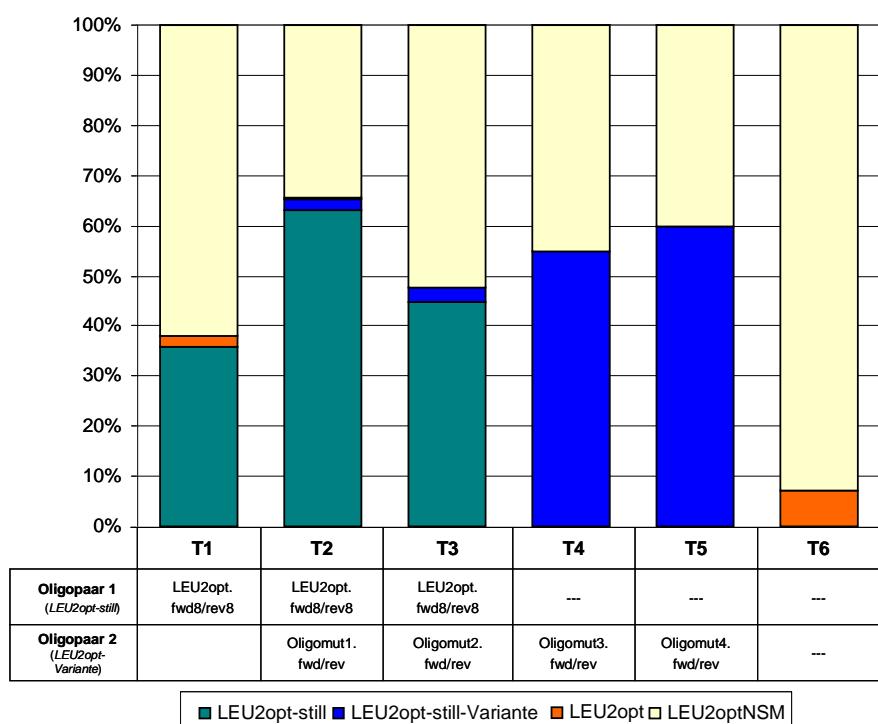


Abb. 34. Verteilung der Mutationen in *LEU2opt*-Revertanten nach Transformation mit mismatch-Oligonukleotiden. In sieben unabhängigen Ansätzen wurde AH109-*LEU2optNSM* mit dargestellten Oligonukleotidpaaren transformiert (2.2.2.12). Revertanten wurden auf DO HisLeu Agarplatten selektiert. Jeweils 16 lesbare Sequenzen aus *E. coli* aus jeweils zehn Hefeklonen wurden analysiert. T6: ohne Oligonukleotide. 1. Spontane Mutation: *LEU2opt* (orange) = nur ATG aber keine stille Mutation; 2. Einbau von Oligonukleotiden: *LEU2opt-still* (grün) = Oligonukleotid mit ATG und stille Mutation, bzw. *LEU2opt-Variante* (blau) = Einbau des zweiten Oligonukleotids (T2, T3) oder aufgrund des Oligonukleotid-Designs (T4 und T5); 3. Kein Basenaustausch: *LEU2optNSM* (gelb).

Die *LEU2opt*-Revertantenversuche belegen, dass durch den Einbau von sequenzspezifischen Oligonukleotiden in Plasmid-DNA 1 – 12 aufeinanderfolgende Einzelpositionen gezielt mutiert werden können. Somit wurde *in vivo* ein funktionelles Mutationssystem etabliert.

Die Transformation gekoppelt mit dem Oligonukleotid-Einbau ist ein einmaliges Ereignis, von dem ausgehend neu generierte Mutanten selektiert werden und somit die fortdauernde Entstehung von Mutanten nicht gegeben ist. Die Vielfalt an Mutanten oder die Kombination von Mutationen ist durch kontinuierliche Aufnahme und Einbau von Oligonukleotidgemischen höher als bei einer einmaligen

Transformation. Je größer die Menge an DNA/Protein-Varianten, desto wahrscheinlicher ist es, eine bessere Variante zu erhalten. Die Voraussetzung für eine kontinuierlich stattfindende Evolution in diesem System sollte die Aufnahme einer Mischung an sequenzspezifischen Oligonukleotiden aus dem Medium darstellen. So stellte sich die Frage, ob man die Kulturbedingungen so anpassen kann, dass Hefen eigenständig Oligonukleotide aus dem Medium aufnehmen.

3.4.1.3 Versuche zur kontinuierlichen Aufnahme von Oligonukleotiden aus Medium

Nach der Transformation von Hefezellen wird ein Teil der aufgenommenen Oligonukleotide in das Zielgen eingebaut, der Rest geht verloren und steht für keine weitere Mutagenese zur Verfügung. Durch den Einbau von degenerierten Oligonukleotiden entsteht letztendlich eine mehr oder weniger hohe, aber begrenzte Anzahl an Proteinvarianten, die im Anschluss an die Transformation durchmustert werden. Für eine kontinuierliche Evolution war es erstrebenswert, das einmalige Transformationsereignis zu ersetzen und die Kulturbedingungen so zu wählen, dass Hefen kontinuierlich Oligonukleotide aus dem Medium aufnehmen. Dazu sollten die beiden eigenständigen Prozesse Oligonukleotid-Aufnahme und Verdoppelung der Hefezelle kombiniert werden, da die Replikation für den Einbau der Oligonukleotide essentiell ist (3.4.1.1).

Tab. 51. Einflüsse auf Transformationsrate und Vitalität der Hefen

Transformationsansatz PEG/LiAc-Methode	Transforma- tionsrate	Vitalität Hefen
Standardprotokoll	10^{-4}	100%
ohne Hitzeschritt	10^{-5}	100%
ohne Waschen	10^{-5}	100%
ohne ssDNA	10^{-6}	100%
ohne PEG	$< 10^{-8}$	100%
ohne LiAc	$< 10^{-8}$	100%
0,5 µg PEI (15h, RT)	$< 10^{-8}$	100%
Lytikase (500 U, 30 min, RT)	10^{-8}	10%
Glaskugeln vortexen	10^{-7}	20%

Generell kann über PEG/LiAc-Transformation lineare oder zirkuläre DNA in Hefen eingeschleust werden. Die Methode der Transformation sollte so reduziert werden, dass idealerweise Hefen die DNA aus der Umgebung direkt aufnehmen können. Es wurde ausgetestet, welche Komponenten die Transformationseffizienz beeinflussen und welche Auswirkung sie auf das Hefewachstum haben. Die Minimal-Transformationen wurden mit dem wt-Hefestamm AH109 und dem CEN/ARS-Plasmid pRS315 (Plasmidmarker *LEU2*) in Anlehnung an das Standardprotokoll (2.2.2.3) durchgeführt. Die Abweichungen davon sind in Tab. 51 dargestellt. Die Selektion der Transformanten fand auf DO Leu Agarplatten statt. Insgesamt konnte aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass PEG und LiAc für eine erfolgreiche Transformation essentiell sind. Ohne Waschschritte, einzelsträngiger Träger-DNA oder Hitzeschock bei 42°C konnten Hefezellen transformiert werden, wenn auch die Transformationseffizienz um ein bis zwei Zehnerpotenzen sank. Der Zusatz von Polyethylenimin (PEI), einem Transfektionsreagenz das mit der DNA einen Komplex bildet und in der Zellkultur Anwendung findet, war für die Hefe-Transformation nicht geeignet. Die Inkubation der Hefezellen mit Lytikase zum Andauen der Zellwand bzw. Vortexen des Transformationsansatzes mit

Glaskugeln (10 - 20 sec, Stufe 10) statt Hitzeschock verminderte die Transformationsrate und zugleich den Anteil an lebenden Hefezellen dramatisch.

Bevor die Kulturbedingungen im Folgenden so verändert wurden, dass sie den Hefen eine autonome Oligonukleotid-Aufnahme aus dem Medium ermöglichen, wurde getestet, ob die Oligonukleotide in Kulturmedium überhaupt entsprechend stabil bleiben oder beispielsweise durch Nukleasen vorzeitig abgedaut werden. Hierzu wurde ein PCR-Test etabliert: eine Hefekultur wurde mit einem Oligonukleotid bis zu 24 h bei 30°C geschüttelt, wo bei das Zellzahl/Oligonukleotid-Verhältnis analog zum Transformationsansatz eingestellt wurde. Aliquots der Kultur wurden zu 10%, 20% und 30% in eine PCR-Reaktion eingesetzt, zusammen mit dem linearen *template* LEU2optNSM und einem Primerpaar, das spezifisch an das Oligonukleotid und *template* bindet (Abb. 35). Die Analyse der PCR-Produkte nach 0, 5 und 24 h ergab, dass sowohl nach 5 als auch nach 24 h mind. 80% des Oligonukleotids erhalten blieben. Somit war die Stabilität des Oligonukleotids in einer Hefekultur über 24 h hinweg gewährleistet.

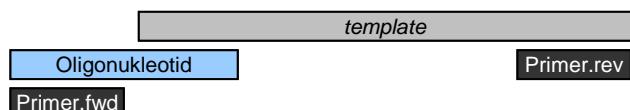


Abb. 35. PCR-Strategie zum Test der Oligonukleotid-Stabilität in Hefekulturen. Der *forward*-Primer hybridisiert mit dem Oligonukleotid, der *reverse*-Primer mit dem *template*. Das Oligonukleotid liegt in geringer Konzentration vor. Nur wenn das Oligonukleotid noch intakt ist, entsteht über PCR mit dem Primerpaar ein Produkt von entsprechender Größe.

Ausgehend von diesen Vorversuchen wurde das Kulturmedium mit verschiedenen Komponenten versetzt, die der Hefe zur Aufnahme von Oligonukleotiden verhelfen sollten und zugleich Zellteilung zulässt. Die Optimierung der Oligonukleotid-Aufnahme wurde am Beispiel von AH109-LEU2optNSM (Plasmidmarker *HIS3*) mit dem 40mer Oligonukleotid LEU2opt.fwd8/.rev8 begonnen, da der Einbau in *LEU2optNSM* nach Aufnahme durch Transformation bereits erfolgreich nachgewiesen werden konnte (3.4.1.2.1). Um sich lediglich auf die Aufnahme von DNA zu konzentrieren und die Notwendigkeit des Oligonukleotid-Einbaus auszublenden, wurde parallel der wt-Hefestamm AH109 mit dem Plasmid pRS315 (Plasmidmarker *LEU2*) im Vollmedium YPDA inkubiert. Tab. 52 zeigt die Nukleinsäuren sowie die Hefestämme und ihrer entsprechenden Medien.

Tab. 52. Systeme zur Austestung der DNA-Aufnahme aus dem Flüssigmedium

DNA	Oligo: Leu2.fwd8/.rev8	Plasmid: pRS315
Hefestamm	AH109-LEU2optNSM	AH109
DNA-Menge	0,75 nmol - 7,50 nmol	0,50 µg
Flüssigmedium	DO His, pH 5,8	YPDA, pH 5,8
Selektionsplatten	DO HisLeu	DO Leu

Es wurden 10^7 Hefezellen in 1 ml Medium inklusive DNA in einem 2 ml-Gefäß bei 30°C für 6 h bzw. üN bei 330 rpm im Thermoblock geschüttelt. Unter diesen Bedingungen wuchsen auch nach zahlreichen Wiederholungen auf entsprechenden Selektionsplatten keine Leucin-prototrophen Hefekolonien, weder resultierend aus Plasmid-Aufnahme noch durch *LEU2opt*-Reversion durch Oligonukleotid-Einbau. Da unter 10^7 Zellen keine einzige zu finden war, die DNA aufgenommen hatte,

führte dies zum Schluss, dass die DNA-Aufnahme unter gegebenen Bedingungen nicht effizient genug stattfand. Zur Effizienzsteigerung der DNA-Aufnahme wurden zahlreiche Kulturbedingungen ausgetestet. Sie sind in Tab. 53 zusammengestellt. Die Aufnahme von Oligonukleotiden ist ein energieabhängiger, aktiver Prozess (Disney *et al.* 2003), der durch sauren pH-Wert (pH = 2,5) des Mediums begünstigt wird, welcher die Annäherung von negativ geladener DNA und Membran ermöglicht. Deswegen wurden verschiedene saure pH-Werte getestet, allerdings teilen sind Hefen erst ab pH 5. Die Anwesenheit von 1 M Saccharose wurde bereits für erfolgreiche Transformationen mittels osmotischem Schock genutzt (Nevoigt *et al.* 2000). Zur Destabilisierung der Zellwand und damit Erleichterung des DNA-Eintritts wurden PEG/LiAc, Lytikase und Glasperlen mit zum Kulturmedium gegeben. Aus keiner dieser Kulturbedingungen gingen auf entsprechenden Selektionsplatten Leucin-prototrophe Hefekolonien hervor.

Tab. 53. Getestete Kulturbedingungen zur Aufnahme von DNA aus dem Hefemedium

Zusätze im Kulturmedium
10 mM Citrat, pH 2,5
40% PEG in LiAc, pH 5,8
20% PEG in LiAc, pH 5,8
20% PEG in LiAc + 10 mM Citrat, pH 3,5
20% PEG in LiAc + 10 mM Citrat, pH 4,0
10% PEG in LiAc, pH 5,8
10% PEG in LiAc + 25 mM Citrat, pH 3,5
10% PEG in LiAc + 25 mM Citrat, pH 4,0
1 M Saccharose
1 M Saccharose + 10 mM Citrat, pH 4,0
1 M Saccharose + 10% PEG in LiAc
1 M Saccharose + 10% PEG in LiAc + 10 mM Citrat, pH 4,0
Glasperlen
mit Lytikase (500 U) 30 min inkubiert
0,5 µg PEI (Transfektionsreagenz Zellkultur)

Tab. 54 zeigt, dass weitere Parameter wie Verhältnis von Hefezellen zu Oligonukleotiden, Kulturvolumen und Gefäßgröße variiert. In Anlehnung an den Hitzeschritt bei der Transformation (42°C) zur Öffnung der Zellwandporen wurden die Kulturen bei Temperaturen über 30°C inkubiert oder bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten mit Glasperlen geschüttelt (Costanzo *et al.* 1988). Auch mit diesen veränderten Kulturbedingungen konnten sich weder Oligonukleotide noch Plasmid-DNA in der Hefezelle etablieren. Vermutlich war die Effizienz der DNA-Aufnahme zu gering, da selbst die Aufnahme von Plasmid nicht nachweisbar war.

Tab. 54. Variation diverser Parameter zur Aufnahme von DNA aus dem Medium

Zellzahl	Volumen [ml]	Gefäßgröße [ml]	Zeit [h]	Temp [°C]	Kulturbedingungen
1×10^5	1	2	4,5	30	330 rpm, Thermomixer
1×10^6	10	10	6	37	180 rpm, Schüttelinkubator
3×10^6		50	24	42	Brutschrank
1×10^7					

Trotz intensiver Bemühungen führte keiner der getesteten Zusätze in Flüssigmedium und Veränderungen unterschiedlichster Parameter zur autonomen Aufnahme von DNA aus Flüssigkeit.

Deswegen wurde das System der Transformation beibehalten und im Hinblick auf die Etablierung eines bedingt kontinuierlichen Evolutionssystems optimiert.

Es hatte sich gezeigt, dass der Einbau von degenerierten Oligonukleotiden in die *LEU2opt*-DNA problemlos funktioniert. Zur Kombination des Mutationssystems mit dem Y2H Selektionssystem wurde die Anwendung der sequenzspezifischen, Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese auf das Sam68/Yes1-Modellsystem übertragen.

3.4.1.4 Erfolgreiche zielgerichtete Evolution von Protein-Protein-Interaktionspaaren in Flüssigkultur

Nachdem die Funktionalität der Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese am vereinfachten System der *LEU2optNSM*-Reversion erfolgreich getestet wurde (3.4.1.2), konnte die Kombination mit dem Y2H System begonnen werden, um ein zielgerichtetes Evolutionssystem zu etablieren. Anhand des Y2H Interaktionspaars Sam68/Yes1-weak (3.1.1.2) wurde die Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese auf die Mutation der *prey*-Komponente Yes1-weak angepasst. Yes1-weak ist ein schlechter Interaktionspartner; Yes1-wt hingegen interagiert sehr gut mit Sam68, so dass diese Hefen die Y2H Reporter exprimieren können und somit einen Wachstumsvorteil haben (3.1.2). Aus einem schlechten Interaktionspaar sollte durch Transformation und Einbau von Oligonukleotiden in Yes1-weak ein gutes Interaktionspaar entstehen und in Flüssigkultur selektiert werden.

3.4.1.4.1 Definierte Oligonukleotide zur Mutation von Yes1-weak

Analog zur Reversion von *LEU2optNSM* wurde Yes1-weak durch ein Oligonukleotid mit zwei Nukleotidaustauschen mutiert, Yes1-wt zu generieren. Dazu wurde ein 41 bp langes Oligonukleotid (Yes1-weak_R203W) hergestellt. Der erste Nukleotidaustausch an Position 603 (Abb. 36) führt zu einer stillen Mutation und dient zur Unterscheidung zwischen Oligonukleotid-Einbau und spontaner Mutation. Der zweite Basenaustausch an Position 607 (Abb. 36) war erforderlich um das WW-Motiv von Yes1-wt wiederherzustellen (3.1.1.2). Nur durch die zweite Basenveränderung waren die Hefezelle in der Lage die Y2H Reporter zu aktivieren und in Selektivmedium ohne Histidin zu wachsen.

	195	200	205	210		
Yes1-wt	
	R	F	Q	I	I	
	N	N	N	T	E	
Yes1-weak	...					
Yes1-weak_R203W.fwd						
	+580	+590	+600	+610	+620	+630
	...	CGTTTCCAGATTATCAACACACCGAAGGCATCGTGGGAAGCACGTTCTATTGCCACCGGT...				
		CAACAAACACCGAAGGAGATTGGTGGGAAGCACGTTCTATTG				

Abb. 36. Nukleotidsequenz-alignment zwischen Yes1-weak und Oligonukleotid zur Wiederherstellung des WW-Motivs. In Yes1-weak ist das erste Tryptophan-Codon (TGG) des WW-Motivs verändert (unterstrichen). Die Basenaustausche des Oligonukleotids im Vergleich zur Yes1-weak-Sequenz sind grau hinterlegt. Zusätzlich zum Basenaustausch an Position 607 (mutiert Arginin zu Tryptophan) wurde das Oligonukleotid so hergestellt, dass zwei Codons vorher (Position 603) eine stille Mutation im Glycin-Codon entsteht. Die Nummerierung des Yes1-ORFs beginnt mit der Aktivierungsdomäne.

Der Hefestamm Y2HGold wurde mit pGBKT7-CYCp-Sam68 (Plasmidmarker *TRP1*) und pRS313-Yes1-weak (Plasmidmarker *LEU2*) ktransformiert (2.2.2.3), so dass Hefeklone mit dem schlecht

interagierenden Y2H Paar Sam68/Yes1-weak entstanden (Y2HGold-Sam68/Yes1-weak). Sie waren aufgrund der zu schwachen Protein-Protein-Interaktion nicht in der Lage auf Agarplatten ohne Histidin zu wachsen und deshalb geeignet, sie mit Oligonukleotiden zu besseren Bindern zu mutieren. Y2HGold-Sam68/Yes1-weak wurde mit dem phosphorylierten Oligonukleotidpaar Yes1-weak_R203W.fwd/rev transformiert und üN in Vollmedium regeneriert, zum Einbau der Oligonukleotide in Yes1-weak (2.2.2.12). Im Anschluss wurde der Transformationsansatz 2x zwei Tage in DO TrpLeuHis Flüssigmedium kultiviert. Ein Aliquot der Kultur wurde auf Agarplatten DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT/64 nM AbA plattiert und die gewachsenen Hefeklone (10^2) bezüglich Yes1-Mutationen analysiert. Die Kontrollkultur (Transformation ohne Oligonukleotide) konnte unter diesen Selektionsbedingungen keine Hefekolonien ausbilden. Da Yes-weak1 auf einem CEN/ARS-Plasmid kodiert ist (2 - 3 Kopien pro Hefezelle), wurden die Plasmide der abgeschwemmteten Hefeklone isoliert und in *E. coli* vereinzelt (2.2.2.12). Unter 32 lesbaren cPCR-Sequenzen war ausschließlich der Genotyp von Yes1-wt mit der zusätzlich stillen Basenveränderung (Yes1-wt-*still*) enthalten. Über die Effizienz von Oligonukleotid-Aufnahme und –Einbau lässt sich in diesem Fall keine Aussage treffen, da die Selektion von Hefen mit besseren Interaktionspartnern daran gekoppelt war. Mit der Mutation von Yes1-weak zu Yes1-wt-*still* konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotid-vermittelte Mutation und Y2H Selektion prinzipiell gekoppelt werden können. Zur Etablierung eines Mutationssystems, das zahlreiche Basenveränderungen im Zielgen hervorbringt, wurden des Weiteren Oligonukleotid-Bibliotheken verwendet.

3.4.1.4.2 Oligonukleotid-Bibliotheken zur Mutation von Yes1-weak

Zur Herstellung einer Genbibliothek im Hefeorganismus wurde das einzelne *mismatch*-Oligonukleotid (3.4.1.4.1) durch eine Oligonukleotid-Bibliothek ersetzt. Dies sollte dazu führen, dass verschiedenenste Mutationen im Yes1-weak Zielgen entstehen. Die Oligonukleotid-Bibliothek wurde hergestellt, indem während der Oligonukleotid-Synthese Einzelnukleotide benutzt wurden, die nicht zu 100% rein sind, sondern zu einem geringen Prozentsatz mit den anderen drei möglichen Nukleotiden verunreinigt waren (= *dirty bottle*). So wurde gewährleistet, dass die ursprüngliche AS-Sequenz zu einem genügend hohen Prozentsatz erhalten blieb, da bei hoher Mutationsrate (degenerierter Bereich) möglicherweise nur noch ein minimaler Teil der Protein-Varianten funktionell wäre (2.2.3.10).

Die erste Oligonukleotid-Bibliothek (Yes1-weak_*dirty*, Abb. 37) wurde so gestaltet, dass sie in dem Bereich von Yes1-weak bindet. Durch Einbau dieses Oligonukleotids wird das WW-Motiv von Yes1-weak durch Mutation des ersten Tryptophans wiederhergestellt, zugleich wird eine stille Mutation in das benachbarte Glycin-Codon eingefügt (3.4.1.4.1) und gleichzeitig konnten in 5'- und 3'-Richtung in einem definierten Bereich von insgesamt 39 bp zufällige Mutationen einfügt werden. Bei der Gestaltung der Oligonukleotid-Bibliothek wurde berücksichtigt, dass das zweite Tryptophan-Codon zum Erhalt des WW-Motivs nicht verändert wird.

Das Oligonukleotid enthielt zehn degenerierte Codons, die zu 85% wt bleiben sollten bzw. zu 15% nicht-wt sein sollten. Unter Berücksichtigung der stillen Basenaustausche wurde ein durchschnittlicher AS-Austausch von 3,4 pro Oligonukleotid erwartet (2.2.3.10). Insgesamt war eine Variantengröße von $1,7 \times 10^{13}$ möglich.

	170	175	180	185	190	195	200	205	210	
Yes1-wt	...T	I	P	V	A	L	Y	D	Y	E

	170	175	180	185	190	195	200	205	210	
	...T	I	P	V	A	L	Y	D	Y	E

Yes1-weak	+510	+520	+530	+540	+550	+560	+570	+580	+590	+600
Yes1-weak_dirty.fwd	ACCATTTGTCGCCCTGATGATTGAAGCCGATACCGAAGATTGTCCTTAAAAAAGGTGAAACGTTCCAGATTACAAACACCGAAGGCCATCGGGGGAGACCGTTCTATTGCCACC									
*Yes1-mut_dirty.fwd	CTTGTGCGCCCTGATGATTGAAGCCGATACCGAAGATTGTCCTTAAAAAAGGTGAAACGTTCCAGATTACAAACACCGAAGGCCATCGGGGGAGACCGTTCTATTGCCACC									
*Yes1-weak_R203W.fwd										

Abb. 37. Nukleotidsequenz-alignment zwischen Yes1-weak und der beiden Oligonukleotid-Bibliotheken zur Generierung von Yes1-wt-still-Varianten. In Yes1-weak ist das erste Tryptophan (W)-Codon verändert (unterstrichen). Die gezielten Nukleotidaustausche der Oligonukleotide im Vergleich zur Yes1-weak-Sequenz sind grau hinterlegt. Dabei findet ein Basenaustausch an Position 607 statt, was zur Wiederherstellung des WW-Motivs führt (Arginin wird zu Tryptophan) und ein zweiter Basenaustausch an Position 603, welcher zu einer stillen Mutation im Glycin-Codon führt. Die variablen Positionen die durch *dirty bottle*-Verunreinigungen mutiert werden können, sind als Kleinbuchstaben dargestellt und gelb hinterlegt. Der Beginn der Yes1-wt-Aminosäuresequenz ist über den Nukleotidsequenzen dargestellt (Kasten). (*) markierte Oligonukleotide wurden kotransformiert.

Die zweite Oligonukleotid-Bibliothek (Yes1-mut_dirty, Abb. 37) wurde so gestaltet, dass Mutationen im RT-loop von Yes1 eingefügt und auf diese Weise Yes1-mut-ähnliche Varianten (3.1.1.2) generiert werden. Bei der zweiten Oligonukleotid-Bibliothek mit sechs degenerierten Codons sollte zu 75% wt erhalten bleiben bzw. zu 25% nicht-wt entstehen, was wiederum zu einem durchschnittlichen AS-Austausch von 3,4 pro Oligonukleotid führt (2.2.3.10). Die maximale Variantengröße betrug hierfür $8,6 \times 10^7$.

Um in diesem zweiten Ansatz das essentielle WW-Motiv wiederherzustellen, so dass mindestens Yes1-wt-still generiert werden konnte, wurde das Oligonukleotid Yes1-weak_R203W (3.4.1.4.1) kotransformiert. Auf den Einbau dieses definierten Oligonukleotids wurde direkt selektiert, da Hefeklone die dadurch das WW-Motiv wiederherstellen in Selektivmedium wachsen können. Der Einbau der *dirty-mut*-Bibliothek ist ein zweites, unabhängiges Ereignis, das mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit stattfinden kann. Wie unter 3.4.1.2 beobachtet, würde der Basenaustausch durch das zweite Oligonukleotid weniger oft in Erscheinung treten als der durch das definierte Oligonukleotid verursachte, auf das selektiert wird (T3, T4, Abb. 34). Der Einbau des *dirty-mut*-Oligonukleotids ist nicht zwingend notwendig um Hefen zum Wachstum zu verhelfen; es besteht lediglich die Chance auf Generierung einer besseren Yes1-Variante, die sich im Y2H System durchsetzt, indem sie Hefen einen Wachstumsvorteil verschafft oder aber es würde eine schlechtere Variante als Yes1-wt-still entstehen, welche dann von Hefen mit Sam68/Yes1-wt-still (oder noch besseren Interaktionspartnern) überwachsen werden würde.

Y2HGold-Sam68/Yes1-weak wurde mit phosphorylierten Oligonukleotidpaaren (ko-)transformiert: V1 enthielt die Oligonukleotid-Bibliothek Yes1-weak_dirty, V2 enthielt die Oligonukleotid-Bibliothek Yes1-mut_dirty zusammen mit dem definierten Oligonukleotid Yes1-weak_R203W. Zusätzlich gab es zwei Kontrollen ohne Oligonukleotide im Transformationsansatz. Zum Einbau der Oligonukleotide wurde der Transformationsansatz üN in Vollmedium regeneriert und anschließend für einen Tag in DO TrpLeuHis Selektionsmedium geschüttelt. Durch Erhöhen des Selektionsdrucks kommt der Wachstumsvorteil der Hefen zu tragen, die das reparierte WW-Motiv in Yes1 aufweisen, sei es durch spontane Mutation (Yes1-wt) oder durch den Einbau des entsprechenden Oligonukleotids (Yes1-wt-still). Nach Tag 1 wurden die vier Kulturen in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT und am Tag 7 in DO TrpLeuHis/200 mM 3-AT überimpft. Nach 11 Tagen wurde die Selektion in Flüssigkultur beendet. Von jeder dicht gewachsenen Flüssigkultur und zusätzlich am Tag 4 wurde Zellmaterial für die

Plasmid-Analysen zurückgehalten. Abb. 38 stellt den Verlauf der Selektionsbedingungen und die Zeitpunkte der Probennahmen dar.



Abb. 38. Selektion von Sam68/Yes1-weak Varianten nach Transformation mit Oligonukleotid-Bibliotheken. Y2HGold-Sam68/Yes1-weak wurde mit *dirty bottle*-Oligonukleotiden transformiert und üN in Vollmedium regeneriert. Die Selektion des Transformationsansatzes erfolgte zunächst einen Tag in mildem Selektionsmedium DO TrpLeuHis, von Tag 1 bis Tag 7 in stringentem Selektionsmedium mit 100 mM 3-AT und weitere 4 Tage mit 200 mM 3-AT. Zu den Zeitpunkten Tag1, Tag4, Tag 7 und Tag11 wurden Proben aus den Flüssigkulturen genommen sowie Aliquots auf Agarplatten DO TrpLeuAde bzw. DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT plattiert.

Zur optischen Verlaufskontrolle wurden an Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 11 Aliquots der Flüssigkulturen auf zwei unterschiedlichen Agarmedien plattiert und jeweils nach 2 Tagen bebrütet analysiert. DO TrpLeuHisAde/100 mM 3-AT-Agarplatten wurden zur stringenten Selektion von Hefemutanten genutzt. Auf DO TrpLeuAde Platten konnten Hefen mit schwach (rosa) und stark (weiß) interagierenden Protein-Protein-Interaktionspartnern wachsen; der Unterschied der Interaktionsstärke äußert sich in der Kolonienfarbe und ist in Abb. 39 für V1 und Ko2 exemplarisch dargestellt. Nach 1 Tag Selektion in Flüssigselektivmedium waren bei allen Ansätzen auf DO TrpLeuAde Platten nur rosafarbene Kolonien gewachsen. Nach 4 Tagen waren bei V1, V2 und Ko1 knapp 50% der Hefeklone weiß. Diese Hefekolonien schienen also neben den ursprünglich schwach interagierenden auch stark interagierende Proteinpartner zu beinhalten. Nach 6 Tagen wuchsen bei V1, V2 und Ko1 nur noch weiße Kolonien. Bei der Kontrolle Ko2 konnten Hefen in Flüssigkultur wie erwartet nicht überleben, so dass auch auf den DO TrpLeuAde Agarplatten keine Kolonien mehr ausgebildet werden konnten. Warum sich die Kontrolle Ko1 entgegen den Erwartungen verhielt, konnte im Folgenden geklärt werden.

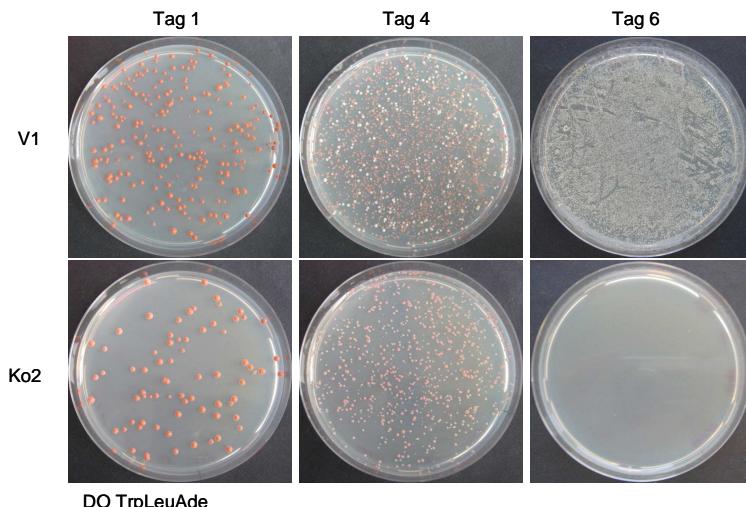


Abb. 39. Anreicherung von Hefen mit stark interagierenden Y2H Paaren nach Oligonukleotid-Transformation. V1: Y2HGold-Sam68/Yes1-weak (= schwaches Interaktionspaar) wurde mit Yes1-weak_dirty transformiert und in Flüssigkultur selektiert. Ko2: Kontrolle (ohne Oligonukleotide). Details siehe Text. Plattierte Aliquots auf DO TrpLeuAde Agarplatten zur optischen Verlaufskontrolle. Der Anteil an weißen Kolonien (mit starken Interaktionspartnern) nahm bei V1 mit Dauer der Selektion zu.

Bei V1, V2 und Ko1 nahm insgesamt das Verhältnis von weißen Kolonien zur Gesamtzellzahl (rosa + weiß) mit der Dauer der Kultivierung in Selektivmedium zu, was annehmen ließ, dass aus den ursprünglich eingesetzten schwachen Interaktionspartnern besser interagierende Partner entstanden sind. Mutationsart und Entstehung (spontan oder Oligonukleotid-Einbau) wurden durch Sequenzierung der Yes1-Bereiche aufgeklärt. Da die Selektion auf DO TrpLeuHisAde/100 mM 3-AT Agarplatten stringenter war und darauf nur weiße Kolonien, also potentiell mutierte Yes1-Varianten wuchsen, wurden für die weiteren Analysen die Kolonien dieser Agarplatten abgeschwemmt ($\sim 10^3$). Nach Plasmidisolation und Vereinzelung in *E. coli* (2.2.2.15) wurden pro Tag und Ansatz zwischen 50 und 60 lesbare Yes1-Sequenzen ausgewertet.

Die Mutation von Yes1-weak zu Yes1 mit wiederhergestelltem WW-Motiv konnte auf zweierlei Arten stattgefunden haben: 1) durch spontane Mutation (Yes1-wt), dann war nur der eine Basenaustausch von CGG zu TGG zu beobachten oder 2) durch Einbau von Oligonukleotiden, die das WW-Motiv und eine stille Mutation einführten (Yes1-wt-still). Zusätzlich zur Wiederherstellung des WW-Motivs und der stillen Mutation konnten in den *dirty*-Bereichen Nukleotide ausgetauscht sein, so dass neue Yes1-Varianten entstanden (Yes1-Variante). Abb. 40A zeigt die Zusammenfassung der Sequenzierergebnisse der Hefen von Agarplatten zu vier Zeitpunkten der Selektion. Die verschiedenen Arten der aufgetretenen Mutationen sind aufgeschlüsselt und in prozentualen Anteilen dargestellt. Die Y2H Selektion auf den DO TrpLeuHisAde/100 mM 3-AT Agarplatten hatte in den vier Kulturen entsprechend den Erwartungen funktioniert. Nach Tag 1 sind keine Hefekolonien gewachsen, was drauf schließen ließ, dass die Hefenklone mit den schneller wachsenden Sam68/Yes1-Mutanten bei V1/V2 bzw. Ko1 noch deutlich in Unterzahl waren. (Es wurde nur ein Aliquot des kompletten Ansatzes plattiert.) In Ko1 ist eine spontane Mutation aufgetreten (Yes1-wt), welche sich nach Tag 4 bereits zu 100% durchgesetzt hatte. Dies erklärt das Wachstumsverhalten entgegen den Erwartungen. In der zweiten Kontrolle Ko2 trat das Ereignis der spontanen Mutation nicht auf. Aus diesem Negativkontrollansatz sind entsprechend der Erwartung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Hefekolonien auf Agarplatten mit 100 mM 3-AT gewachsen. Bei V1 wurden an Tag 4 zum ersten Mal Yes1-Varianten identifiziert, die sowohl durch spontane Mutationen entstanden sind (Yes1-wt, 23%), als auch durch gezielten Einbau der Oligonukleotid-Bibliothek im Yes1-weak-Bereich (Yes1-wt-still: 20%; Yes1-Variante: 57%). Der Anteil an Yes1-Varianten stieg bis Tag 11 zu 98% an. Bei V2 mussten beide der kotransformierten Oligonukleotide eingebaut werden, um neue Yes1-Varianten zu generieren. So waren in den Sequenzen an Tag 4 zum überwiegenden Anteil (68%) Yes1-wt-still und zu 30% Yes1-Varianten enthalten. Die Vermutung, dass der Einbau der Oligonukleotid-Bibliothek bei V2 seltener passiert als bei V1 hatte sich demnach bestätigt. In V2 wurde durch das einzelne Oligonukleotid das WW-Motiv wiederhergestellt (und die zusätzliche stille Mutation in das Glycin-Codon eingeführt), die Veränderung im RT-loop war ein zweites, unabhängiges Ereignis (3.4.1.2.2), welches wie angenommen seltener stattfand.

Durch die Kombination von Selektion in Flüssigkultur und auf Agarplatten konnten in V1 und V2 sowohl Yes1-wt, Yes1-wt-still als auch ganz neue Yes1-Varianten identifiziert werden. Da auf Agarplatten max. 10^3 Klone analysiert werden können (3.1) und die Evolution kontinuierlich stattfinden soll, wurde generell die Selektion in Flüssigkultur bevorzugt und somit parallel auch die Flüssigkulturen analysiert.

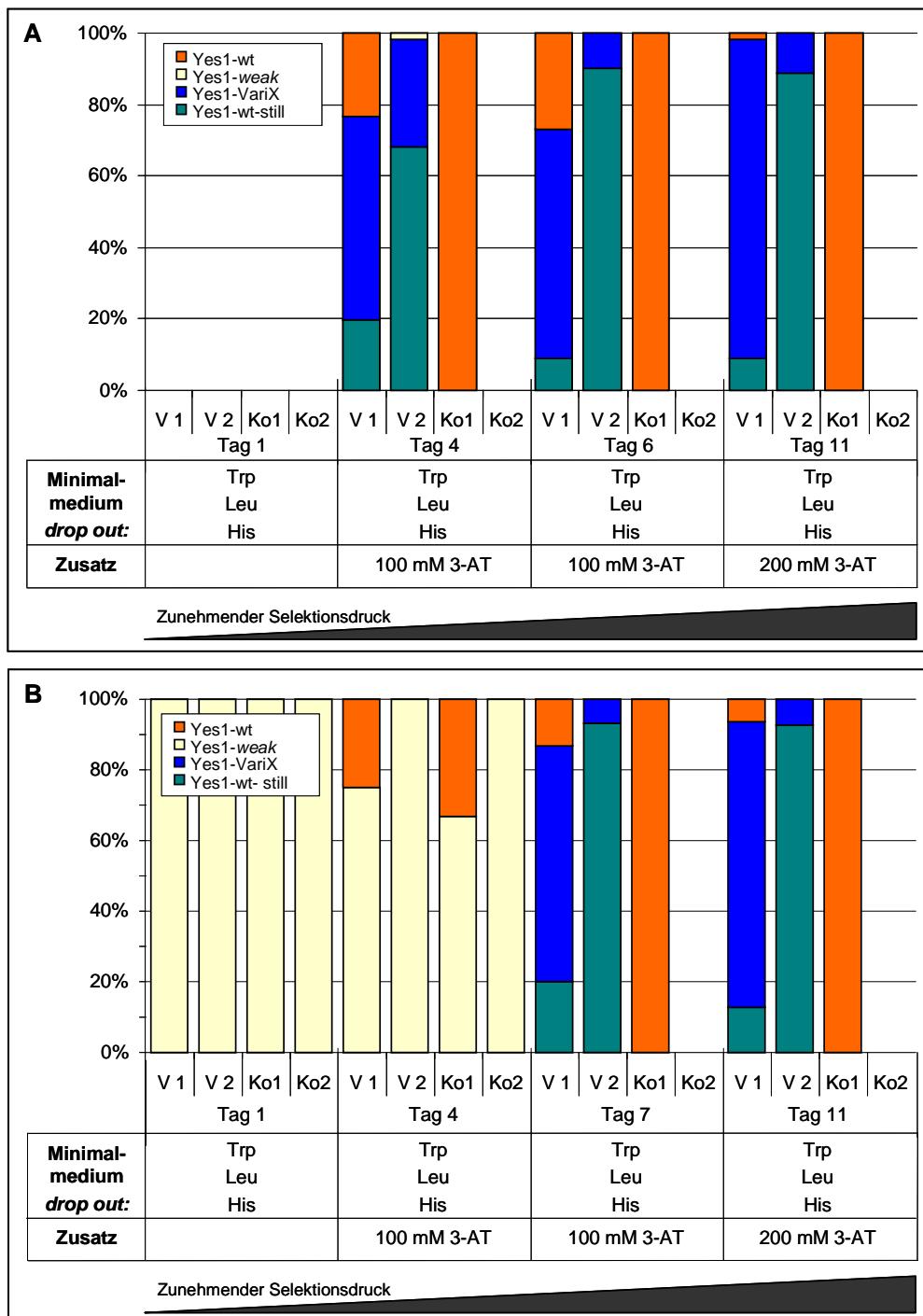


Abb. 40. Anreicherung von Hefen mit Yes1-Mutationen nach Transformation mit Oligonukleotid-Bibliotheken und Y2H Selektion. Y2HGold-Sam68/Yes1-weak wurde mit Yes1-weak_dirty (V1) bzw. Yes1-mut_dirty/Yes1-weak_R203W (V2) transformiert und in Flüssigkultur mit steigender Stringenz kultiviert. Ko1, Ko2: ohne Oligonukleotide. **A.** Aliquots der Flüssigkulturen wurden auf DO TrpLeuHisAde/100 mM 3-AT Agarplatten plattiert und die überlebenden Klone analysiert. Die spontane Mutation Yes1-wt hatte sich in Ko1 ab Tag 4 zu 100% durchgesetzt. Ko2 brachte keine Kolonien hervor, so dass die Selektion auf Platte stringent genug ist, um Hefen mit schwach interagierenden Proteinpaaren abzutöten. **B.** Analyse der Flüssigkulturen. In den transformierten Kulturen V1 und V2 reichern sich Hefen mit Sam68/Yes1-wt-still bzw. neue Yes1-Varianten (Yes1-VariX) an.

Die Absorptionszunahme der evolvierenden Kulturen wurde täglich gemessen und die Wachstumsraten berechnet (2.2.2.5). Die Wachstumsrate von Hefen mit Sam68/Yes1-weak ist in

Selektivmedium mit 3-AT recht gering (5% Wachstumsrate/h). Wenn aus *Yes1-weak* (durch Oligonukleotid-Einbau oder spontaner Mutation) *Yes1-wt(-still)* entsteht, so sollten sich die schnell wachsenden Hefeklone mit Sam68/*Yes1-wt(-still)* (mind. 45% Wachstumsrate/h) gegenüber den langsam wachsenden Hefen mit Sam68/*Yes1-weak* durchsetzen. Deshalb war die Erwartung, dass die Wachstumsrate der Gesamtkultur zunächst niedrig ist und nach einer gewissen Zeit ansteigt, nämlich dann, wenn sich schnell teilende Hefen zu einem genügend hohen Anteil in der Gesamtkultur angereichert haben.

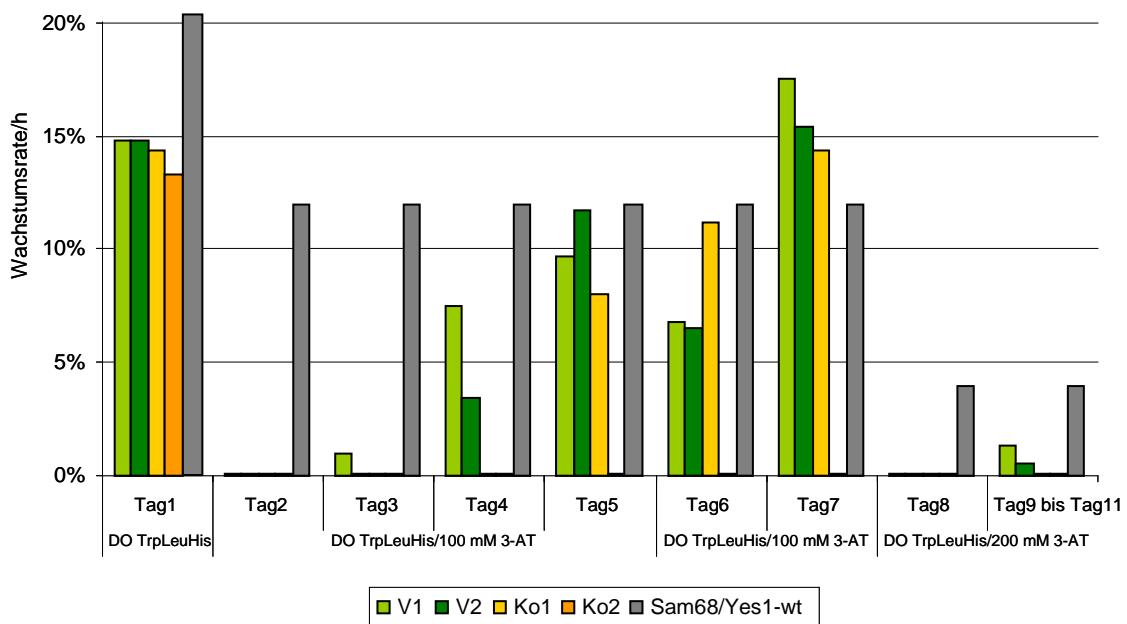


Abb. 41. Wachstumsraten der Oligonukleotid-transformierten Hefekulturen in Selektionsmedium. Details siehe Text. Schrittweiser Anstieg durch Anreicherung von Hefen mit Sam68/*Yes1-VariX*

Der schrittweise Anstieg der Wachstumsraten in den 11 Tagen mit ansteigendem Selektionsdruck ist in Abb. 41 veranschaulicht. Die Wachstumsraten der Kulturen V1, V2 waren vergleichbar und auch die Kultur Ko1 zeigte deutliches Wachstum, was auch hier in den Flüssigkulturen auf die spontane Reversion hindeutete (vgl. Plattenanalyse). Zellen der Kultur Ko2 hingegen starben nach Überimpfen in Medium mit 3-AT wie erwartet vollständig ab. Da die Wachstumsraten von Hefen in Medium mit 3-AT generell sehr niedrig sind, ließ sich der Anstieg der Wachstumsrate aufgrund der Anreicherung von mutierten Hefeklonen auch hier erst nach 4 – 5 Tagen erkennen und somit vermuten, dass Hefen mit guten Interaktionspartnern selektiert wurden (4.2.1). Analog zu den Analysen der Agarplatten wurden nach 1, 4, 7 und 11 Tagen aus den Flüssigkulturen Plasmide isoliert, in *E. coli* vereinzelt und 50-120 cPCRs sequenziert (2.2.2.15). Klar zu erkennen war auch bei den Analysen der Flüssigkulturen, dass sowohl die Mutation zu *Yes1-wt-still*, als auch zusätzliche Basenaustausche durch die Oligonukleotid-Bibliothek (*Yes1-VariX*) stattfanden (Abb. 40B). Im Vergleich zur Selektion auf Platte verzögerte sich die Anreicherung von schnell gegenüber langsam wachsenden Hefen um 1 - 2 Tage, wobei berücksichtigt werden muss, dass durch Plattenselektion ein zusätzlicher Selektionsschritt (2 - 3 Tage Inkubation auf Platten mit 100 mM 3-AT) hinzu kam. In den Sequenzen von V1 und Ko1 waren am 4. Tag zu 25% bzw. 30% lediglich spontane Mutanten (*Yes1-wt*) nachzuweisen, ansonsten war im überwiegenden Anteil der Sequenzen das ursprüngliche *Yes1-weak* enthalten. Erst ab dem 7. Tag (statt auf Platte schon nach 4 Tagen) konnten aus der V1-Flüssigkultur *Yes1-Varianten*

identifiziert werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Selektion in Flüssigmedium nicht so stringent funktioniert wie auf Agarplatten (3.1.1.2): die Negativkontrolle Ko2 konnte in DO TrpLeuHis und kurze Zeit auch in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT noch überleben, obwohl darin laut Sequenzierung ausschließlich Hefen mit Sam68/Yes1-weak enthalten waren. Dies ist darin begründet, dass Hefen in Flüssigkultur bedingt von lysierten Nachbarhefen leben können (*cross feeding*).

Aus den Sequenzanalysen der Flüssigkulturen und Agarplatten von V1 (Oligonukleotid-Bibliothek im Yes1-weak-Bereich) war ersichtlich, dass die Punktmutationen vollständig über den *dirty bottle*-Bereich (sowohl 5' als auch 3' des WW-Motivs) verteilt waren. Es konnten insgesamt 13 verschiedene Yes1 DNA-Varianten (Vari01 – 13, Abb. 43A) identifiziert werden, die in sieben Protein-Varianten resultierten (ProteinVari01 - 07, Abb. 43B). Bemerkenswert war, dass ProteinVari01 mit dem AS-Austausch E205D aus drei verschiedenen DNA-Varianten (Vari01, Vari02, Vari04) hervorging. Diese Yes1-Varianten waren zu einem hohen prozentualen Anteil in den mutierten Sequenzen enthalten. Vari02 reicherte sich über die 11 Tage hinweg in den Kulturen (Flüssigmedium bzw. auf Platte) an, wohingegen sich Vari01 und Vari04 tendenziell abreichten, wie aus Abb. 42 deutlich hervorgeht. Welche Interaktionsstärken sie mit Sam68 aufweisen, wurde im Folgenden näher analysiert.

Aus dem Transformationsansatz V2 (zwei definierte Basenaustausche durch Yes1-weak_R203W und Oligonukleotid-Bibliothek im RT-loop) wurden insgesamt zwei neue DNA-Varianten identifiziert, wobei VariA einen Basenaustausch enthält und VariB fünf Basenaustausche bzw. zwei AS-Austausche aufweist (VariA, VariB, Abb. 43). Yes1-wt-still VariB war zu 99% in den Sequenzen enthalten, so dass davon auszugehen ist, dass sich Hefen mit dem Proteinpaar Sam68/Yes1-VariB ebenfalls zu 99% in der Gesamtkultur angereichert hatten. Die Interaktionsstärke zwischen Sam68/Yes1-VariB wurde im Folgenden näher analysiert.

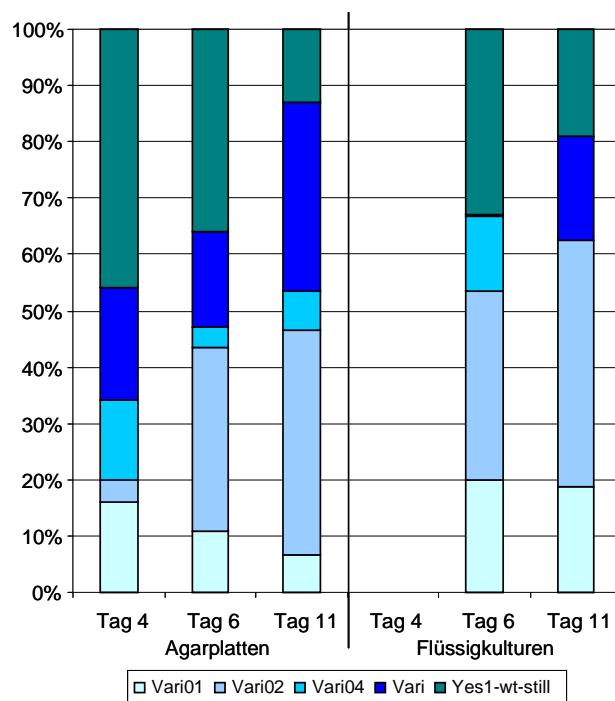


Abb. 42. Sequenzanteile der 13 entstandenen Yes1-wt-still DNA-Varianten. Die Yes1-wt-still Varianten Vari01, Vari02 und Vari04 nehmen einen hohen prozentualen Anteil ein, sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur. Die Varianten Vari03, Vari05 - Vari13 sind zusammengefasst (Vari, dunkelblau).

Das Evolutionsexperiment mit Oligonukleotid-Bibliotheken und Y2H Selektion in DO TrpLeuHis/(+/- 3-AT) wurde auf die gleiche Weise wiederholt. Die Anreicherung von Hefen mit besseren Bindern als Sam68/Yes1-weak wurde wiederum anhand der schrittweise ansteigenden Wachstumsraten verfolgt. Hefen von Agarplatten sowie Aliquots der Flüssigkulturen wurden analysiert. Aus Ansatz V1 (Oligonukleotid-Bibliothek im Yes1-weak-Bereich) wurden drei neue DNA-Varianten (Vari14 - 16, Abb. 43) und aus dem Ansatz V2 (Yes1-weak_R203W und Oligonukleotid-Bibliothek im RT-loop) eine neue DNA-Variante (VariC, Abb. 43) selektiert.

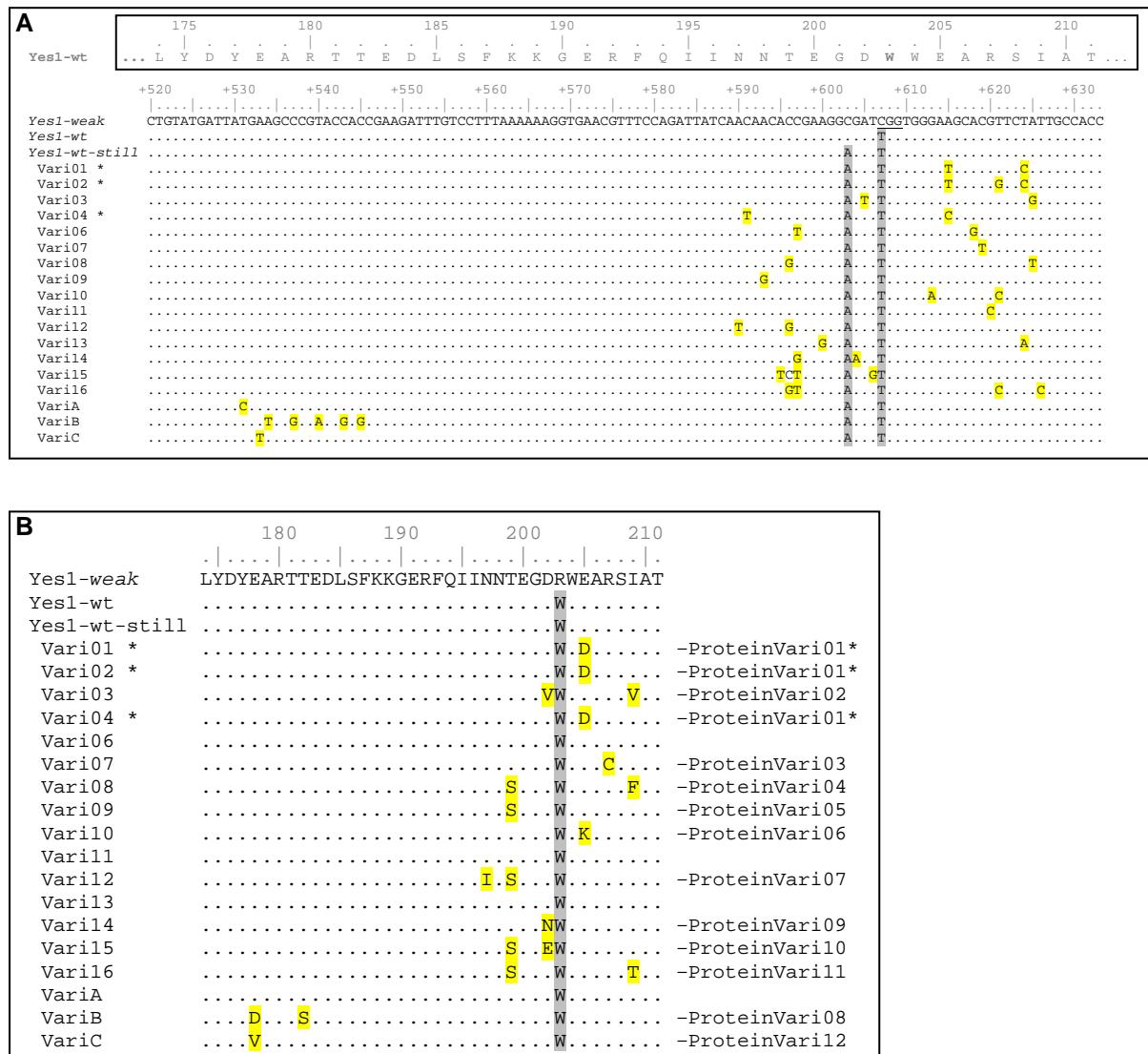


Abb. 43. Identifizierte Yes1 DNA- bzw. Protein-Varianten nach Transformation mit *dirty bottle*-Oligonukleotid-Bibliotheken und Y2H Selektion. Die Varianten wurden aus zwei unabhängigen Transformationen zwischen Tag 4 und Tag 11 aus Flüssigkulturen und von Agarplatten identifiziert. **A.** Nukleotidsequenz-alignment. **B.** Aminosäuresequenz-alignment. Die gezielten Austausche durch die Oligonukleotid-Bibliothek sind grau hinterlegt, die verschmutzten Positionen sind gelb hinterlegt. (*) kennzeichnet DNA-Varianten, die zum gleichen AS-Austausch führen.

Mit diesen Evolutionsversuchen wurde anschaulich dargelegt, dass der Einbau von Oligonukleotid-Bibliotheken in die Plasmid-kodierte Yes1-weak DNA effektiv stattgefunden hat. Hefeklone mit Sam68/Yes1-wt-still und Sam68/Yes1-VariX wurden während der Selektion gegenüber den ursprünglichen Hefeklonen mit Sam68/Yes1-weak angereichert. Die Selektion von neuen Yes1-

Varianten war in Flüssigkultur sowie auf Agarplatten möglich, wobei die Plattenselektion effektiver ist, jedoch weniger Einzelklone abbilden kann. Dies führte zu der Annahme, dass die generierten Yes1-Varianten besser mit Sam68 interagieren als der ursprüngliche Partner Yes1-weak und diesen Hefeklonen den nötigen Wachstumsvorteil verschafft haben. Im Folgenden wurden die Interaktionsstärken der neu entstandenen Yes1-Varianten zu Sam68 näher analysiert.

3.4.1.4.3 Neue Yes1-Varianten interagieren besser mit Sam68 als Yes1-weak

Durch die sequenzspezifische, Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese wurden insgesamt 12 neue Yes1-Varianten identifiziert, die sich auch auf Proteinebene von Yes1-wt-still unterscheiden (3.4.1.4.2). Diese Varianten wurden neben Yes1-wt-still in den evolvierten Kulturen identifiziert. Die Interaktionsstärke der neu generierten Yes1-Varianten mit Sam68 gegenüber der von Sam68/Yes1-weak bzw. Sam68/Yes1-wt wurde analysiert.

Die Plasmide der neu identifizierten Yes1-Varianten (pRS315-AD-Yes1-VariX) wurden nach Vereinzelung aus *E. coli* isoliert und zusammen mit pGBKT7-CYCp-Sam68 in den Hefestamm Y2HGold eingebracht (2.2.2.3). Kotransformanten wurden nach Selektion auf DO TrpLeuHisAde Agarplatten identifiziert. Pro Interaktionspaar wurden drei Einzelkolonien für die Bestimmung der Wachstumsraten in Selektivmedium DO TrpLeuHisAde mit 100 bzw. 200 mM 3-AT angeimpft. Da die Yes1-Varianten aus Flüssigkulturen mit 200 mM 3-AT isoliert wurden, musste demnach die Protein-Protein-Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-VariX ungefähr so gut sein wie die zwischen Sam68/Yes1-wt(-still). Die Zunahme der Absorption über die Zeit wurde gemessen und zur Berechnung der Wachstumsraten genutzt (2.2.2.5).

Tab. 55. AS-Mutationen der neu entstandenen Yes1-Varianten

Bezeichnung	AS-Austausch		
Yes1-wt-still	G201G		
Vari01	E205D		
Vari02	E205D		
Vari04	E205D		
Vari08	T199S	I209F	
Vari10	E205K		
Vari14	T199T	D202N	
Vari15	T199S	D202E	
Vari16	T199S	R207R	I209T
VariB	E178D	T182S	
VariC	E178V		

Aus den experimentellen Daten ging hervor, dass alle getesteten Hefekulturen mit Sam68 und Yes1-VariX (vgl. Tab. 55) deutlich schneller wuchsen als die Kontrollkultur mit Sam68/Yes1-weak und sich auf dem Niveau der Wachstumsrate von Hefen mit Sam68/Yes1-wt(still) bewegten (Abb. 44). Hefen mit Sam68/Yes1-wt-still (stille Mutation G201G) wiesen die gleiche Wachstumsrate auf wie Hefen mit Sam68/Yes1-wt, weshalb die Wachstumsraten zusammengefasst wurden. Somit konnte mittels Oligonukleotid-Transformation aus langsam wachsenden Hefen mit dem Interaktionspaar Sam68/Yes1-weak Hefen generiert werden, die vergleichbar schnell wachsen wie Hefen mit Sam68/Yes1-wt.

Die Yes1-Varianten Vari01, Vari02 und Vari04 besitzen zwar denselben AS-Austausch (E205D), dieser wurde allerdings durch unterschiedliche Punktmutationen verursacht. Bemerkenswert ist, dass

sich diese Kulturen in den Wachstumsraten merklich unterschieden, und zwar reproduzierbar in Selektivmedium mit 100 oder 200 mM 3-AT (grüne Balken, Abb. 44): Hefen mit Sam68/Yes1-Vari01 wuchsen mindestens genau so gut wie Hefen mit Sam68/Yes1-wt(-still). Die Wachstumsraten von Hefen mit Sam68/Yes1-Vari02 bzw. Yes1-Vari04 waren dagegen erkennbar niedriger. Wodurch diese Wachstumsunterschiede trotz Expression derselben Yes1-Proteinsequenz zustande kamen, wurde näher untersucht.

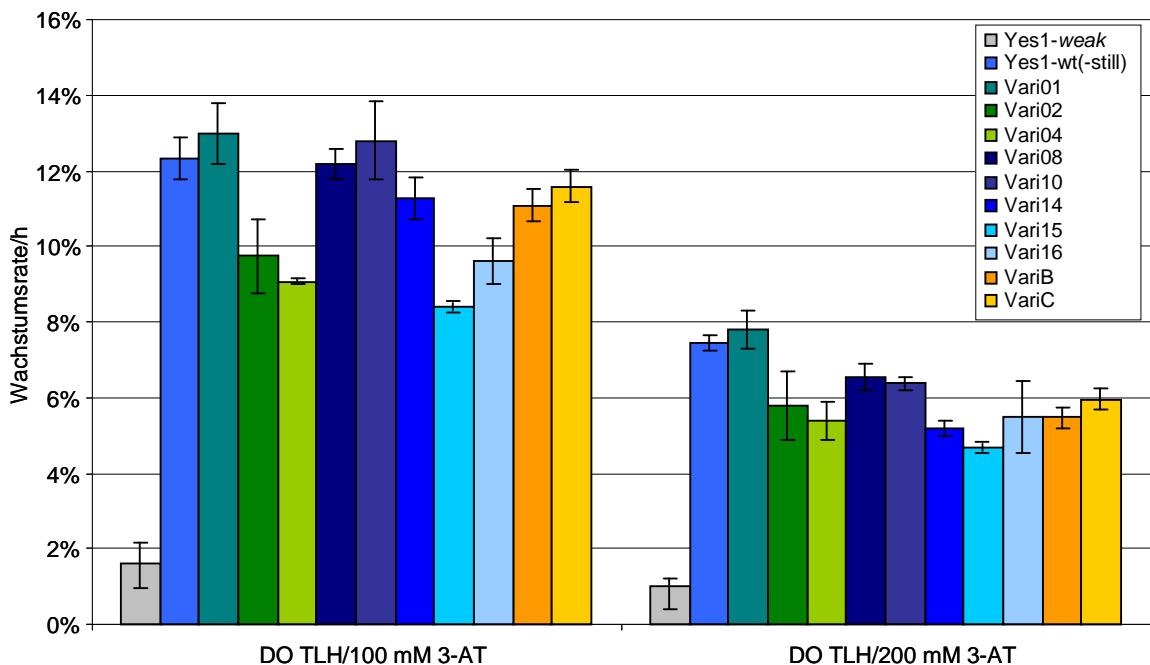


Abb. 44. Interaktionsstärken zwischen Sam68 und neu entstandenen Yes1-Varianten. Y2HGold wurde mit pGBK7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-Yes1-Varianten kotransformiert (2.2.2.3). Yes1-wt und Yes1-weak dienten als Kontrolle. Jeweils drei Einzelklone wurden in DO TrpLeuHis Medium mit 100 bzw. 200 mM 3-AT angeimpft und die Zunahme der Absorption über 48 h gemessen (2.2.2.5). Je höher die Wachstumsraten, desto stärker ist die Protein-Protein-Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-Variante.

Eine mögliche Ursache der Wachstumsunterschiede wäre eine unterschiedlich effiziente Transkription oder Translation der Yes1-Varianten, die sich in der Menge an exprimiertem Y2H Reporter auswirken könnte. In Vorversuchen mit Interaktionspaaren auf *low copy*-Plasmiden wurde bereits die Beobachtung gemacht, dass die Interaktion und damit Wachstumsgeschwindigkeit durchaus schwächer war im Vergleich zu Hefen mit denselben Interaktionspaaren auf *high copy*-Plasmiden. Die in der Hefezelle zur Verfügung stehenden Proteinmengen der Interaktionspartner könnte folglich die limitierende Größe bezüglich Y2H Reporterexpression darstellen; Yes1-ProteinVari01 wäre damit in diesem Fall der begrenzende Faktor. Daraufhin wurden die Proteinmengen mittels *Western Blot* analysiert. Pro Kotransformante wurden drei Klone untersucht, die jeweils in Duplikaten angeimpft wurden. Aus den Hefekulturen der logarithmischen Wachstumsphase wurden Proben gewonnen, gleiche OD₆₀₀-Einheiten aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.5.7, 2.2.5.1). Die Detektion im *Western Blot* richtete sich gegen die Gal4-AD (2.2.5.3), die mit Yes1 fusioniert war. Bei dieser Detektion erschien wie erwartet Gal4AD-HA-Yes1 auf der Höhe von 31 kDa und ein weiteres spezifisches Signal erschien bei ca. 20 kDa. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein C-terminal

verkürztes Produkt. Zur Normalisierung der Proteinmenge wurde ein anti-Cdc28-Antikörper verwendet. Die Signalstärke von Gal4AD-Yes1 (31 kDa) wurde gegen die von Cdc28 abgeglichen. Nach zwei unabhängigen Wiederholungen zeichnete sich deutlich ab, dass die Proteinmenge der neu generierten Yes1-Varianten um ca. 40% niedriger war als die von Yes1-wt-still bzw. Yes1-weak (Scion Image). Folglich stand pro Zelle weniger AD-Yes1 für die Interaktion mit BD-Sam68 zur Verfügung.

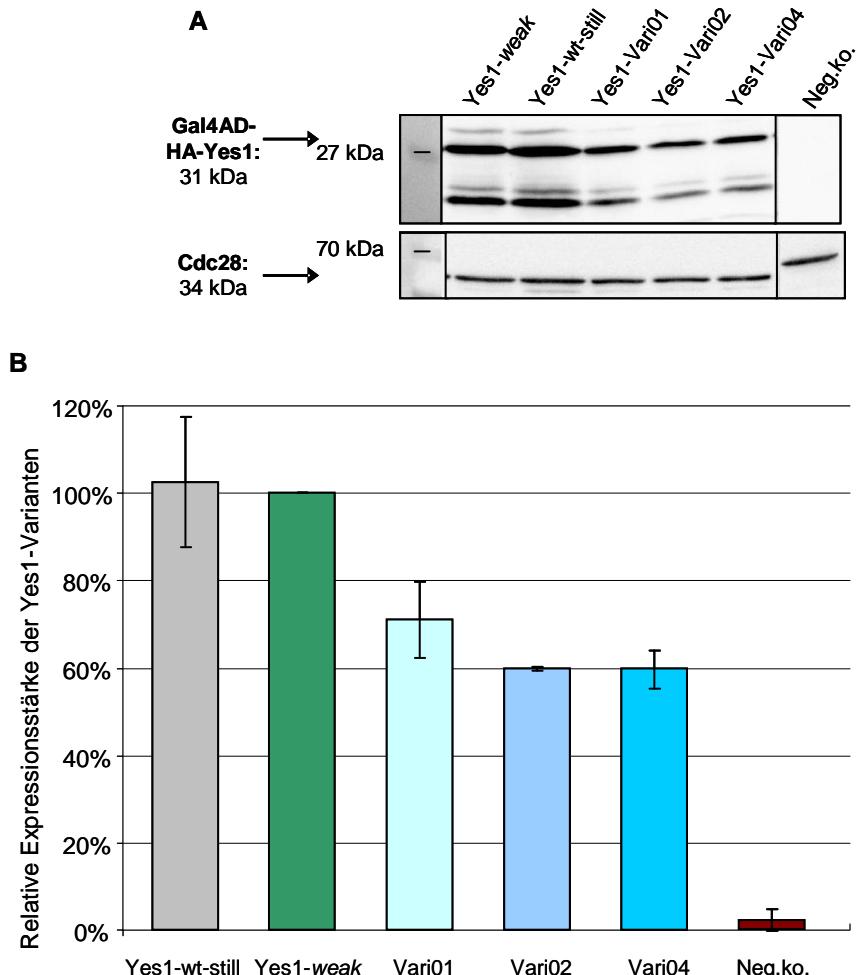


Abb. 45. Expressionsstärke von Yes1-Varianten. **A.** Repräsentativer *Western Blot* zur Bestimmung der Expressionsstärke von Gal4AD-Yes1 mit anti-Gal4AD (1:5.000, oben) und zur Ladungskontrolle Detektion mittels anti-Cdc28 (1:250, unten). Chemilumineszenz-Detektion, Exp. 1 min (2.2.5.3). **B.** Relative Expressionsstärke von Yes1-Varianten aus drei unabhängigen Expressionstests. Proteinmenge von Yes1-wt-still wurde auf 100% gesetzt.

Um die Bindungsaffinität der neuen Yes1-Varianten an Sam68 losgelöst vom Y2H System zu bestimmen, wurde die Dissoziationskonstante mittels ELISA ermittelt. Nach Expression von HN-Sam68 und GST-Yes1 in *E. coli* und Aufreinigung mittels Affinitätstags wurde die Interaktionsstärke mit ansteigenden Mengen an Yes1-ProteinVari01 (Yes1-E205D) im Vergleich zu Yes1-weak und Yes1-wt gemessen (2.2.5.6). Die berechneten Dissoziationskonstanten gehen aus Abb. 46 hervor. Es zeigte sich, dass die neue Variante Yes1-E205D etwa 100-fach besser mit Sam68 interagiert als Yes1-wt. Die Wachstumsraten der Hefen mit Sam68/Yes1-Vari01, -Vari02 und -Vari04 unterschieden sich jedoch merklich voneinander und waren niedriger als die von Hefen mit Sam68/Yes1-wt. Eine

Unterscheidung zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Analysen stellt sicherlich das Expressionssystem dar (4.2.2).

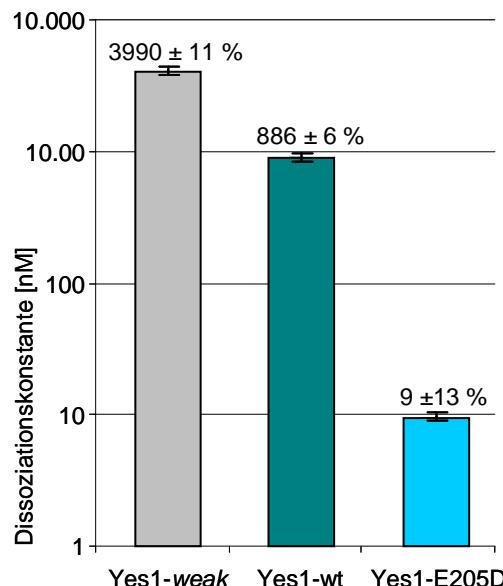


Abb. 46. Logarithmische Darstellung der ermittelten Dissoziationskonstanten zwischen Sam68 und Yes1-Varianten. HN-Sam68 und GST-Yes1-Varianten wurden in *E. coli* exprimiert, nativ aufgereinigt und in einen ELISA eingesetzt (2.2.5.4, 2.2.5.6). Je niedriger die Dissoziationskonstante, desto stärker die Interaktion mit Sam68.

Aus den Analysen der Interaktionspartner lässt sich folgendes zusammenfassen: Yes1-wt-still und die neu entstandene Variante Yes1-E205D interagieren sehr viel besser mit Sam68 als Yes1-weak. Somit wurde zum ersten Mal eine erfolgreiche *in vivo* Evolution bestehend aus Oligonukleotid-vermittelter Mutation und Y2H Selektion durchgeführt. Obwohl im *Western Blot* gezeigt wurde, dass die Proteinmenge der Yes1-Varianten in der Hefezelle geringer ist, reicherten sich Hefen mit Sam68/Yes1-VariX bis zu 88% an, so dass die sehr starke Interaktion den Proteinmangeleffekt teilweise kompensieren kann.

3.4.1.5 Zusammenfassung Oligonukleotid-vermittelte Evolution

- Kulturbedingungen konnten nicht so eingestellt werden, dass Hefewachstum und gleichzeitig die kontinuierliche Aufnahme von Oligonukleotiden aus dem Medium stattfinden kann
- Transformationen von Hefen mit definierten Oligonukleotiden führten zu sequenzspezifischen Einzel- und Mehrfachmutationen in *LEU2optNSM* sowie in *Yes1*
- Transformationen von Hefen mit Oligonukleotid-Bibliotheken generierte *Yes1*-Bibliotheken
- Hefen mit neu entstandenen Yes1-Varianten wurden mittels Y2H System identifiziert
- Neu generierte Yes1-Varianten interagieren mit Sam68 sehr viel besser als das ursprünglich eingesetzte Yes1-weak

Fazit: In *S. cerevisiae* wurde ein sehr sequenzspezifisches Evolutionssystem etabliert, das auf Transformation mit Oligonukleotid-Bibliotheken und Y2H Selektion basiert.

3.4.2 Gerichtete Mutagenese durch *activation-induced cytidine deaminase* (AID)

Die Etablierung eines zweiten DNA-basierten Mutationssystems wird im Folgenden beschrieben. Die zielgerichtete Mutation der *prey*-DNA wird dabei von der *activation-induced cytidine deaminase* (AID, AICD) ausgelöst. Dieses Enzym ist in humanen B-Zellen an der Antikörperreifung beteiligt und wurde an die Expression in *S. cerevisiae* angepasst.

3.4.2.1 Funktion der AID bei der Antikörperreifung in humanen B-Zellen

Genveränderungen sind nicht nur für die natürliche Evolution notwendig, sondern auch zur Regulation physiologischer Prozesse in lebenden Organismen. Die bekannteste Art ist die Rekombination zwischen homologen Bereichen von DNA-Abschnitten. Sie findet häufig während der Meiose aber auch in somatischen Zellen statt (Sonoda *et al.* 1999; Haber 1999).

Eine weitere Art von Veränderung wird als *RNA editing* bezeichnet. Hierbei etablieren sich die Veränderungen nicht dauerhaft im Gen, sondern lediglich auf RNA-Ebene. Die erste entdeckte mRNA die mittels Cytidin nach Uracil-*RNA editing* verändert wurde, war die mRNA des mRNA-*editing* Enzymkomplexes selber: *apoB* (*humane apolipoprotein B*). Durch Desaminierung von Cytidin zu Uracil entstand an Pos. 6666 aus dem Glutamin-Codon CAA das Codon UAA, was zu einem frühzeitigen Stopp in der 14 kb langen mRNA führte (Scott 1989). Zehn Jahre später wurde ein weiteres Mitglied der Cytidin Deaminase-Familie entdeckt: die *activation-induced cytidine deaminase*, kurz AID (Muramatsu *et al.* 1999). Die AS-Sequenzen von AID und APOBEC-1, welches die katalytische Untereinheit des *apoB* mRNA *editing*-Komplexes darstellt, sind zueinander homolog. Beide Proteine sind an Nukleinsäure-Mutationen beteiligt, wobei APOBEC-1 RNA-Veränderungen hervorruft und die AID hingegen dauerhafte DNA-Mutationen verursacht.

Die Aktivität der AID ist natürlicherweise auf humane B-Zellen beschränkt, wo sie maßgeblich an der Antikörperreifung beteiligt ist. Nach Kontakt eines Antigens mit einer B-Zelle bildet sich in den Lymphfollikeln eine hochspezialisierte Mikroumgebung aus, die als Keimzentrum bezeichnet wird. In diesem Keimzentrum findet der letzte Reifungsschritt von B-Zellen zu Antigen-spezifischen Gedächtniszellen oder Plasmazellen statt (Abb. 47). Es ist bekannt, dass in dieser Umgebung die Veränderung der Immunglobulingene erfolgt (Honjo *et al.* 1981; Kraal *et al.* 1985; Jacob *et al.* 1991; Berek *et al.* 1991). Zum einen häufen sich in den Immunglobulingenen zahlreiche Punktmutationen in der variablen Region an (*somatische Hypermutation*, SHM, Neuberger *et al.* 1995); des Weiteren kommt es zur *class switch recombination* (CSR, Lorenz *et al.* 1996), bei der die Exons der konstanten Region der schweren Kette verschoben werden. Mittels *gene conversion* wird die Diversität von Antikörpern, die für eine effektive humorale Immunantwort nötig ist, noch weiter erhöht. Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die AID-Expression in der dunklen Zone des Keimzentrums stark induziert wird (Muramatsu *et al.* 1999; Moldenhauer *et al.* 2006; Cattoretti *et al.* 2006) und AID an den Ereignissen SHM, CSR und *gene conversion* initial beteiligt ist (Muramatsu *et al.* 2000; Arakawa *et al.* 2002; Noia *et al.* 2004).

Mithilfe des Nicht-Immungolublin-Gens GFP (Grün fluoreszierendes Protein) wurde nachgewiesen, dass die Aktivität der AID in B-Zellen nicht auf Immunglobulin-Loci beschränkt ist, sondern generell an stark transkribierte Bereiche gekoppelt ist (Kanayama *et al.* 2006). *In vitro* desaminiert AID als

Monomer einzelsträngige DNAs (Bransteitter *et al.* 2003; Dickerson *et al.* 2003; Brar *et al.* 2008; Shen *et al.* 2009). Nach Expression humaner AID in *E. coli* oder *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Enzym im Genom in stark transkribierten und damit Einzelstrang-DNA Bereichen Cytidine desaminiert und Hypermutationen auslöst (Petersen-Mahrt *et al.* 2002; Mayorov *et al.* 2005; Rogozin *et al.* 2006), und zwar bevorzugt an GYW/WRC-Motiven (W = C, G; R = A, G). Diese Sequenz entspricht dem *hotspot*-Motiv der SHM: RGYW/WRCY (Rogozin *et al.* 1992).

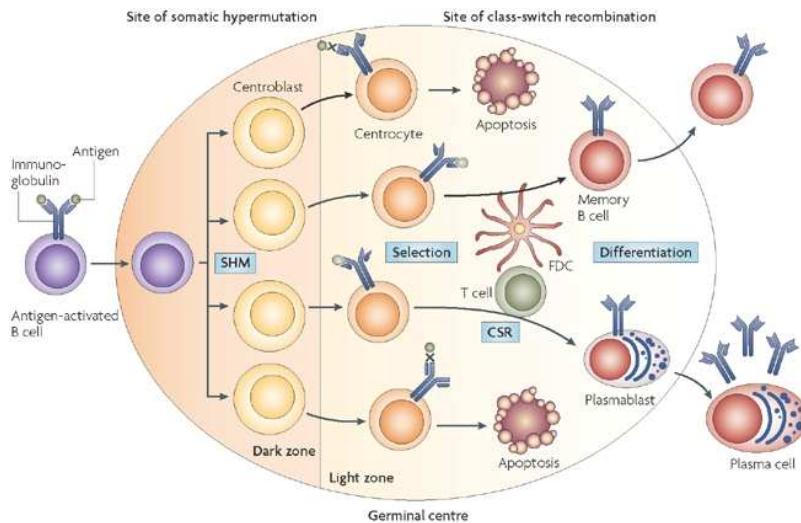


Abb. 47. Reifung von B-Zellen nach Antikörperkontakt. Details siehe Text. Nach Klein *et al.* (2008).

Die AID scheint mutagenes Potential zu besitzen, welches auf stark transkribierte DNA-Regionen konzentriert ist. Außerdem ist sie in der Bäckerhefe funktionell aktiv, benötigt somit keine B-Zell spezifischen Kofaktoren. Deswegen wurde die AID als mutagenes Enzym zur Etablierung eines gerichteten Evolutionssystems verwendet.

3.4.2.2 Prinzip der AID-basierten Mutagenese

Zur Entwicklung eines zielgerichteten Evolutionssystems wurde das mutagene Enzym AID zu einem gerichteten DNA-Mutationssystem ausgebaut. Die Modellvorstellung ist folgende (Abb. 48): die Expressionskassetten von BD-bait und AD-prey werden in die Hefezelle eingebracht. Dabei wird BD-bait von einem schwachen und AD-prey von einem starken Promotor exprimiert. Stark transkribierte Bereiche werden durch die AID mutiert, so dass in diesem Fall bevorzugt AD-prey Varianten auf DNA- und Proteinebene entstehen (rote Markierung, Abb. 48). Je besser die Protein-Protein-Interaktion zwischen bait und prey-Varianten, desto mehr Y2H Reporter (*HIS3*, *Aur1-C*) wird exprimiert und umso besser kann die Hefezelle mit dem guten Interaktionspaar in Selektivmedium wachsen. Durch die kontinuierliche AID-basierte Mutation werden über mehrere Generationen hinweg prey-Varianten erzeugt, die sich an verschiedenen Positionen zum Original-prey unterscheiden und letztendlich zum perfekten Binder evolviert werden. Das beste Protein-Protein-Interaktionspaar setzt sich durch.

Für die Etablierung eines AID-basierten Evolutionssystems mussten folgende Punkte erfüllt werden:

1. Expression einer funktionellen AID aus *H. sapiens* in *S. cerevisiae*
2. Gerichtete Mutagenese der prey-DNA durch die AID
3. Selektion von AID-generierten prey-Varianten über Protein-Protein-Interaktion mittels Y2H System

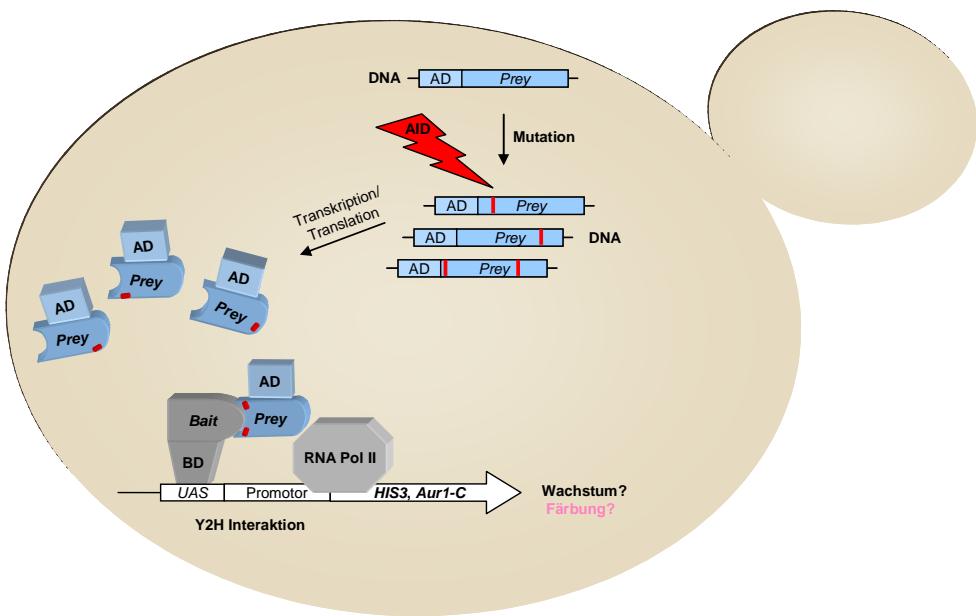


Abb. 48. Kontinuierliches, zielgerichtetes Evolutionssystem bestehend aus AID-basierter Mutagenese und Y2H Selektion. Details siehe Text.

3.4.2.3 Expression und mutagenes Potential humaner AID in *S. cerevisiae*

Die AID mutiert in der Regel stark transkribierte DNA-Bereiche. Dies kann auch essentielle Gene im Hefegenom betreffen. Ist die Mutationsrate in der Hefezelle zu hoch, könnte dies zum Zelltod führen. Die Menge an exprimierter AID in der Hefezelle kann demnach ein kritischer Punkt in dem neu zu etablierenden Mutationssystem sein. Um die Expressionsstärken und damit die Menge an AID zu variieren, wurden verschiedene Promotoren ausgetestet und der Einfluss auf das Wachstum von Hefe analysiert. Die beiden konstitutiven Promotoren von *TEF1* (stark) und *CYC1* (schwach) (Mumberg *et al.* 1995) und der schwache, aber induzierbare *CUP1*-Promotor (Labbé *et al.* 1999) wurden verwendet. Der Vorteil des induzierbaren Promotors wäre, dass die AID-Expression durch Zugabe von Kupfer definiert an- oder abgeschaltet und damit der Zeitraum der Mutationsentstehung gesteuert werden könnte. Zur Expression der humanen AID in Hefe wurde die *codon usage* des Gens auf *S. cerevisiae* angepasst, und mit einem der drei Promotoren und *LEU2*-Terminator in den Y2H Vektor pGK7-BD (Plasmidmarker *TRP1*) kloniert. So entstanden die drei Plasmide pGK7-TEFp-AID, pGK7-CYCp-AID und pGK7-CUPp-AID, die in AH109 eingebracht wurden (2.2.2.3). Transformanten wurden auf DO Trp Agarplatten selektiert. Die Transformanten mit AID-Expressionskassetten wuchsen unabhängig vom Promotor knapp 10% langsamer als die Transformanten mit dem Leerplasmid pGK7-BD. Die AID-Expression wurde mittels anti-flag Antikörper und zwei verschiedenen anti-AID Antikörpern im *Western Blot* analysiert (2.2.5.7, 2.2.5.1, 2.2.5.3), allerdings konnte in keinem Fall AID-Protein detektiert werden. Auch diverse Veränderungen im Protokoll zur Probenherstellung führten nicht zum Nachweis der humanen AID. Zur Kontrolle des ORFs wurde die AID *in vitro* transkribiert und translatiert (2.2.4.1, 2.2.5.10). Diese *in vitro* translatierte AID war im *Western Blot* mit einem AID-spezifischen Antikörper detektierbar (Abb. 49). Somit war gezeigt, dass der ORF des synthetisch hergestellten Gens korrekt ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass das AID-Protein in Hefe modifiziert wurde und dadurch die Immundetektion nicht effektiv stattfand.

Die Promotoren von *TEF1* und *CYC1* wurden bereits erfolgreich zur Expression des Q β -Replikasekomplexes genutzt und deren Expressionsstärke im *Western Blot* klar gezeigt (3.3.3.4). Somit war davon auszugehen, dass die AID zwar exprimiert aber nicht detektiert werden konnte. Des Weiteren wurde ein verlangsamtes Wachstum der AID-Transformanten beobachtet, was die AID-Expression weiter untermauerte. Unabhängig von einem positiven Nachweis im *Western Blot* musste die Aktivität der in Hefe exprimierten AID direkt gezeigt werden.

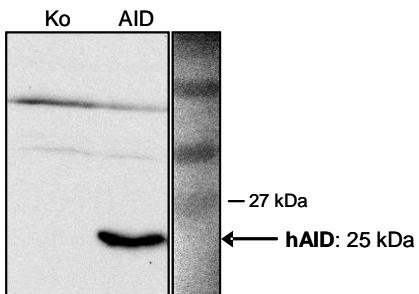


Abb. 49. Expressionsnachweis der AID nach *in vitro* Translation. 20% der RTS-Reaktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.5.10, 2.2.5.1) und die Chemilumineszenz des *Western Blots* (anti-AICD Antikörper, 1:1.000, Abcam) detektiert (Exp. 1 min, 2.2.5.3). Kontrolle: GFP-Expression.

Der hierfür etablierte Aktivitätstest untersuchte die Fähigkeit der AID, Cytosin in stark transkribierten DNA-Regionen zu desaminieren, so dass aus einem G/C-Basenpaar schließlich ein A/T-Basenpaar entsteht. Die Reversion des defekten Reporters *LEU2optNSM* zum funktionellen Gen *LEU2opt* (3.4.1.2.1) diente dabei als Maß für die Aktivität der AID. *LEU2optNSM* besitzt ein defektes Startcodon; nur wenn *ACG* zu *ATG* mutiert wird, kann der Hefeklon auf Leucin-freiem Medium wachsen. *LEU2optNSM* wird von dem starken *ADH1*-Promotor exprimiert, wodurch das stark transkribierte Gen durch die AID zielgerichtet mutiert werden kann. Die Anzahl an generierten *LEU2opt*-Revertanten war ein Maß für die Aktivität der AID in Hefe. Zur Bestimmung der Mutationsrate wurde die Anzahl an Revertanten ins Verhältnis gesetzt zu der Gesamtzellzahl und durch die Anzahl der Generationen und Basenpaare (1,1 kb) geteilt.

Die AID-Aktivität wurde im wt-Hefestamm AH109 und einem neu generierten *UNG1*-Deletionsstamm (AH109ung1 Δ) getestet, basierend auf der Erkenntnis, dass die AID induzierte Mutationsrate in einem *UNG1*-defizienten Hefestamm knapp 200-fach höher war als beim wt-Hefestamm (Mayorov *et al.* 2005). *UNG1* kodiert für die Uracil-DNA-Glykosylase. Dieses Enzym repariert Uracil in der DNA (Sekiguchi *et al.* 1976), welches z. B. durch Desaminierung von Cytosin durch die Einwirkung von AID entstanden ist. Das *UNG1*-Gen von AH109 wurde durch homologe Rekombination einer KanMX^R-Kassette genomisch deletiert (2.2.2.9). Für den AID-Aktivitätstest wurden die Hefestämme AH109 und AH109ung1 Δ mit den AID-Expressionskassetten pGBKT7-TEFp-AID bzw. pGBKT7-CYCp-AID bzw. pGBKT7-CUPp-AID (Plasmidmarker *TRP1*) und dem zu revertierenden Reporter auf pRS313-AL_*LEU2optNSM* (Plasmidmarker *HIS3*) kotransformiert und auf DO TrpHis Agarplatten selektiert. Kotransformanten wurden anschließend 7 Tage lang in DO TrpHis Flüssigmedium kultiviert, wobei die Kultur täglich in frisches Medium überimpft wurde (2.2.2.13). Aliquots der Flüssigkulturen wurden auf DO TrpHisLeu Agarplatten plattierte, wodurch *LEU2opt*-Revertanten identifiziert werden konnten. Die Zahl der *LEU2opt*-Revertanten die durch CYCp-AID bzw. CUPp-AID generiert wurden, war in beiden Hefestämmen vergleichbar mit den spontanen Revertanten der Kontrollen (Leerplasmid pGBKT7-BD).

Hingegen entstanden durch TEFp-AID tausendfach mehr *LEU2opt*-Revertanten gegenüber den Kontrollen, wie aus der logarithmischen Darstellung in Abb. 50 ersichtlich ist. Dies war ein eindeutiger Hinweis darauf, dass TEFp-AID in Hefe hoch aktiv ist.

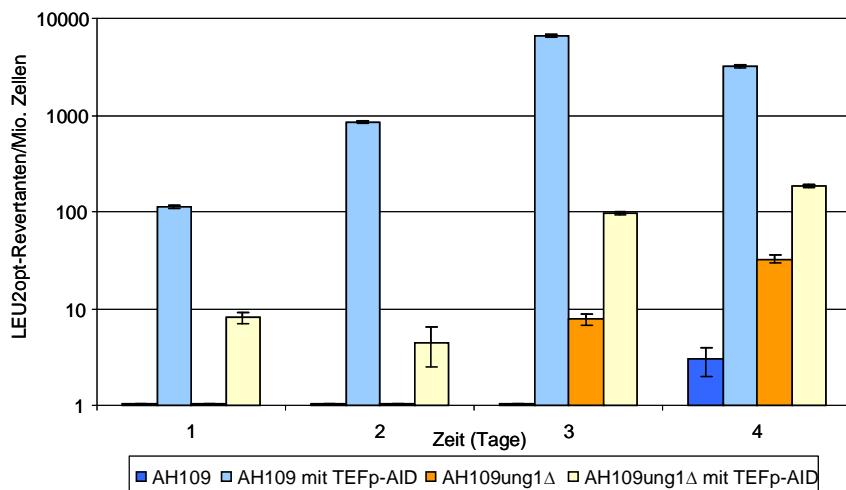


Abb. 50. Logarithmische Darstellung der *LEU2opt*-Revertanten durch Expression von Plasmid-kodierter AID in *S. cerevisiae*. Die Hefestämme AH109 und AH109ung1 Δ wurden mit pRS313-AL_Leu2optNSM und pGBK7-TEFp-AID bzw. Kontrollen mit pGBK7-BD kotransformiert und in DO TrpHis kultiviert. Darin entstanden pro Tag sechs neue Hefe-Generationen. Die generierten *LEU2opt*-Revertanten wurden auf DO TrpHisLeu Agarplatten ermittelt. 10^6 Hefezellen wurden plattiert. Aus drei unabhängigen Versuchen wurden Durchschnittswerte ermittelt.

Mit der Annahme, dass der offene Leserahmen im *LEU2optNSM* Gen durch eine Punktmutation (ACG \rightarrow ATG) wiederhergestellt wurde, wurde aus der Anzahl an Revertanten in Bezug auf die plattierte Gesamtzellzahl und Anzahl an Generationen in Flüssigkultur die Mutationsrate pro Basenpaar und Generation berechnet (2.2.2.13). Tab. 56 zeigt die Mutationsraten, die aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden. Entgegen publizierter Daten (Mayorov *et al.* 2005) lagen die Mutationsraten im Hefestamm AH109ung1 Δ insgesamt unter denen des wt-Hefestamms (4.3.1). Aus den Reversionsexperimenten ging weiterhin hervor, dass die Mutationsrate bei schwacher Expression (CYCp-AID und CUPp-AID) im Bereich der spontanen Mutationsrate lag. Hingegen führte die starke Expression der AID durch die Expressionskassette TEFp-AID-LEU2t im wt-Hefestamm AH109 zu einer 1.000-fachen Steigerung gegenüber der spontanen Mutationsrate. Somit war TEFp-AID in AH109 mit einer Mutationsrate von $4,0 \times 10^{-4}$ am aktivsten. Die Sequenzveränderung in *LEU2optNSM* wurde im Anschluss analysiert.

Tab. 56. Mutationsraten episomaler AID, die durch *LEU2opt*-Reversion ermittelt wurden

	Mutationsrate/bp/Generation	
	AH109	AH109ung1 Δ
TEFp-AID	$4,0 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-6}$
CYCp-AID	$5,8 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$
CUPp-AID	$1,6 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-8}$
Kontrolle	$3,7 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-7}$

Der *LEU2optNSM*-Bereich von 20 Leucin-prototrophen Hefe-Revertanten AH109(TEFp-AID/ADHp-*LEU2optNSM*) wurde nach 1 und 3 Tagen Kultivierung analysiert. Da das *LEU2optNSM*-Gen auf

einem *CEN/ARS*-Plasmid kodiert ist, lagen pro Hefezelle 2 – 3 Kopien vor, wobei eine intakte Genkopie ausreicht, um der Hefezelle Leucin-Prototrophie zu vermitteln. Somit konnten minimal 33% der Plasmide das intakte *LEU2opt*-Gen enthalten und wären durch cPCRs von Hefekolonien nicht nachweisbar. Deshalb wurden die Plasmide aus Hefekolonien isoliert und in *E. coli* vereinzelt (2.2.2.15). Die Sequenzierung von 66 cPCRs von Bakterienklonen (2.2.3.1, 2.2.3.9) ergab, dass 66% der Sequenzen das revertierte Startcodon (ACG → ATG) enthielten und erstaunlicherweise zehn der 44 revertierten Sequenzen an verschiedenen Positionen im Promotorbereich eine weitere Mutation aufwiesen (Abb. 51, Blau). Wahrscheinlich liegt nicht nur der transkribierte Bereich (Transkriptionsstarts des *ADH1*-Promotors zwischen Pos. -61 und -12, Russell *et al.* 1983; Faitar *et al.* 2001), sondern auch die *upstream*-Region einzelsträngig vor, so dass die Mutationen bis Pos. -190 zustande kamen. Da Punktmutationen im Promotorbereich meist keine unmittelbaren Auswirkungen auf das dahinter kodierte Protein haben, sammeln sich diese Mutationen an; zusätzliche Mutationen im ORF von *LEU2opt*, die nur sichtbar wären, wenn sie die Funktionalität von *Leu2opt* nicht zerstören, wurden unter den analysierten Mutanten nicht gefunden.

Auf dem sequenzierten Abschnitt zwischen *ADH1*-Promotor (500 bp) und *LEU2optNSM* (1,1 kb) fanden somit durchschnittlich 1,2 Mutationen statt. Dabei handelte es sich stets um Transitionen von C/G → T/A, was die AID-Aktivität als Mutationsursache untermauert. Die Mutationen fanden sowohl auf dem Sinn- als auch auf dem Nicht-Sinnstrang statt und zwar bevorzugt an WRC-Motiven (4.3.1).

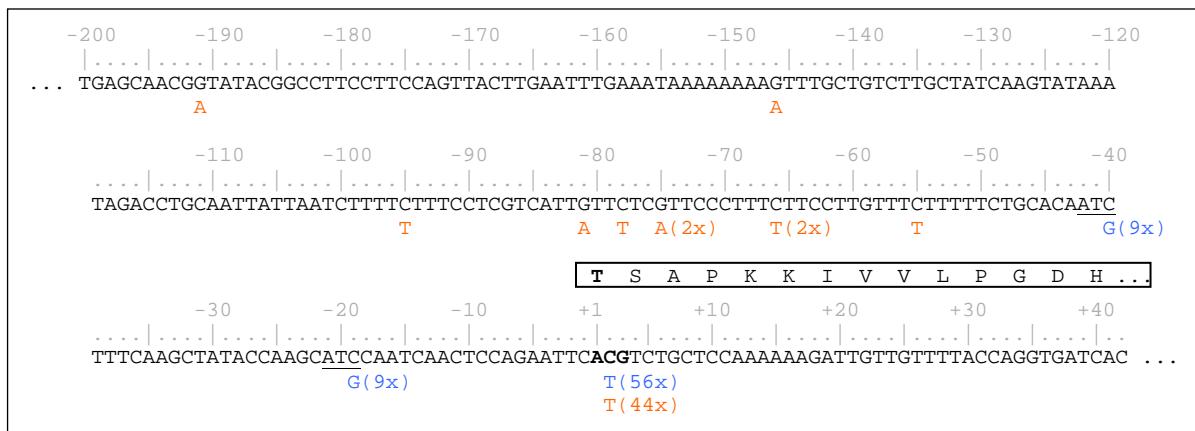


Abb. 51. Punktmutationen in ADHp-LEU2opt ausgelöst durch TEFp-AID. C/G nach T/A-Transitionen durch Desaminierung von Cytosin im Sinnstrang bzw. Nicht-Sinnstrang. Defektes Startcodon ACG (Pos. +1) ist fett gedruckt. Mutationen sind farbig dargestellt. pRS313-AL_LEU2optNSM wurde aus den Revertanten isoliert, in Bakterien vereinzelt und nach Amplifikation ADHp-LEU2optNSM sequenziert (2.2.2.13). **Blau.** Je zehn Revertanten mit AH109-TEFp-AID-LEU2optNSM wurden nach 1 und 3 Tagen in Kultur analysiert. Bei 44 von 66 Sequenzen (66%) war das Startcodon revertiert und in zehn der 44 revertierten Sequenzen wurden zusätzliche Punktmutationen im Promotorbereich bis -191 gefunden. **Orange.** Je 20 Revertanten Y2HGold-AIDint-LEU2optNSM wurden nach 3 und 4 Tagen in Kultur analysiert. Bei 56 der 75 Sequenzen (75%) wurde das defekte Startcodon wiederhergestellt (Pos. +1); bei je neun Sequenzen (12%) wurden alternative Startcodons generiert (unterstrichen).

Anhand der *LEU2opt*-Reversionstests konnte gezeigt werden, dass AID hoch mutagen auf Plasmid-DNA wirkt. Basierend auf TEFp-AID wurde das neu zu etablierende Mutationssystem mit dem Y2H System gekoppelt. Dabei sollte gezielt die *prey*-DNA mutieren werden, um dessen Bindungseigenschaften zu *bait* zu verbessern. AID wirkt bevorzugt an stark transkribierten DNA-Bereichen. In den originalen Y2H Vektoren pGBKT7-BD-*bait* und pGADT7-AD-*prey* besitzen sowohl *bait* als auch

prey einen starken Promotor zur Expression. Um die mutagene Wirkung der AID auf die *bait*-DNA zu verringern, wurde der starke *ADH1*-Promotor zur Expression von *bait* in pGBKT7-BD gegen den schwachen *CYC1*-Promotor ausgetauscht (pGBKT7-CYCp-*bait*). Da auf diesem Plasmid zusätzlich die Expressionskassette der AID sitzt, wird es als pGBKT7-CYCp-*bait*/TEFp-AID bezeichnet (Plasmidmarker *TRP1*). Die *prey*-Y2H Expressionskassette wurde inklusive des starken *ADH1*-Promotors auf das *CEN/ARS*-Plasmid pRS315 kloniert und wird als pRS315-AD-*prey* bezeichnet (Plasmidmarker *LEU2*). Ausgehend von diesen umgestalteten Y2H Plasmiden wurden zur Etablierung eines kontinuierlichen Evolutionssystems unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionspartner getestet. Als Negativkontrolle wurden jeweils die Plasmide pRS315-AD-*prey* und pGBKT7-CYCp-*bait* (ohne AID-Expressionskassette) in die Hefen eingebracht.

Verbesserte Interaktionspartner konnten weder am Modell p53/T-Antigen (3.1.1.1) noch am Sam68/Yes1-weak Modell (3.1.1.2) isoliert werden. Bei Überprüfung der Expressionen von *bait* und *prey* fiel auf, dass bei Koexpression von *bait* und AID ausgehend von eigenen Expressionskassetten, die auf demselben Plasmid kodiert sind, die Menge an *bait*-Protein im *Western Blot* nicht mehr nachweisbar war. Abb. 52 zeigt dieses Phänomen für die Expression von Sam68 durch die Expressionskassetten ADH_p-Sam68 bzw. CYC_p-Sam68. Sam68 besitzt einen N-terminalen cMyc-tag. *Bait*-cMyc Protein konnte nachgewiesen werden, wenn keine AID-Expressionskassette auf dem Plasmid vorhanden war (Spuren 1 und 3, Abb. 52). In beiden Plasmiden (pGBKT7-ADH_p-Sam68/TEFp-AID und pGBKT7-CYC_p-Sam68/TEFp-AID) schien sich die Koexpression der AID negativ auf die Sam68-Expression auszuwirken (Spuren 1/2 und 3/4, Abb. 52). Da für das verwendete Hefesystem keine weiteren Selektionsmarker zur Verfügung standen, wurde die AID-Expressionskassette nicht auf einem separaten Plasmid untergebracht, sondern im Zuge dessen ins Hefegenom integriert.

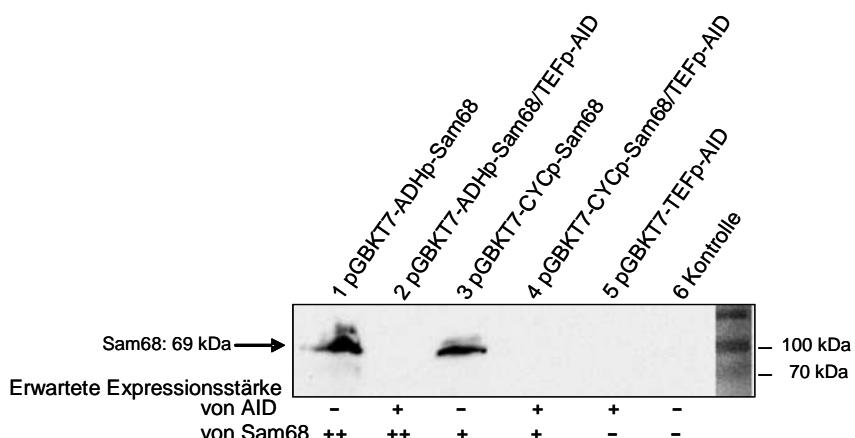


Abb. 52. Expressionsnachweis von cMyc-Sam68 bei Koexpression von AID. Y2HGold wurde mit entsprechenden Plasmiden transformiert. Kontrolle ist untransformierter Hefestamm. Pro Spur wurde Hefelysat von 2×10^7 Zellen aufgetragen und im 4-20% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.1). Der *Western Blot* wurde über Chemilumineszenz detektiert (anti-cMyc Antikörper, 1:250; Exp. 1 min, 2.2.5.3). Ohne Koexpression von AID ist Sam68 über das c-Myc Epitop nachweisbar.

3.4.2.4 Integration der AID-Expressionskassette ins Hefegenom

Mithilfe des integrativen Plasmids pRS305K wurde die TEFp-AID Expressionskassette zusammen mit einer KanMX^R-Expressionskassette über homologe Enden an den *LEU2*-Lokus von Y2HGold rekombiniert (2.2.2.9). Da Y2HGold gegenüber AH109 zusätzlich den *Aur1-C* Reporter zum Auslesen der Y2H Interaktion besitzt, wurde der Einsatz von Y2HGold für die Evolutionsexperimente bevorzugt. Integranten besaßen zur Selektion die KanMX^R-Expressionskassette, so dass sie in Gegenwart von G418 (200 µg/ml) auf Agarplatten wachsen konnten. Im Gegensatz zur Plasmid-kodierten AID beeinflusste die Expression der integrierten AID (AIDint) das Wachstum von Hefen nicht (53% Zuwachsrate/h in YPDA). Zur Bestimmung der Mutationsrate wurde wiederum das Reversionssystem mit *LEU2optNSM* verwendet (3.4.1.2.1).

Der wt-Hefestamm Y2HGold und zwei unabhängige Klone mit integrierter AID (Y2HGold-AIDint1 bzw. -2) wurden mit pRS313-AL_Leu2optNSM (Plasmidmarker *HIS3*) transformiert und auf DO His Agarplatten selektiert. Zur Reversion des *LEU2opt*-Startcodons wurden pro Transformante zwei Klone über 10 Tage in DO His kultiviert und täglich auf DO His_{Leu} Agarplatten plattiert. Die entstandenen *LEU2opt*-Revertanten wurden ausgezählt und die Mutationsraten berechnet (2.2.2.13). Abb. 53 veranschaulicht die Anzahl an entstandenen *LEU2opt*-Revertanten in den beiden AIDint-Stämmen im Vergleich zum wt-Stamm Y2HGold. Es war auffällig, dass die AIDint-Klone untereinander sehr unterschiedliche Mutationsraten aufwiesen (4.3.2). AIDint1/Klon 2 brachte am meisten Revertanten hervor und lag mit der durchschnittlichen Mutationsrate (Tag 4 bis Tag 10) von $5,5 \times 10^{-7}$ 50-fach über der spontanen Mutationsrate von Y2HGold-wt ($1,1 \times 10^{-8}$).

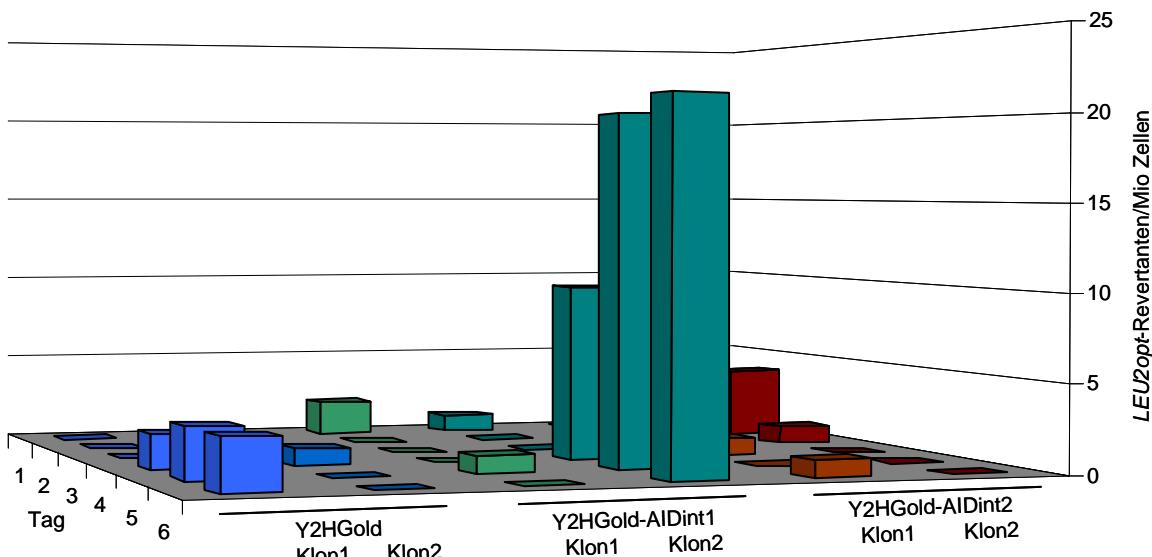


Abb. 53. Anzahl an *LEU2opt*-Revertanten nach Expression von integrierter AID in *S. cerevisiae*. Y2HGold bzw. Y2HGold-AIDint1 und -AIDint2 wurden mit pRS313-AL_Leu2optNSM transformiert und in DO His kultiviert. Pro Tag entstanden sechs neue Hefegenerationen. Resultierende *LEU2opt*-Revertanten wurden auf DO His_{Leu} selektiert. 10^6 Hefezellen wurden plattiert. Zwischen AIDint-Klonen traten Unterschiede in der AID-Aktivität auf.

Nach Tag 3 und 4 wurden jeweils 20 *LEU2opt*-Revertanten des Stammes Y2HGold-AIDint1/Klon 2 analysiert. Dazu wurden Plasmidpräparationen durchgeführt und in *E. coli* vereinzelt (2.2.2.8, 2.2.1.5). Per cPCR von Bakterien wurde der *ADH1*-Promotor und *LEU2opt*-ORF amplifiziert und beidseitig

sequenziert (2.2.3.1, 2.2.3.9). In allen 75 Sequenzen waren revertierte Startcodons enthalten. Die Mutation von ACG zu ATG fand zu 75% am ursprünglichen Startcodon statt (Pos. +1). Im Promotorbereich an Pos. -40 bzw. -19 entstanden in je 12% der Sequenzen alternative Startcodons durch Mutation von C/G zu T/A (Abb. 51, Orange).

In diesem Aktivitätstest konnte gezeigt werden, dass AIDint aktiv ist, auch wenn ihre Mutationsrate im Vergleich zur Plasmid-kodierten AID 1.000-fach niedriger ist (3.4.2.3). Durch das Plasmid pGBK7 liegt die Plasmid-kodierte AID in bis zu 1.000 Kopien in der Hefezelle vor; hingegen existiert nach Integration ins haploide Hefegenom nur eine Kopie der AID-Expressionskassette. Die verringerte Expressionsrate nach genomischer Integration könnte eine mögliche Erklärung für die verminderte Reversionsrate sein. Durch die hoch mutagene Plasmid-kodierte AID konnte jedoch kein Evolutionssystem etabliert werden, was möglicherweise an der Beeinträchtigung der Koexpression von AIDint und Sam68 lag. Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich die AIDint-Klone in ihren Mutationsraten unterscheiden, was durchaus durch die AID-Aktivität hervorgerufen sein kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass kein AIDint-Klon dem anderen gleicht, sondern genetische Veränderungen passieren, die sich nicht immer unmittelbar im Phänotyp zeigen (4.3.2).

3.4.2.5 Erfolgreiche kontinuierliche, zielgerichtete Evolution des Interaktionspaars Sam68/Yes1 durch AID-induzierte Mutagenese in Flüssigkultur

Durch die *LEU2opt*-Reversion konnte gezeigt werden, dass Y2HGold-AIDint mutagen wirkt (3.4.2.4). Das AID-basierte Mutationssystem wurde im Folgenden mit dem Y2H System kombiniert, um dadurch ein besser interagierendes Proteinpaar als das ursprünglich eingesetzte zu generieren und aufgrund der Wachstumsvorteile zu selektieren. Als Modell wurde das Sam68/Yes1-weak System gewählt (3.1.1.2). Dieses Proteinpaar weist eine schwache Protein-Protein-Interaktion auf, die sich in Selektivmedium in langsamem Wachstum widerspiegelt. Aus Yes1-weak sollte durch mindestens eine AID-basierte Punktmutation Yes1-wt entstehen, und zwar durch Wiederherstellung des Tryptophan-Codons TGG aus CGG (Arg). Sam68 interagiert über das WW-Motiv gut mit Yes1-wt und die Hefezelle wächst schneller, kann sich in Flüssigkultur schnell anreichern und bei entsprechender Selektion gegenüber den langsam wachsenden Hefen vollständig durchsetzen (3.1.2). Demnach war dieses Paar für die Etablierung eines kontinuierlichen, zielgerichteten Evolutionssystems geeignet.

Y2HGold-AIDint1/Klon2 wurde mit pGBK7-CYCp-Sam68 (Plasmidmarker *TRP1*) und pRS315-AD-Yes1-weak (Plasmidmarker *LEU2*) kotransformiert und auf DO TrpLeuAde Agarplatten selektiert. Als Kontrolle diente der wt-Hefestamm Y2HGold, der mit pGBK7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-Yes1-weak bzw. und pRS315-AD-Yes1-wt kotransformiert wurde. Da die Protein-Protein-Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-weak relativ schwach ist, wurde der *ADE2* Reporter nicht exprimiert, so dass rosaarbene Hefekolonien wuchsen. Aus diesem schwachen Interaktionspaar sollte durch AIDint ein stark interagierendes Proteinpaar mutiert werden, das durch Expression der Y2H Reporter *HIS3* und *Aur1-C* sowohl in Medium ohne Histidin als auch mit Zusatz von 3-AT bzw. in Anwesenheit von Aureobasidin (AbA) weiße Kolonien bilden kann.

Von den Kotransformanten wurden jeweils drei Klone angeimpft und zunächst 5 Tage lang in DO TrpLeuAde Medium kultiviert (2.2.2.14). Auch ohne Protein-Protein-Interaktion war in diesem Medium das Wachstum möglich und Mutationen durch die AID konnten stattfinden. Aus den evolvierenden Flüssigkulturen (Evo-1 bis 3) wurden 10^6 Hefezellen auf DO TrpLeuAdeHis Agarplatten

plattiert, worauf nur Hefen mit Histidin-Prototrophie wachsen konnten, welche durch den Y2H Reporter *HIS3* vermittelt wird. Hefen, die den zweiten Y2H Reporter *ADE2* exprimierten, bildeten weiße Kolonien aus, andernfalls entstanden rosafarbene Kolonien. So konnte man optisch zwischen Hefen mit echter Protein-Protein-Interaktion (weiß, Abb. 54) und falsch positiven Hefeklonen (rosa) unterscheiden und während des Verlaufs Einzelklone analysieren (2.2.2.15). Aus den Kontrollkulturen mit Y2HGold-Sam68/Yes1-weak (Ko.1 bis 3) sind auf den DO TrpLeuAdeHis Agarplatten nur vereinzelt (0 - 1) Klone gewachsen. Diese waren weiß, zeigten jedoch keine Sequenzveränderungen in Yes1-weak. Aus den Kontrollkulturen Y2HGold-Sam68/Yes1-wt (Ko.4 bis 6, ohne Abb.) wuchs wie erwartet ein weißer Rasen. Aus Kultur AIDint-Sam68/Yes1-weak-3 wuchsen pro Agarplatte bis zu 20 rosafarbene und nur 1 – 2 weiße Histidin-prototrophe Kolonien, in denen keine Mutation von Yes1-weak festgestellt werden konnte, so dass in dieser Kultur die Histidin-Prototrophie durch eine genomische Mutation verursacht worden sein musste. Aus den AIDint-Sam68/Yes1-weak Kulturen Evo-1 und Evo-2 hingegen wuchsen pro einer Million plattierter Zellen zwischen zehn und 20 weißer, Histidin-prototroper Kolonien. Sequenzanalysen von jeweils fünf Klonen bestätigten, dass die Punktmutation von Yes1-weak zu Yes1-wt stattgefunden hat. Wie erwartet war in diesen beiden Kulturen die Y2H Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-wt für die Expression der Y2H Reporter *HIS3* und *ADE2* verantwortlich.

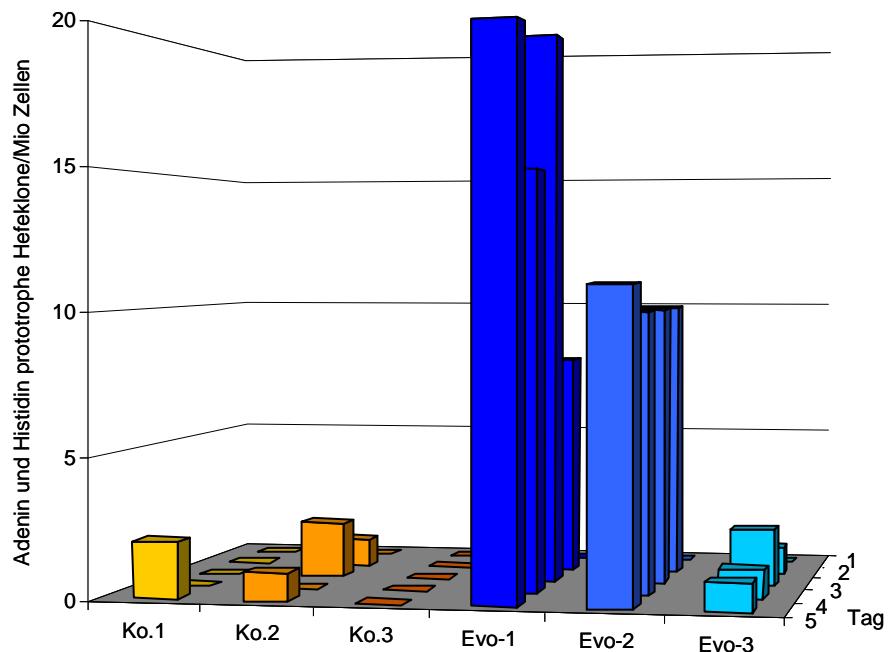


Abb. 54. AID-induzierte Mutation vom schwachen zum starken Binder nach Selektion auf Agarplatten. Y2HGold-AIDint und Y2HGold (Kontrolle) wurden mit pGK77-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-Yes1-weak kotransformiert. Durch Kultivierung in DO TrpLeuAde Flüssigkultur über 5 Tage hinweg konnten in den Kulturen Evo-1 bis Evo-3 AID-induzierte Yes1-Mutanten entstehen, die mit Sam68 besser interagieren können als Yes1-weak. Pro Tag wurden aus der evolvierenden Kultur 10^6 Hefezellen auf DO TrpLeuHisAde plattiert und weiße, Histidin-prototrope Kolonien ausgezählt.

Sowohl die optische Verlaufskontrolle mittels Agarplatten als auch die Sequenzanalysen bestätigten, dass AID in Yes1-weak gezielt Mutationen einfügen kann (Evo-1 und -2). Hefen mit Sam68 und Yes1-Mutanten, bei denen mindestens das WW-Motiv wiederhergestellt sein muss (Yes1-wt), wurden im Anschluss mittels Y2H selektiert. Da die Anzahl an selektierbaren Hefezellen auf Agarplatten begrenzt

ist, wurde generell eine Selektion in Flüssigkultur bevorzugt, so dass die Evolution kontinuierlich über mehrere Generationen hinweg autonom stattfinden kann. Wie in 3.1.2 gezeigt, war es möglich in Flüssigkultur über beschleunigtes Wachstum eine einzige Hefezelle mit guten Bindern unter 10^6 Hefezellen mit schwachen Bindern anzureichern. Bei den evolvierenden Kulturen Evo-1 und -2 waren es zwischen zehn bzw. 20 Hefekolonien mit guten Bindern, die sich gegenüber einer Million Zellen mit schlechten Bindern durchsetzen mussten. Dies sollte erreicht werden, indem die evolvierende Kultur in Medium mit hohem Selektionsdruck kultiviert wird, um große Unterschiede in den Wachstumsraten zu garantieren.

Nach 5 Tagen (= 30 Generationen) Kultivierung in DO TrpLeuAde ohne Selektionsdruck wurden die evolvierenden Kulturen in DO TrpLeuAdeHis überimpft und dadurch Selektionsdruck auf Y2H Interaktion angelegt (2.2.2.14). Hierin können sich Hefen mit schlechten Y2H Bindern zwar langsam aber immer noch teilen, so dass die AID weitere Mutationen in die DNA einfügen kann. Durch den Mangel an Adenin konnte optisch beobachtet werden, wie die Hefekulturen Evo-1 und -2 ihre anfängliche Rosafärbung (Hefen mit schwachen Interaktionspartnern) verloren (Abb. 55), weil aufgrund starker Protein-Protein-Interaktion der *ADE2*-Reporter abgelesen wurde. Die Flüssigkulturen der Kontrollen (Ko.1 bis 3) sowie Evot-3 behielten die Rosafärbung aufgrund fehlender Protein-Protein-Interaktion wie erwartet bei.



Abb. 55. Färbung von Hefekulturen mit schwachen bzw. starken Interaktionspartnern in Adenin-Mangelmedium. Kotransformanten wurden in DO TrpLeuAde üN kultiviert. **Links:** mit schwachem Interaktionspaar Sam68/Yes1-weak wodurch *ADE2* nicht exprimiert wurde und sich rotes Pigment in der Hefezelle akkumulierte. **Rechts:** mit starkem Interaktionspaar Sam68/Yes1-wt.

Die Kulturen wurden an Tag 7 und 8 in DO TrpLeuHis/64 nM AbA überimpft. In diesem stringenten Selektionsmedium konnten nur Hefen wachsen, die den dritten Y2H Reporter *Aur1-C* exprimieren konnten. Die Kontrollen Ko.1 bis 3 (Sam68/Yes1-weak) sowie Evo-3 überlebten in diesem Medium nicht und verhielten sich demnach wie erwartet, da diese Kulturen Hefen ohne starke Protein-Protein-Interaktionspartner beinhalteten.

Der Selektionsdruck in den Flüssigkulturen Evo-1 und -2 wurde zwischen Tag 9 und 11 durch Zusatz von 64 nM AbA und 100 mM 3-AT noch weiter gesteigert. Abb. 56 zeigt den Verlauf der Wachstumsraten der Kulturen Evo-1 und -2 im Vergleich zu den Kontrollen mit reinen Kulturen Sam68/Yes1-weak bzw. Sam68/Yes1-wt ohne AID-Expression. Die Kultur Evo-3, bei der Yes1-weak nicht mutiert wurde, ist aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt. Aus Abb. 56 geht klar hervor, dass sich mit steigendem Selektionsdruck die Wachstumsraten der evolvierenden Kulturen Evo-1 und -2 denen der schnell wachsenden Sam68/Yes1-wt Kulturen angeglichen haben. Dies ließ den Schluss zu, dass Yes1-weak zu einem besseren Sam68-Bindepartner mutiert ist und sich Hefen mit diesem Interaktionspaar gegenüber Hefen mit dem ursprünglich eingesetzten Paar Sam68/Yes1-weak durchgesetzt haben. Die Plasmide der evolvierenden Kulturen wurden analysiert (2.2.2.15). Analog zu

den Einzelklonen auf Agarplatten konnte in den evolvierenden Flüssigkulturen (bis zu 10^9 Hefezellen bzw. 96 Bakterien) die Punktmutation von Yes1-weak zu Yes1-wt nachgewiesen werden. Die ansteigenden prozentualen Anteile zwischen Yes1-weak und Yes1-wt, die durch Sequenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt wurden, sind in Abb. 56 als Tortendiagramme dargestellt. Mit zunehmendem Selektionsdruck reicherten sich Hefen mit dem neu generierten Paar Sam68/Yes1-wt an, bis sie sich schließlich zu 100% in der evolvierenden Kultur durchsetzten.

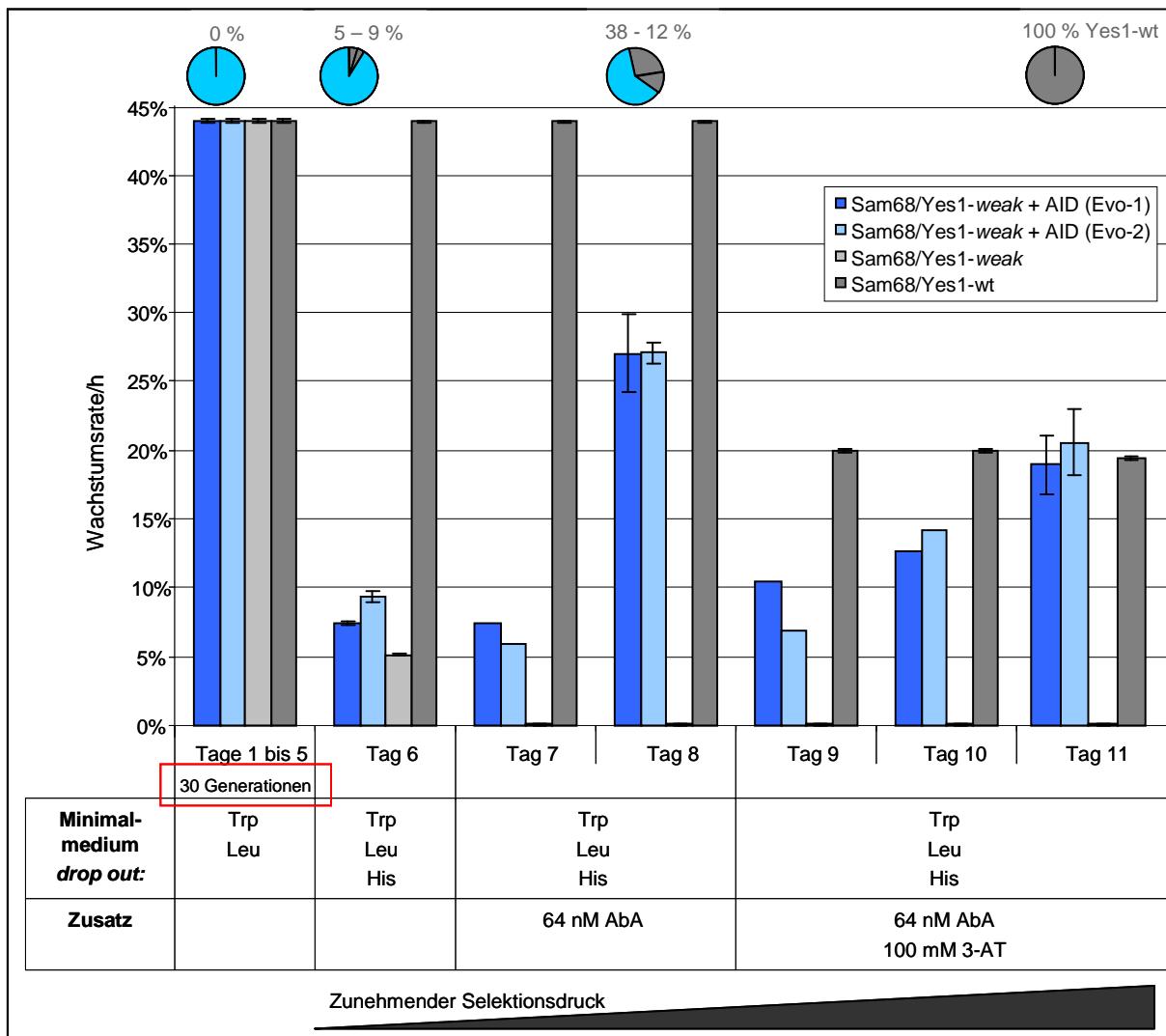


Abb. 56. Kontinuierliche Evolution durch AID-induzierte Mutation von Yes1-weak zu Yes1-wt und Y2H Selektion von Hefen mit Sam68/Yes1-wt aufgrund starker Protein-Protein-Interaktion. Y2HGold-AIDint und Y2HGold (Kontrolle) wurden mit pGK7-CYCp-Sam68 und pRS315-AD-Yes1-weak kcotransformiert (2.2.3). Durch Kultivierung in DO TrpLeuAde Flüssigkultur konnten AID-induzierte Yes1-Mutanten entstehen, die mit Sam68 besser interagieren können als Yes1-weak. Die Wachstumsraten von zwei evolvierenden Kulturen sowie Kontrollen (Y2HGold-Sam68/Yes1-weak bzw. Y2HGold-Sam68/Yes1-wt) sind in Abhängigkeit ihrer Selektionsmedien dargestellt. Die ansteigenden prozentualen Sequenzanteile von Yes1-wt im Vergleich zu Yes1-weak sind als Tortendiagramme dargestellt.

Bei echter Interaktion zwischen Sam68 und Yes1-wt muss im Hefestamm Y2HGold neben *HIS3*, *ADE2* und *Aur1-C* zusätzlich ein vierter Y2H Reporter aktiv sein: *MEL1*. Die Expression von *MEL1* befähigt Hefen, X- α -Gal in Festmedium zu spalten, wodurch sich die Hefezelle blau färbt (3.1.1). Zur Überprüfung der *MEL1*-Expression wurden Aliquots der evolvierenden Flüssigkulturen auf

DO TrpLeuHis/64 nM AbA/X- α -Gal plattierte. Abb. 57 zeigt eindrucksvoll das Wachstum von blauen sowie weißen Kolonien aus den Kulturen Evo-1 und -2, die bereits 3 Tage lang unter milden Selektionsbedingungen selektiert wurden (Tag 8). Bei den weißen Kolonien ist zwar der Reporter *Aur1-C* aber nicht der Reporter *MEL1* aktiv; demnach handelte es sich um falsch positive Klone. Nach stringenter Selektion in Flüssigmedium mit AbA und 3-AT für weitere 3 Tage (Tag 11) wurden die weißen Kolonien verdrängt, so dass wie erwartet nur noch blaue Kolonien, sprich Hefen mit starken Interaktionspartnern wuchsen. Somit war klar erkennbar, dass zur Selektion von echten Interaktionspartnern in Flüssigkultur die Expression von mehr als einem Y2H Reporter überprüft und Selektionsbedingungen entsprechend stringent angelegt werden mussten.

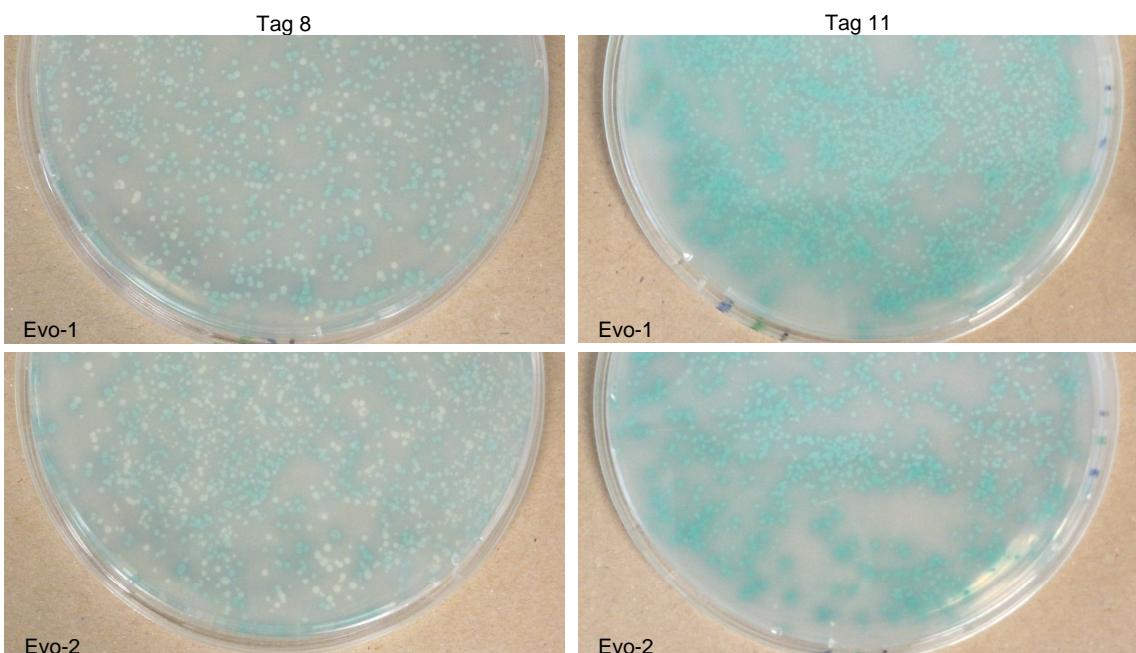


Abb. 57. Selektion der evolvierenden Hefekulturen auf Agarplatten. Die evolvierenden Flüssigkulturen Evo-1 und -2 wurden am Tag 8 und Tag 11 auf Agarplatten DO TrpLeuHis/64 nM AbA/X- α -Gal plattierte. Hefen mit Sam68/Yes1-weak dürften auf diesen Selektionsplatten nicht wachsen; Hefen mit Sam68/Yes1-wt bilden blaue Kolonien aus. Nach Selektion der Flüssigkulturen in DO TrpLeuHis/64 nM AbA, waren an Tag 8 30% der gewachsenen Kolonien blau und 60% weiß. Nach weiterer Selektion der Flüssigkulturen in Selektivmedium mit 64 nM AbA und 100 mM 3-AT wuchsen wie erwartet zu 100% blaue Kolonien. Auf diese Weise wurden Hefen mit echter Protein-Protein-Interaktion zwischen Sam68/Yes1-wt selektiert.

Dieses Evolutionsexperiment der AID-induzierten Mutation von Sam68/Yes1-weak zu Sam68/Yes1-wt mit Koppelung der Y2H Interaktion und Selektion konnte im Anschluss wiederholt werden. Für die Wiederholung wurden dieselben Kotransformanten verwendet, die auch für das erste Experiment benutzt wurden und insgesamt 11 Tage analog zum ersten Versuch kultiviert. Die Wachstumsraten/h der beiden Versuche waren vergleichbar, so dass in Abb. 56 die Mittelwerte mit entsprechenden Abweichungen dargestellt sind.

Zusätzlich wurden die AID-Evolutionsexperimente mit unabhängigen Kotransformanten wiederholt. Die evolvierenden Kulturen wurden 25 Generationen ohne Selektionsdruck inkubiert und auch hier wurden Hefen mit Sam68/Yes1-wt generiert und nach 7 Tagen als schnell wachsende Hefekultur zu

100% angereichert (4.3.3). Abb. 58 stellt die ursprünglich eingesetzte *prey*-Sequenz – Yes1-weak – und die durch AID-Mutagenese resultierende *prey*-Variante – Yes1-wt – vergleichend dar.

Yes1-weak	... R F Q I I N N T E G D R W E A R S I A T G ...
	+580 +590 +600 +610 +620 +630
Yes1-weak
Yes1-weak	CGTTTCCAGATTATCAACAAACACCGAAGGCATCGGTGGAAAGCACGTTCTATTGCCACCGT
Yes1-wt	CGTTTCCAGATTATCAACAAACACCGAAGGCAT T GGTGGAAAGCACGTTCTATTGCCACCGT
Yes1-wt	... R F Q I I N N T E G D W W E A R S I A T G ...

Abb. 58. Punktmutation von Yes1-weak zu Yes1-wt durch AID-induzierte Mutagenese und Anreicherung durch Y2H System. In drei Evolutionsexperimenten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der DNA-Bereich ADhp-AD-Yes1-weak aus Hefen von Agarplatten sowie aus den evolvierenden Flüssigkulturen analysiert (2.2.2.15). Die gelbe Markierung hebt die Cytosin-Desaminierung und den daraus resultierenden AS-Austausch zur Wiederherstellung des WW-Motivs in Yes1-wt hervor.

In diesen Experimenten der kontinuierlichen zielgerichteten Evolution konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in Flüssigkultur in einem AID-exprimierenden Hefestamm aus einem schwachen Y2H Interaktionspaar ein sehr gut bindendes Interaktionspaar generiert und zugleich mithilfe des Y2H Systems unter stringenten Selektionsbedingungen zu 100% angereichert werden konnte, wobei mehrere Y2H Reporter kombiniert wurden (4.3.2). Die Anreicherung von schnell wachsenden Hefen mit starken Interaktionspaaren ließ sich über die ansteigenden Wachstumsraten/h der evolvierenden Kulturen verfolgen. Die Affinitäten der Bindepartner liegen im µmolaren Bereich und wurden durch die AID-Mutagenese um das 4,5-fache verbessert (Yes1-weak: 4,0 µM; Yes1-wt: 0,9 µM, 3.4.1.4.3).

3.4.2.6 Zusammenfassung AID-basierte kontinuierliche Evolution

- humane AID wird in *S. cerevisiae* funktionell exprimiert
- episomal exprimierte AID wirkt mit einer Mutationsrate von $4,0 \times 10^{-4}$ hoch mutagen
- Mutationsrate der integrierten AID von $5,5 \times 10^{-7}$ liegt 50-fach über der spontanen Mutationsrate
- aus dem schwachen Interaktionspaar Sam68/Yes1-weak wurde durch genomisch integrierte AID das starke Interaktionspaar Sam68/Yes1-wt generiert und in Flüssigkultur mittels Y2H System zu 100% selektiert

Fazit: Basierend auf der mutagenen AID wurde erstmals ein autonomes kontinuierliches Evolutionssystem zur Verbesserung der Protein-Protein-Interaktion in *S. cerevisiae* etabliert!

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, ein Mutagenesesystem mit dem Y2H System zeitlich und räumlich zu koppeln, um Affinitäten von Protein-Protein-Interaktionspartnern zu verbessern. Am Beispiel der ungerichteten EMS-Mutagenese (3.2.2) wurde anschaulich dargelegt, dass zur gezielten Verbesserung von Proteinaffinitäten gerichtete Mutagenesesysteme deutlich von Vorteil sind. Aus diesem Grund wurde die Etablierung von *prey*-spezifischen Evolutionssystemen vorangetrieben, wobei DNA- und RNA-basierte Methoden ausgetestet wurden (Tab. 57).

Tab. 57. Übersicht der bearbeiteten Mutagenesesysteme und aktuelle Anwendbarkeit im kontinuierlichen, zielgerichteten Evolutionssystem

Mutagenese	Vorteile	Meilensteine	Erreicht	Aktuelle Anwendbarkeit
RNA-Replikon (Hefeviren, Qβ)	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Fehlerrate • sequenzspezifisch • kostengünstige Variantengenerierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression funktioneller Replikasen (autolog/heterolog) in <i>S. cerevisiae</i> • spezifische Bindung des <i>templates</i> • <i>template</i>-Amplifikation durch Replikase • Verknüpfung mit Hefe-Translationssystem 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ (p91/p104, Qβ) ✓ (Qβ) ✓ (Qβ <i>in vitro</i>) -- 	nein
Oligonukleotid-Bibliotheken	<ul style="list-style-type: none"> • definierbare Mutationsrate • äußerst sequenzspezifisch 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>prey</i>-spezifische Mutagenese • kontinuierliche Oligonukleotid-Aufnahme 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ -- 	(ja)*
AID	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Mutationsrate • zielgerichtet • kostengünstige Variantengenerierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression funktioneller AID in <i>S. c.</i> • <i>prey</i>-spezifische Mutagenese • Steigerung der Mutationsrate • Optimierung der Zielgen-Spezifität 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ✓ -- -- 	ja

*Kontinuität mittels aufeinanderfolgender Transformationen

4.1 Replikase-basierte Mutagenese

Das Genom eines RNA-Virus wird durch eine Replikase mit einer hohen Fehlerrate schnell und ohne DNA-Zwischenstufen repliziert. Die hohe Variabilität ermöglicht eine schnelle Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen. Das besser angepasste Virus überlebt und setzt sich durch. In Anlehnung an die biologische Evolution von Viren wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Etablierung von Replikase-basierten Evolutionssystemen begonnen.

4.1.1 Anforderungen zur Etablierung eines Hefeviren-Replikons

Zur Herstellung von Virus-spezifischen templates, wurde das Reportergen LEU2opt mit unterschiedlich langen 20S- bzw. 23S-Virussequenzen flankiert (3.3.1). Beim Reporterassay in Hefe basierend auf Hefewachstum in Leucin-freiem Medium zeigte sich deutlich, dass die Proteinexpression teils durch die fusionierte Virussequenz am 5' Ende negativ beeinträchtigt wurde. Da von allen Konstrukten mRNA nachgewiesen werden konnte, unabhängig davon ob sie Leucin-Prototrophie vermittelten oder nicht (3.3.1), liegt die Vermutung nahe, dass die Translation gestört wurde. LEU2opt-templates mit spezifischen Virusenden, die in funktionellem Leu2opt resultierten (Tab. 45, 3.3.1), wurden auf Vektoren ohne Hefe-ori umkloniert und Hefen mit konstitutiv

exprimierender Replikase (p91 bzw. p104) transformiert. Jedoch blieb die autonome Replikation bzw. Translation in funktionelles Leu2opt in diesem System aus. Durch footprint-Analysen der Virusgenome ist bekannt, dass im RNA-Replikon die Mitte und das 5' und 3' Ende in räumliche Nähe kommen. Dieser Komplex wird durch die Replikase stabilisiert (Fujimura *et al.* 2007). Austausche einzelner AS an bedeutenden Positionen verhindern die Komplexbildung bzw. Replikation des Virusgenoms (Esteban *et al.* 2005; Fujimura *et al.* 2007). Bei 20S liegt das Startcodon in der ersten Stammstruktur (Abb. 59); die zweite Stammstruktur ist für eine erfolgreiche Replikation ebenso erforderlich. Somit scheint die Sekundärstruktur des Virusgenoms am 5' Ende im Hinblick auf Schutz und Replikation durch natürliche Evolution optimiert zu sein und dient zudem als Art IRES der Translationsinitiation (Esteban 2004). Deshalb ist es denkbar, dass verkürzte Virussequenzen eine unnatürliche Sekundärstruktur ausbilden, wodurch der LEU2opt-Translationsstart verhindert oder aber die Progressivität des Ribosomenkomplexes (durch die fest gebundene Replikase) behindert wird.

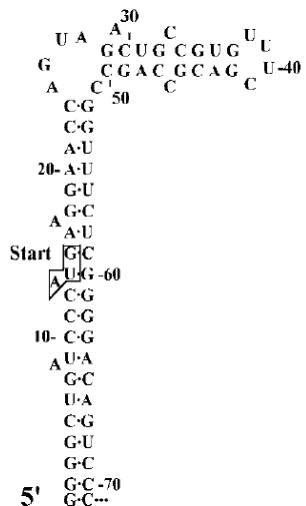


Abb. 59. Vorhergesagte Sekundärstruktur des 5' Endes von 20S.
Das Initiations-Startcodon zur Translation von p91 ist markiert. Nach Esteban *et al.* (2008).

Eine weitere Ursache für die fehlende Etablierung des Hefeviren-Replikons könnte die mangelnde Stabilität der Reporter-RNA in der Hefezelle darstellen. Wie die meisten Virus-RNAs besitzt auch die RNA des 20S und 23S Genoms weder ein 5' Cap noch PolyA am 3' Ende (Fujimura *et al.* 2004), so dass die Replikate mRNA-Abbauprodukten ähneln, welche in der Regel durch den Exosomen-Komplex abgebaut werden (Jacobson *et al.* 1996; Wilusz *et al.* 2001). Durch den Kontakt der Replikasen mit der eigenen RNA wird die RNA stabilisiert und vor Abbau geschützt und zudem die Replikation des eignen Virusgenoms im Hefezytoplasma unter einer Vielzahl an Wirts-RNA gesichert. Durch den Austausch des Replikase-ORFs gegen *LEU2opt* bzw. die Modifizierung von *LEU2opt* mit Virussequenzanteilen (3.3.1) wird die RNA möglicherweise intrazellulär schneller abgebaut, da der optimale Schutz nicht gegeben ist, falls beispielsweise die Ausbildung der Sekundärstruktur oder die Bindung der Replikase nicht optimal abläuft. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch Sekundärstrukturveränderungen keine oder keine effiziente Replikation stattfindet. Aufgrund der Beobachtungen ist nicht auszuschließen, dass in den Hefeviren Replikation und Translation gekoppelt ablaufen, und diese Prozesse durch Veränderung der Virus-*templates* teilweise gestört werden.

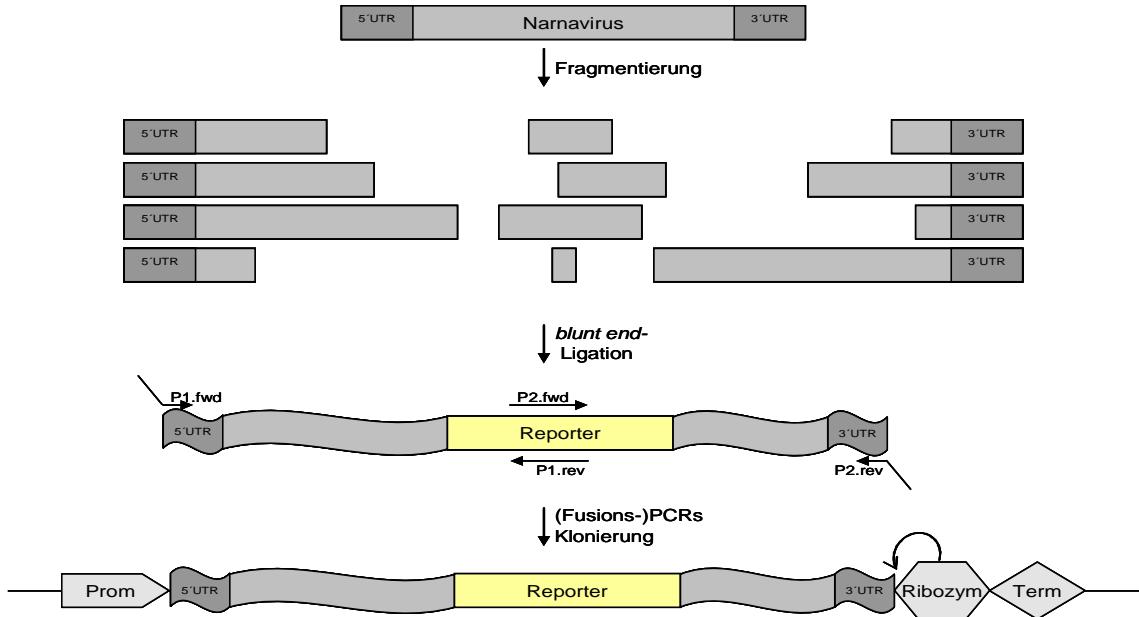


Abb. 60. Directed evolution-Ansatz zur Generierung von Reporter-templates, die optimal für Replikation sind und zugleich Funktionalität des Reporters gewährleisten. Details siehe Text.

Bei dem derzeitigen Wissensstand ist es schwierig, die Enden des Reporters *in silico* so anzupassen, dass die Reporter-RNA im Hefeorganismus durch Hefevirus-Replikasen zuverlässig repliziert und funktionell translatiert wird. Die Erstellung einer Genbibliothek im Rahmen eines *directed evolution*-Ansatzes ist ein möglicher Versuch, um *in vivo* Strukturen zu selektieren, die sowohl zur erfolgreichen Replikation als auch Translation von virusfremden *templates* wie *LEU2opt* genutzt werden können. Die Durchführung könnte folgendermaßen ablaufen (Abb. 60): unterschiedlich lange Virusenden, die beispielsweise durch Ultraschall-Fragmentierung von Virus-cDNA generiert werden, werden in zufälliger Kombination 5' und 3' an einen Testreporter wie *LEU2opt* ligiert. Da mindestens die *inverted repeats* (GGGC/GCCCC) der Virussequenz vorhanden sein müssen, um Replikation zu garantieren, werden aus den ligierten *LEU2opt*-Konstrukten über PCR mit Virusenden-spezifischen Primern (incl. Schnittstellen) diejenigen amplifiziert, die mindestens die *inverted repeats* aufweisen. Aus einer großen Anzahl an möglichen Kombinationen könnten so Reporterkonstrukte entstehen, die replikationsfähig sind und zugleich Leucin-Prototrophie vermitteln. Diese *LEU2opt*-Virusenden-Genbibliothek wird über die angefügten Schnittstellen zwischen Promotor und Ribozym/Terminator kloniert. Die Expressionskassetten dieser Konstrukte wird im Anschluss über Plasmide ohne Hefe-ori in Hefen mit konstitutiv exprimierender Virus-Replikase (p91 bzw. p104) eingebracht und dort selektiert. Hefeklone, die auf Leucin-freiem Medium wachsen, würden ein RNA-*template* in sich tragen, das die idealen Virusenden für *LEU2opt*-Expression und Replikation besitzt.

4.1.2 Bedingungen zur Etablierung eines Q β -Replikons in Hefe

Der Q β -Replikasekomplex wurde hier zum ersten Mal in Hefe funktionell exprimiert. Der Testreporter *LEU2opt*, flankiert mit RQ135-Enden, wurde als Q β -spezifisches *template* verwendet. Nach Inkubation der *in vitro* Reaktionen länger als 2 h mit *template* und aus *E. coli* oder Hefe isolierter Q β -Replikase – ohne Selektionsdruck auf Vollständigkeit des ORFs – wurden verkürzte RNAs gebildet bzw. ohne exogenem *template* kurze RNAs (100 - 300 Nukleotide) generiert (3.3.3.5). Die gleichen

Beobachtungen machten Wissenschaftler in *in vitro* Evolutionsexperimenten mit Q β -*E. coli* als sie der Frage nachgingen „*What will happen to the RNA molecules if the only demand made on them is the Biblical injunction, multiply, with the biological proviso that they do so as rapidly as possible?*“ (Kacian *et al.* 1972). Durch Amplifikation der genomischen Q β -RNA bestehend aus ursprünglich 3.600 Nukleotiden reduzierte die Q β -Replikase das eigene Genom um 83% auf die Größe von 218 Nukleotiden („kleines Spiegelman-Monster“; Mills *et al.* 1967; Kacian *et al.* 1972). Da bei diesen Evolutionsexperimenten kein Selektionsdruck bezüglich Funktionalität der Q β -ORFs angelegt wurde, verkürzte sich die Genom-RNA in Richtung schnelle Replikation durch Veränderung der Nukleotidsequenz. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass Q β -*E. coli* ohne Zugabe von exogenem *template* – *de novo* – kleine RNAs synthetisiert (Sumper *et al.* 1975). Auf diese Weise entstand eine 114 nt (*microvariant RNA*) bzw. 135 nt (RQ135) kurze RNA-Sequenz (Mills *et al.* 1975; Munishkin *et al.* 1991). Durch diese Phänomene der *de novo* Synthese bzw. *template*-Verkürzung wurden optimierte künstliche Q β -*templates* generiert, die zum Flankieren von Q β -fremder RNA verwendet werden. Diese identifizierten kurzen RNA-Moleküle gleichen sich bis auf die GGG/CCC-Enden nicht in ihrer Nukleotidsequenz, besitzen jedoch alle eine ausgeprägte Sekundärstruktur, welche für die Q β -Strangerkennung und Amplifikationseffizienz von entscheidender Bedeutung zu sein scheint.

In dieser Arbeit wurde Q β -Hefe nativ aus Hefelysat aufgereinigt. In *in vitro* Reaktionen vermehrten sich – ohne Zugabe von *template* – bevorzugt 18S und 25S rRNAs, die vermutlich mit dem Replikasekomplex aufgereinigt wurden. Q β -Hefe scheint demnach ribosomale Hefe-RNA zu binden, die ebenfalls durch eine starke Sekundärstruktur geprägt ist. Die Bindung von LEU2opt-RQ135 *template* in Hefe konnte nicht nachgewiesen werden, was mutmaßen lässt, dass es durch den Q β -Komplex *in vivo* nicht gebunden wird oder dass die Q β -Replikase in der Fülle an zellulären RNAs (85% rRNAs, Waldron *et al.* 1975) das speziell gestaltete *template* nicht mit genügend hoher Wahrscheinlichkeit findet. Der genaue Mechanismus der Q β -Strangerkennung in *E. coli* ist bislang nicht geklärt. In mehreren *in vitro* Versuchen wurde jedoch dargelegt, dass die GTP- und Mn²⁺-Konzentration bezüglich *template*-Spezifität eine entscheidende Rolle spielen (Blumenthal 1980; Nakaishi *et al.* 2002). Diese Bedingungen konnten *in vitro* sehr gut eingestellt werden (3.3.3.3). Es ist vorstellbar, dass in Hefe nicht die optimalen Bedingungen für eine erfolgreiche/effiziente Replikation des Q β -spezifisch gestalteten *templates* herrschen. In einem Kaninchenretikulozyten-zellfreiem System wurde genomische Q β -RNA translatiert und zugleich autokatalytisch repliziert (Fukano *et al.* 2002). Da es sich auch hier um eukaryontisches Milieu handelt, erscheint es prinzipiell möglich, außerhalb von *E. coli* ein Replikon zu etablieren. Allerdings ist dies in eukaryontischen Zellen bislang noch nicht gelungen.

Im Gegensatz zum bakteriellen Wirt besitzt Hefe eine Zellkompartimentierung: Zellkern und Zytoplasma sind getrennt. In der Theorie sollte die Q β -Replikation im Zytoplasma der Hefezelle ablaufen, analog zur Replikation von Hefeviren; diese agieren ausschließlich im Hefelysat (Solórzano *et al.* 2000). Q β -Replikate werden natürlicherweise in *E. coli* nicht posttranskriptional modifiziert (5' Cap oder polyadenyliertes 3' Ende). Viren in Eukaryonten wie beispielsweise das Influenzavirus (RNA-Virus), verschaffen sich das 5' Cap von zellulären mRNAs und übertragen es auf die

viruseigene RNA; ausgelöst durch die intrinsische Endonukleaseaktivität der Replikase werden einige Basen des 5' Endes abgespalten und als Primer zur RNA-Synthese benutzt (Rao *et al.* 2003). Die Erkenntnis, dass die Hefeviren-RNA kein 5' Cap besitzt, scheint jedoch gesichert (Fujimura *et al.* 2004). Folglich besteht im Hefe-Replikationssystem nicht zwingend die Notwendigkeit modifizierter 5' Enden. Dennoch ist bekannt, dass polyadenyierte RNAs mit 5' Cap bis zu 25-fach höhere Translationseffizienzen aufweisen als ungeschützte RNAs (Russell *et al.* 1991; Everett *et al.* 1992). Um die Translationseffizienz der Q β -*templates* in Hefe zu erhöhen, wurden die mutmaßlich fehlenden Modifikationen künstlich angefügt, indem bereits in das RNA-*template* eine IRES- und PolyA-Sequenz integriert wurde. Verschiedenste Variationen führten jedoch nicht zur erfolgreichen Etablierung eines Q β -Replikons in Hefe.

Der Reporter mit Q β -spezifischen Enden wurde bevorzugt auf einem nicht-replizierenden Plasmid (pSc) in die Hefezelle eingeschleust (3.3.3.6). Dieses Plasmid wird nach der Zellteilung nicht an die Tochterzelle weitergegeben, lediglich RNA-Transkripte des Reporters. Es ist nicht auszuschließen, dass die Menge an ssRNA-*template* in der Hefezelle zu gering ist, um in einer begrenzten Zeit von der Q β -Replikase gebunden zu werden. Zur Erhöhung der RNA-Menge wäre eine mögliche Vorgehensweise, den Reporter relativ zum Promotor in *reverse*-Orientierung auf ein replizierendes Plasmid zu klonieren. Der Reporter würde durch die Hefezell-Maschinerie transkribiert, das Reporter-Protein wäre aber erst funktionell, nachdem die RNA durch Q β repliziert wurde, da der Minusstrang den Reporter-ORF kodiert.

Die *template*-Optimierung für die Replikation durch die Hefeviren-Replikasen p91 bzw. p104 oder den Q β -Replikasekomplex wurde nicht weiter verfolgt, da sich die DNA-basierten Mutationssysteme besser handhaben ließen und somit deren erfolgreiche Einbindung in ein Evolutionssystem vorangetrieben wurde.

4.2 Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese und Y2H Selektion

4.2.1 Vergleich zwischen theoretischem und praktischem Verlauf der Hefeselektion

In den Experimenten zur Yes1-Mutagenese mittels Oligonukleotid-Transformation wurde Y2HGold-Sam68/Yes1-weak mit dem *dirty bottle*-Oligonukleotidpaar Yes1-weak_dirty.fwd/rev transformiert (3.4.1.4.2). Durch Einbau von Oligonukleotiden zur Wiederherstellung des WW-Motivs und Einfügen weiterer Basenaustausche entstanden Yes1-Varianten. Die nach 11 Tagen angereicherten Hefen mit Sam68/Yes1-VariX zeigten aufgrund verbesserter Proteinaffinität gegenüber Sam68/Yes1-weak deutlich schnelleres Wachstum in Selektivmedium (Tab. 58) und setzten sich schließlich zu 100% in der Flüssigkultur durch.

Tab. 58. Wachstumsraten von Y2HGold mit starken bzw. schwachen Interaktionspaaren

Y2HGold -	Durchschnittliche Wachstumsrate/h in Selektivmedium		
	DO TrpLeuHis	DO TrpLeuHis mit 100 mM 3-AT	DO TrpLeuHis mit 200 mM 3-AT
Sam68/Yes1-weak	5%	1%	1%
Sam68/Yes1-wt-(still)	50%	13%	4%
Sam68/Yes1-VariX	48-34%	13-8%	8-5%

Der experimentelle Verlauf der ersten Oligonukleotid-Transformation, dem Oligonukleotid-Einbau in Yes1-weak sowie der anschließenden Selektion von Hefemutanten in Flüssigkultur und auf Selektionsplatten wurden im Vergleich zum theoretischen Verlauf analysiert. Dazu wurden die Wachstumsraten pro Tag berechnet bzw. die Anteile von weißen zu rosafarbenen Kolonien auf DO TrpLeuAde Agarplatten als Maß für den Anteil an guten und schlechten Bindern bestimmt. Abb. 61 zeigt die praktische und theoretische Entwicklung der Oligonukleotid-transformierten Hefekultur V1 (3.4.1.4.2) über 7 Tage hinweg.

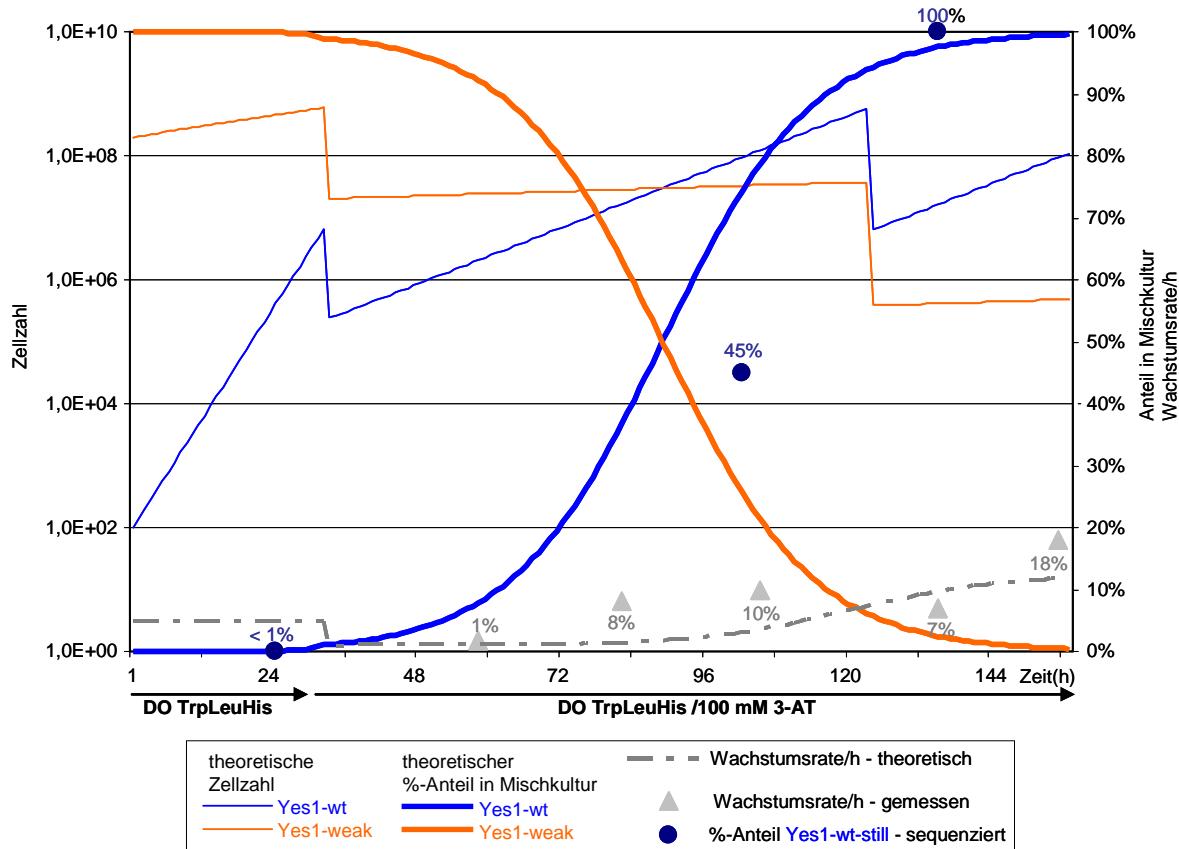


Abb. 61. Theoretische und praktische Entwicklung der Oligonukleotid-transformierten Hefekultur in Selektionsmedium. Y2HGold-Sam68/Yes1-weak wurde mit dem *dirty bottle*-Oligonukleotid Yes1-weak_dirty.fwd/rev transformiert und 32 h in DO TrpLeuHis und im Anschluss in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT Flüssigmedium selektiert. Darin haben schnell wachsende Hefeklone mit Sam68/Yes1-wt(-still) einen Wachstumsvorteil. Die dünnen Linien (orange, blau) zeigen die Zunahme der Zellzahl von schnell (blau, 50% bzw. 13% Zuwachs/h) und langsam (orange, 5% bzw. 1% Zuwachs/h) wachsenden Klonen. Knicke in den Kurven verdeutlichen das Überimpfen der Kultur vor Erreichen der stationären Phase im Verhältnis 1:30 nach 32 h bzw. 1:100 nach 122 h. Die resultierende Wachstumsrate/h der Kultur mit schnell und langsam wachsenden Hefeklonen ist in grauer Strichlinie dargestellt. Die dicken Linien (orange, blau) geben den theoretischen prozentualen Anteil von Yes1-wt und Yes1-weak in der Hefekultur wider. Nach 100 h unter selektiven Wachstumsbedingungen wurden in der Gesamtkultur zu 45% und nach 133 h zu 100% Yes1-wt-still-Varianten identifiziert. Somit setzten sich nach Einbau von Oligonukleotiden Hefen mit dem gut interagierenden Paar Sam68/Yes1-wt-still gegenüber dem schwachen Interaktionspaar Sam68/Yes1-weak durch.

5×10^7 Hefezellen wurden mit 2×10^{15} Oligonukleotid-Molekülen transformiert. Bei einer Einbaurate von 10^{-6} (3.4.1.2.1) entstehen nach einem Replikationszyklus 100 Hefezellen, die ein Oligonukleotid in die DNA eingebaut haben. Da mit Einbau jeden Oligonukleotids das WW-Motiv in Yes1-weak repariert wird, liegt der theoretischen Berechnung zugrunde, dass Hefen mit neu entstandenen Yes1-Varianten

(Yes1-VariX) im Durchschnitt so schnell wachsen wie Hefen mit Yes1-wt. So sollten sich nach 32 h Selektion die 100 schnell wachsenden Hefen unter 10^6 langsam wachsenden Hefen zu 1% und nach 100 h zu 73% angereichert haben. Nach 154 h sollten nur noch Hefen mit Sam68/Yes1-VariX vorhanden sein. In der Praxis wurde der Anteil an guten Bindern durch Plattieren auf DO TrpLeuAde bestimmt (Abb. 39); Hefeklone mit guten Interaktionspartnern blieben weiß, während sich Kolonien mit schwachen Interaktionspartnern rosa färbten (3.1.1). Der Anteil an weißen Kolonien stieg von < 1% nach 24 h auf knapp 50% nach 100 h. Nach 144 h hatten sich die weißen Kolonien, also Hefen mit guten Interaktionspartnern, bereits zu 100% durchgesetzt. Damit entwickelte sich der Anteil an Hefen mit den guten Bindern Sam68/Yes1-VariX entsprechend den Erwartungen.

Bei Vergleich der theoretisch und experimentell ermittelten Wachstumsraten (graue Linie bzw. Dreiecke, Abb. 61) zeigte sich außerdem wie erwartet, dass die anfänglich niedrige durchschnittliche Wachstumsrate der Mischkultur mit zunehmender Anreicherung von schnell wachsenden Hefeklonen kontinuierlich anstieg. Lediglich nach dem Überimpfen im Verhältnis 1:100 in frisches Medium (nach 133 h) fiel die Wachstumsrate/h mit 7% knapp unter den erwarteten Wert von 10%, was auf die anfängliche lag-Phase nach dem Überimpfen zurückzuführen ist.

Bei Transformation von Y2HGold-Sam68/Yes1-weak mit zwei unabhängigen Oligonukleotiden (Yes1-weak_R203W und Yes1-mut_dirty, V2, 3.4.1.4.2) war die Erwartung, dass bei allen selektierten Varianten das WW-Motiv wiederhergestellt ist und zu einem gewissen Anteil auch Varianten im RT-loop entstehen. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Mutationen in diesem Bereich auch nachteilig bezüglich Sam68-Interaktion sein können, wurden sie in den theoretischen Verlauf nicht mit aufgenommen. Der Einbau der beiden Oligonukleotide findet unabhängig voneinander statt, über dessen Statistik wenig bekannt ist. Bei vergleichbaren Transformationsbedingungen wurde das zweite Oligonukleotid zu 20% mit eingebaut (Yamamoto *et al.* 1992). Überträgt man die Ergebnisse der LEU2optNSM-Transformationen mit zwei unabhängigen Oligonukleotiden (3.4.1.2.2) auf die Yes1-weak-mut Transformation, so würde man erwarten, dass nach Selektion auf Einbau des ersten Oligonukleotids das zweite Oligonukleotid zu 5 - 7% eingebaut wird. Nach 4-tägiger Selektion in Flüssigkultur waren rund 30% der Sequenzen Yes1-mut-Varianten (Abb. 40A), was deutlich über den Erwartungen lag. Für die variierenden Einbauraten ist die Gestaltung der Oligonukleotide (Länge, bzw. die Distanz der Oligonukleotid-Bereiche sicherlich mit ausschlaggebend. Von größerer Bedeutung dürfte jedoch der verlängerte Selektionsschritt in Flüssigkultur darstellen. Während dieser Zeit kamen bereits Wachstumsvorteile zu tragen; Hefen mit Sam68/Yes1-Varianten konnten sich gegenüber Hefen mit Sam68/Yes1-weak aufgrund besserer Affinitäten schneller vermehren. Somit bleibt festzustellen, dass die Einbaurate in diesem Evolutionsexperiment nicht konkret bestimmt werden kann, aber das zweite Oligonukleotid definitiv auch hier erfolgreich eingebaut wurde, wodurch neue Varianten im RT-loop Bereich selektiert werden konnten.

4.2.2 Mögliche Ursachen für die Diskrepanz zwischen ELISA und Y2H Ergebnissen bezüglich Bindeaffinität von Yes1-VariX an Sam68

Durch Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese und Y2H Selektion wurden schnell wachsende Hefen erhalten, die neue Varianten von AD-Yes1-wt-still (Yes1-VariX) enthielten. Aufgrund der verbesserten Wachstumsraten war davon auszugehen, dass Yes1-VariX deutlich besser mit Sam68 interagieren als Yes1-weak und ungefähr so gut wie Yes1-wt(-still). Das Y2H System liefert lediglich relative

Bindungsstärken und erlaubt keine Quantifizierung der Affinitäten, im Gegensatz zum ELISA. ELISA-Tests mit bakteriell exprimierten Proteinen HN-Sam68 und GST-Yes1-Varianten ergaben, dass Yes1-E205D *in vitro* rund 400-fach stärker mit Sam68 interagiert als Yes1-weak und sogar 100-fach stärker als Yes1-wt (3.4.1.4.3). Somit ergab sich die Frage: Warum spiegelt sich diese stark erhöhte Affinität im ELISA von Yes1-E205D an Sam68 im Y2H durch verbesserte Wachstumsraten gegenüber Hefen mit Sam68/Yes1-st(-still) nicht wider?

Dass es prinzipiell möglich ist, die Interaktionsstärke im Y2H System über Wachstumsraten abzubilden, zeigten die Wachstumsversuche mit Yes1-mut (3.1.1.2), dessen Affinität zu Sam68 laut ELISA-Tests 150-fach höher ist als die von Yes1-wt (Daten nicht gezeigt). Die Selektionskapazität des Y2H Systems ist folglich im Bereich zwischen 4 μ M und 9 nM gewährleistet.

Durch Sequenzierung konnte abgeklärt werden, dass während der 11-tägigen Evolution in der Promotorregion im Vektor pRS315-AD-Yes1-VariX keine unbeabsichtigten Mutationen stattgefunden haben. Dass sich die Sequenz von Sam68 verändert hatte, konnte aufgrund der hohen Kopienzahl des Vektors (bis zu 1.000 pro Zelle) nicht definitiv ausgeschlossen werden, da eine einzige veränderte Kopie ausreichen würde, um in der Zelle verändertes Sam68-Protein zu exprimieren. Dass Sam68 mutiert wurde erscheint aber unwahrscheinlich, da in diesem Evolutionssystem sequenzspezifische Yes1-Oligonukleotide zur Mutagenese zugegeben wurden.

Die Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Tests sind nur bedingt vergleichbar; Sam68 und Yes1 wurden jeweils ohne GAL4BD- bzw. GAL4AD-Fusionsanteil, dafür mit Affinitätstags zur Expression in *E. coli* umkloniert. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Interaktion der Proteine *in vitro* von ihrem Verhalten *in vivo* unterscheiden, womöglich durch Veränderung der Teritorstruktur oder unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen.

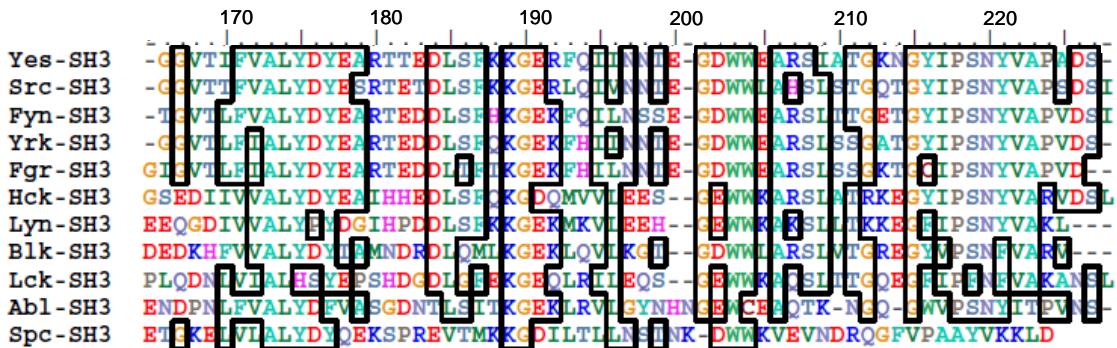


Abb. 62. Aminosäuresequenz-alignement der SH3-Domäne der Src-Kinase-Familie. Die konservierten Aminosäuren sind eingerahmt. Nach **Martin-García et al. (2007)**

Durch *Western Blot*-Analysen konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Zellernte weniger Protein von Yes1-E205D existiert als von Yes1-wt(-still). Somit scheint denkbar, dass in Hefe weniger ProteinVari01 exprimiert wird (durch gestörte Transkription oder Translation) oder das Protein weniger stabil ist als Yes1-wt. Durch Änderung der AS, die benachbart zum WW-Motiv liegt, welches für die Bindung der Prolin-reichen Sequenz von Sam68 essenziell ist, könnten z. B. die Struktur des β 3-Faltblattes verändert vorliegen. Über Yes1 selbst ist wenig bekannt; die wenigen Details über die Src-Kinase wurden durch Homologievergleiche gewonnen (Abb. 62). Bemerkenswert ist, dass vier von 11 Homologen der Src-Familie an Pos. 205 ein Lysin (K) besitzen, zwei Leucin (L) und die anderen fünf

Glutamat (E). Diese drei Aminosäuren weisen keine gemeinsamen Eigenschaften auf. Obwohl durch nur einen Basenaustausch aus E (GAA) die Aminosäure Aspartat (D, GAT oder GAC) entstehen könnte, taucht D bei keinem der Homologen an dieser Position auf. Durch die Oligonukleotid-Evolution entstand interessanterweise auch Yes1-Vari10 (E205K). Das Wachstum von Hefen mit Sam68/Yes1-Vari10 wird durch diese AS-Veränderung nicht merklich beeinflusst. K ist auch in den Homologen an Pos. 205 sehr häufig vertreten. D weist zwar wie E saure Eigenschaften auf, ist aber relativ klein und könnte z. B. die Ausbildung von Salzbrücken erschweren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der AS-Austausch an Pos. 205 abhängig von der Größe der Aminosäure Einfluss auf die Faltblattstruktur nimmt.

Vergleicht man die Wachstumsraten von Hefen mit Sam68 und der auf Proteinebene identischen Yes1-Varianten Vari01, Vari02 und Vari04, so fällt auf, dass Hefen mit Sam68/Yes1-Vari01 um ca. 25% schneller wachsen. Vari02 hat im Vergleich zu Vari01 einen stillen Basenaustausch mehr (Pos. 621), sonst zwei identische Basenaustausche mit Vari01 (Pos. 615, 624), die zu einem AS-Austausch (E205D) führen (Abb. 63). Somit schließt sich die zweite Frage an, die sich bezüglich des Vergleichs von *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen stellt: warum unterscheiden sich die Wachstumsraten zwischen Hefen mit Sam68/Yes1-Vari01 und –Vari02 und –Vari04, obwohl die Yes1-Varianten auf Proteinebene identisch sind? Wie beeinflusst die Yes1-DNA-Sequenz die Wachstumsrate?

	580	590	600	610	620	630																
Yes1-wt-still																
Yes1-wt	R	F	Q	I	I	N	N	T	E	G	D	W	W	E	A	R	S	I	A	T	G	
Vari01	CGTTTCCAGATTATCAACAAACACCGAAGGAGATTGGTGGGAT	GCACGTTCC	ATTGCCACCGT																			
Vari02	CGTTTCCAGATTATCAACAAACACCGAAGGAGATTGGTGGGAT	GCACGTTCC	ATTGCCACCGT																			
Vari04	CGTTTCCAGATTATCAAA	TAACACCGAAGGAGATTGGTGGGAC	GCACGTTCTATTGCCACCGT																			
ProteinVari01	R	F	Q	I	I	N	N	T	E	G	D	W	W	D	A	R	S	I	A	T	G	
Vari10	CGTTTCCAGATTATCAACAAACACCGAAGGAGATTGGTGGAAAGCACG	CTCTATTGCCACCGT																				
ProteinVari06	R	F	Q	I	I	N	N	T	E	G	D	W	W	K	A	R	S	I	A	T	G	

Abb. 63. Nukleotid- und Amiosäuresequenz-alignment von Yes1-wt(-still) und Yes1-Varianten.
Gegenüber Yes1-wt-still veränderte Basen und Aminosäuren sind gelb hinterlegt.

Yes1-Vari01, Vari02 und Vari04 bringen dasselbe Yes1-Protein, nämlich ProteinVari01 hervor, das sich lediglich in einer einzigen AS von Yes1-wt(-still) unterscheidet. Von diesen drei DNA-Varianten liegt unterschiedlich viel Protein in der Hefezelle vor (3.4.1.4.3). Da sie sich auf Proteinebene nicht unterscheiden, spielt in diesem Zusammenhang die Stabilität des Proteins selber keine Rolle. Folglich fällt das Augenmerk auf die Transkription und Translation in Hefe, die letztendlich zu verminderter Yes1-Proteinmenge führen könnten. Möglicherweise ist die Transkription im Vergleich zu Yes1-wt-still durch Veränderung von bis zu drei Basen weniger effektiv. Von den drei Yes1-Varianten besitzt lediglich Yes1-Vari02 eine Mutation, die ein seltenes Codon hervorbringt (Pos. 621, CGG). Damit lässt sich die Variabilität innerhalb der drei Varianten nicht erklären. Es ist vorstellbar, dass die mRNA aufgrund der Basenveränderungen destabilisiert wird oder lokal Sekundärstrukturen ausbildet, wodurch die Translation weniger effektiv stattfinden kann bzw. früher abbricht. Die Quantifizierung der mRNA und DNA könnte darüber Aufschluss geben.

Es ist nicht auszuschließen, dass mehrere Effekte zusammenspielen und zu Unterschieden im Auslesen des Interaktionsergebnisses mittels Wachstumskurven im Y2H System führen. Das

verwendete Y2H Selektionssystem scheint mit den beiden Reportern *HIS3* und *Aur1-C* relativ empfindlich zu sein, was für diese Evolutionsmethode auch notwendig ist, um Protein-Protein-Interaktionspartner mit unterschiedlichen Affinitäten voneinander zu differenzieren. Die Empfindlichkeit gegenüber der Menge an exprimiertem Protein ist ein genereller Nachteil von *in vivo* Selektionssystemen. Dadurch können an sich gute Interaktionspartner, die aber für Hefe nachteilige Eigenschaften mitbringen oder durch Transkriptions- oder Translationseffekte in verminderter Menge vorliegen, während des Selektionsschrittes verloren gehen. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, könnte die Proteinmenge von BD-bait und AD-prey grundsätzlich verringert werden, z. B. indem die beiden Y2H-Kassetten ins Genom integriert werden und folglich nur noch in einer Kopie existieren. Ob ohne Verstärkungseffekt die Empfindlichkeit des Y2H Systems ausreicht, um Protein-Protein-Interaktionsstärken zu unterscheiden, müsste neu ausgetestet werden (5.3).

4.3 AID-basierte autonome, kontinuierliche Evolution

4.3.1 Mutagenesepotenzial der humanen AID in der Bäckerhefe

Die humane AID desaminiert Cytosin an stark transkribierten DNA-Bereichen, wodurch Uracil entsteht. Sie fordert dadurch die DNA-Reparatursysteme heraus und sorgt natürlicherweise in B-Zellen ausgelöst durch verschiedene nachgelagerte Ereignisse (SHM, CSR, *gene conversion*) für die Antikörperdiversität (M Muramatsu *et al.* 2000). Nach Desaminierung von Cytosin wird die falsche Base Uracil entweder nicht ausgetauscht, so dass mit dem nächsten Replikationszyklus aus C/G ein T/A-Basenpaar entsteht, oder es greift ein Reparatursystem. Dabei gilt das Entfernen des Uracils als initiales Mutationsereignis. Beim *base excision repair* wird dies durch die Uracil-DNA-Glykosylase (*UNG1*) bewerkstelligt. Beim *mismatch repair* wird die fehlgepaarte Base durch das Heterodimer MSH2-MSH6 entfernt. Die Lücke wird im Folgenden mithilfe von DNA-Polymerasen aufgefüllt und die Einzelstrangbrüche über die DNA-Ligase III geschlossen (Liu *et al.* 2007). Wenn das Auffüllen durch eine Polymerase mit hoher Leseungenaugigkeit stattfindet wie z. B. durch Rev1 oder Pol η , so entstehen Transitionen oder Transversionen. Werden Doppelstrangbrüche verursacht, können Rekombinationsereignisse ausgelöst werden (Guikema *et al.* 2007).

Aufgrund des mutagenen Potentials wurde die humane AID in der Bäckerhefe exprimiert, um darauf basierend ein autonomes Evolutionssystem zu etablieren. Die Mutationsrate von episomal und integrierter AID wurde über die Reversion von *LEU2optNSM* ermittelt und die Evolution am Beispiel des schwach interagierenden Proteinpaars Sam68/Yes1-weak durchgeführt. Bisher wurden (autologe oder heterologe) Gene im Hefegenom für AID-Aktivitätsstudien verwendet. Entgegen publizierter Daten (Krause *et al.* 2006) konnten in dieser Arbeit auch Plasmid-kodierte Gene (*LEU2optNSM* und Yes1-weak auf CEN/ARS-Plasmiden) durch die AID mutiert werden. Die hohe Kopienzahl des 2 μ m Plasmids pBridge (Krause *et al.* 2006) mag ein Grund dafür sein, warum dort keine Mutanten gefunden wurden.

Die episomale AID wurde in AH109 durch einen starken Promotor konstitutiv exprimiert und erzeugte $4,0 \times 10^{-4}$ Mutationen pro bp und Generation (3.4.2.3). Dieser Wert übersteigt selbst die Mutationsrate in *UNG1*-defizienten Hefestämmen (2×10^{-5}), die ca. 200-fach höher ist als bei wt-Stämmen (Mayorov *et al.* 2005; Rogozin *et al.* 2006). Da die AID-abhängige Mutationsrate im wt-Stamm AH109 bereits

sehr hoch war, ist es denkbar, dass durch *UNG1*-Deletion in diesem Fall keine signifikante Steigerung möglich war (3.4.2.3), weil zu viele Mutationen zum Zelltod führen oder aber die Reparatur von Einzelfehlpaarungen durch Komponenten des *mismatch repair* Systems übernommen wird.

Durch Kombination der episomalen, hoch mutagenen AID mit dem Y2H System ist es nicht gelungen, Hefen mit verbesserten Interaktionspartnern zu selektieren. Die Koexpression von *bait* und AID ausgehend von demselben Plasmid (pGBKT7-CYCp-*bait*/TEFp-AID) wirkte sich negativ auf die exprimierte *bait*-Proteinmenge (3.4.2.3) aus, was wiederum zu verminderter Interaktionsfähigkeit mit *prey*-Protein geführt haben könnte und im Y2H System nicht in der erwarteten Selektion von Hefen mit besseren *bait-prey*-Interaktionspartnern resultierte (vgl. Expressionsunterschiede bei Oligonukleotid-vermittelter Mutagenese, 4.2.2). Aus diesem Grund wurde die AID-Expressionskassette ins Hefegenom (von Y2HGold) integriert (AIDint). Aufgrund der Reduktion der Kopienzahl von ca. 1.000 auf eine einzige Kopie im Genom verringerte sich sehr wahrscheinlich die AID-Aktivität und das damit verbundene Mutagesepotential drastisch (3.4.2.4). Dennoch wurde damit erfolgreich ein kontinuierliches, zielgerichtetes Evolutionssystem etabliert.

Tab. 59. AID-induzierte Mutationen in *LEU2optNSM* und *Yes1-weak* mit Sequenzmotiven

	Sequenz des Sinnstrangs	Motiv im mutierten DNA-Strang
Promotor	AAGTT	WRCT
	TTGTT	WRCA
	TCGTT	WRCG
	TTCTC	WTCT
	CGGTA	WRCC
	TTCTT	WTCT
ORF	ATCTT	WTCT
	ATCCA	WTCC
	CACGT	CRCG
	ATCGG	WTCG

Die AID agiert an stark transkribierten DNA-Abschnitten. Inwiefern sie mit dem Transkriptionskomplex interagiert ist bislang nicht geklärt, ebenso wenig wie sie an die variablen Regionen der Immunglobulin-Gene gelotst wird. Beim *targeting* scheint das Sequenzmotiv WRC (W = A, T; R = A, G) eine Rolle zu spielen. Die AID-Testsysteme (*in vitro* bzw. in *E. coli*, *S. cerevisiae*, B-Zellen, Fibroblasten, Maus) liefern bezüglich der Präferenz zur Mutation im WRC-Motiv in chromosomal Genen soweit übereinstimmende Ergebnisse (Rada *et al.* 2002; Arakawa *et al.* 2002; Yoshikawa *et al.* 2002; Pham *et al.* 2003; Beale *et al.* 2004; Mayorov *et al.* 2005), während sich die Mutationsraten vermutlich aufgrund zellspezifischer Faktoren in den Organismen bzw. Zelltypen unterscheiden. Aus den hier durchgeführten Hefe-Experimenten ging hervor, dass im Promotorbereich Mutationen von C/G zu T/A gehäuft an WRC-Motiven auftreten, aber dennoch auch Mutationen außerhalb dieses Motivs einfügt werden (3.4.2.3 und Tab. 59). Dabei handelt es sich v. a. um ein WTC-Motiv, das auch bei Mutationen in den Leserahmen der Zielgene als bevorzugtes Sequenzmotiv der AID identifiziert wurde (Tab. 59). An die Mutation der Zielgene *LEU2optNSM* bzw. *Yes1-weak* war ein Selektionssystem angeschlossen: es konnten nur diejenigen Hefen überleben, in deren Zielgen wenigstens eine bestimmte Base gezielt mutiert wurde, um ein essentielles ATG-Startcodon bei *LEU2opt* bzw. das für die Protein-Protein-Interaktion nötige WW-Motiv bei *Yes1-weak* zu generieren.

Daraus ist zu schließen, dass Mutation außerhalb des WRC-Motivs seltener stattfinden, diese wenigen Mutanten aufgrund der essentiellen DNA-Veränderung aber einen Selektionsvorteil vermittelten und somit ausschließlich identifiziert wurden. Für das Evolutionssystem bedeutet das, dass *prey* ungeachtet von WRC-Motiven durch die AID mutiert wird und sich Varianten mit positiver Auswirkung auf die *bait-prey*-Interaktion durch die gekoppelte Selektion anreichern.

4.3.2 Individuelle Mutationsraten der AIDint-Klone

Bei der Bestimmung der AIDint-Mutationsrate durch *LEU2optNSM* ergab sich eine interessante Beobachtung: die einzelnen AIDint-Transformanten wiesen sehr unterschiedliche Mutationsraten auf (3.4.2.4) und unterschieden sich folglich genetisch, obwohl sie von derselben AID-Integrante (Y2HGold-AIDint1/Klon2) abstammten. Zwischen Integration der AID-Expressionskassette und Selektion der korrekten Integrante auf Agarplatten lagen ca. 100 Generationen. Während dieser Zeit teilten sich die Hefen unentwegt und essentielle Gene wurden transkribiert. Erst danach wurde AIDint mit dem *LEU2optNSM*-Plasmid transformiert. Im Gegensatz dazu wurde AH109 mit episomaler AID und *LEU2optNSM* kotransformiert. Da die mutagene AID durch einen starken Promotor konstitutiv exprimiert wird, kann sie sich sowohl selbst, als auch andere stark transkribierte Gene im Hefegenom mutieren. Je öfter sich eine Hefezelle teilt, desto mehr Fehler können sich im Genom der Nachkommen etablieren. Dabei konkurriert die mutagene AID mit den hefeigenen Reparaturmechanismen: agieren sie zu langsam oder wurden deren Komponenten mutiert, etablieren sich verstärkt Mutationen im Hefeorganismus. Je nach Effekt (stille Mutation oder AS-Austausch), Rolle der mutierten Gene und Selektionsdruck kommen sie im Hefewachstum zu tragen oder nicht. Da sich die beiden Hefestämme AH109 und Y2HGold genotypisch lediglich in einem der Y2H Reporter (*lacZ* bzw. *Aur1-C*) unterscheiden, ist auszuschließen, dass sich die Klon-Differenzen aus den Stammhintergründen ergeben. Vielmehr ist davon auszugehen, dass aufgrund der Länge des AID-Einflusses Mutationsereignisse auftraten, die dazu führten, dass die Hefen in Leucin-freiem Medium nicht wachsen können. Das kann entweder daher röhren, dass *LEU2optNSM* nicht mutiert wird, weil die AID-Aktivität verringert ist, indem die AID selbst mutiert wurde, das Reparatursystem gestärkt wurde, oder andere Enzyme des Leucin-Stoffwechselwegs mutiert wurden und ihre Funktionalität verloren. Dass die Überexpression von AID massive Folgen haben kann, zeigen Versuche mit transgenen Mäusen, die im Alter Tumore entwickelten, weil die AID nicht nur an den Zielgenen aktiv war, sondern Onkogene entstanden (Nilsen *et al.* 2003; Okazaki *et al.* 2003). Generell traten bei den AIDint-Klonen keine zu massiven Zellschädigungen auf, denn das Wachstum der verschiedenen AIDint-*LEU2optNSM*-Transformanten in Leucin-haltigem Medium war nicht eingeschränkt. Insgesamt ist festzuhalten, dass die ermittelte Mutationsrate von AIDint1/Klon2 ein individueller Wert ist, der sich lediglich auf den Zeitpunkt der *LEU2optNSM*-Reversion bezieht.

Für die Evolutionsexperimente mit Sam68/Yes1-weak wurde ebenso der mutagene Hefestamm Y2HGold-AIDint1/Klon2 verwendet. Zwischen den Transformationen mit pRS313-AL_*LEU2optNSM* bzw. pGBK7-CYCp-Sam68/pRS315-AD-Yes1-weak, die im Zeitraum von vier Monaten durchgeführt wurden, wurde der AIDint-Stamm auf Vollmedium-Agarplatten bei RT aufbewahrt und nach je 3 Wochen neu überimpft. Während dieser Zeit können sich die Nachkommen des AIDint-Klons auf genetischer Ebene durchaus weiter verändert haben, so dass es nicht möglich ist, die Mutationsrate in

den Evolutionsexperimenten mit Sam68/Yes1-weak anzugeben. Im Endeffekt gleicht keine Zelle der anderen und kann sich während der Evolution aus oben erläuterten Gründen weiter verändern. Deshalb ergibt es wenig Sinn, an dieser Stelle theoretische Berechnungen anzustellen, wie viele Mutanten in den Evolutionsexperimenten hätten entstehen können. Durch Plattieren von Aliquots auf DO TrpLeuHis-Platten kann man nachvollziehen, wie viele Histidin-prototrophe Klone in den ersten 5 Tagen entstanden sind. Diese reichertem sich durch das Selektionssystem entsprechend theoretischen Berechnungen an (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich die Frage, ob während der Evolution auch noch bessere Interaktionspartner hätten entstehen können. Generell können im Y2H System Hefen mit noch besser interagierendem Partner selektiert werden, wie z. B. Sam68/Yes1-mut (3.1.1.2). Je geringer die Wachstumsunterschiede der Hefen mit guten und besseren Interaktionspartnern, desto mehr Zeit ist allerdings zur Selektion des besseren Interaktionspaars nötig. In den Evolutionsexperimenten dauerte es bereits 5 Tage, um Hefemutanten mit Sam68/Yes1-wt unter Hefen mit Sam68/Yes1-weak anzureichern. Durch Simulation lässt sich klar feststellen, dass zusätzliche Yes1-Mutationen, die der Hefezelle zu noch schnellerem Wachstum verholfen hätten – vergleichbar der Interaktionsstärke zwischen Sam68/Yes1-mut (3.1.1.2) – sehr früh hätten entstehen müssen, da ansonsten die Selektionszeit nicht ausgereicht hätte, um diese Mutationen anzureichern bzw. hätten die Selektionsbedingungen im Anschluss noch viel stringenter gewählt werden müssen, um diesen Mutanten einen genügend hohen Selektions- und damit Wachstumsvorteil zu verschaffen.

4.3.3 AID-induzierte Mutationsergebnisse in den evolvierenden Kulturen

Durch genomisch integrierte, konstitutiv exprimierte AID ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, *prey*-Varianten zu generieren und durch simultane Kopplung von Geno- und Phänotyp im Y2H System diejenigen anzureichern, deren Affinität zum *bait*-Protein deutlich stärker ist. Bei den Evolutionsexperimenten ausgehend von AIDint-Sam68/Yes1-weak ergaben sich in den evolvierenden Kulturen individuelle Mutationsergebnisse: 1) Mehrheitlich wurden wie beabsichtigt Hefen mit Punktmutationen in Yes1-weak (= Yes1-wt) selektiert, die durch das essentielle WW-Motiv Protein-Protein-Interaktion mit Sam68 vermittelten (Evo-1 und -2; 3.4.2.5). Des Weiteren kam es zu zwei seltenen Ereignissen: 2) In der Kultur Evo-3 fanden ungeklärte Ereignisse statt, die der Hefezelle unabhängig von *bait-prey*-Interaktion zu besserem Wachstum verholfen (3.4.2.5). 3) In einer unabhängigen Versuchswiederholung wurde aus AD-Yes1-weak durch homologe Rekombination AD-Sam68 generiert, so dass sich Hefen mit dem Proteinpaar BD-Sam68/AD-Sam68 zu 100% durchsetzten (Daten nicht gezeigt). Das Ereignis der Rekombination existiert natürlicherweise in Hefezellen – auch ohne AID-Expression, bevorzugt mit linearen DNA-Fragmenten (vgl. genomische Integration/Deletion, 2.2.2.9). Jedoch wurde beschrieben, dass die AID in der Bäckerhefe transkriptionsabhängig die Rekombinationsergebnisse um das 10-fache steigert ($\sim 10^{-5}$ pro Gen und Generation, (Poltoratsky *et al.* 2004; Mayorov *et al.* 2005; Gómez-González *et al.* 2007), und zwar ausschließlich in *UNG1*+, also wt-Stämmen. Durch das Entfernen des AID-generierten Uracils durch die Uracil-DNA-Glykosylase (kodiert durch *UNG1*) entstehen Doppelstrangbrüche, wodurch die Rekombinationswahrscheinlichkeit erhöht wird (Poltoratsky *et al.* 2004). Während den Evolutionsexperimenten in dieser Arbeit wurde in den Kontrollkulturen (ohne AID) in keinem Fall

Rekombination beobachtet, was die Vermutung bestärkte, dass das Rekombinationsereignis durch die AID verursacht wurde. Aufgrund des Selektionssystems und der Tatsache, dass Sam68 *in vivo* multimerisiert (Chen *et al.* 1997), wurden Hefen in dieser Kultur mit BD-Sam68/AD-Sam68 zu 100% angereichert.

Die Ereignisse 1) bis 3) veranschaulichen sehr deutlich, dass das Selektionssystem insgesamt in Richtung besseres Hefewachstum abzielt, wenngleich das Ereignis zur Erzeugung von schneller wachsenden Hefen individueller Natur ist und auch anders stattfinden kann als beabsichtigt („*You get what you screen for.*“, Schmidt-Dannert *et al.* 1999). Alles in allem konnte demonstriert werden, dass die Evolution von Protein-Bindepartenen basierend auf AID-induzierter Mutation erfolgreich durchgeführt werden kann. Dabei ist es klar notwendig, die Evolutionsexperimente parallel mit mehreren unabhängigen Kotransformanten durchzuführen und das Ergebnis der Evolution sorgfältig zu überprüfen. Zudem ist es erstrebenswert, die somatische Hypermutation im Gegensatz zur Rekombination zu erhöhen und die AID noch zielgerichteter an die prey-DNA zu lenken (5.2).

5 AUSBLICK

5.1 Optimierung der Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese

Durch Transformation von Hefen mit degenerierten Oligonukleotiden wurde eine *prey*-Bibliothek generiert und durch Kopplung mit dem Y2H System Hefen mit verbesserter *bait-prey*-Interaktion selektiert. Da die Transformation ein einmaliges Ereignis zur Inkorporation von Oligonukleotiden darstellt, wäre die Kombination von kontinuierlicher Oligonukleotid-Aufnahme aus dem Medium und Hefewachstum – und damit verbunden dem sequenzspezifischen Einbau des Oligonukleotids in die *prey*-DNA – eine elegante Lösung zur Etablierung eines autonomen, kontinuierlichen Evolutionssystems. Elektrische Impulse, die der Hefekultur in kurzen Intervallen zugefügt werden, könnten die Aufnahme begünstigen, wobei die Effizienz der Aufnahme über Impulsdauer, -Stärke und Frequenz optimiert werden muss (Delorme 1989).

Sowohl die Eintrittsrate in die Zelle als auch die Einbaurate der Oligonukleotide in die DNA beeinflussen die Anzahl der generierten Mutanten. Die Effizienz des Oligonukleotid-Einbaus könnte deshalb durch Manipulation der Hefe-Reparatursysteme gesteigert werden. Es ist bekannt, dass am Oligonukleotid-Einbau diverse Komponenten des *mismatch repair* (MSH2, MSH3) und *nucleotide excision repair* beteiligt sind (Cole-Strauss *et al.* 1999; Rice *et al.* 2001; Dekker *et al.* 2003). Konkret konnte bereits gezeigt werden, dass durch Überexpression von *RAD51*, dem homologen *RecA*-Gen in *E. coli*, die Einbaurate 100-fach erhöht wird (Liu *et al.* 2004).

Die Gestaltung der Oligonukleotide ist ausschlaggebend für die resultierenden *prey*-Mutationen. Sie sollte dahingehend optimiert werden, als dass die komplette *prey*-DNA an jeder Position mutiert werden kann und dennoch ein genügend langer hybridisierender Bereich existiert, um den effektiven und sequenzspezifischen Einbau zu garantieren. In den beschriebenen Evolutionsexperimenten wurden zwei kurze Bereiche (fünf bzw. zehn AS im RT-*loop* und der Region um WW-Motiv von Yes1-weak) durch Oligonukleotide mutagenisiert, deren 5' und 3' Enden zu 100% mit *prey* hybridisierten (3.4.1.4.2). Um einen langen Sequenzabschnitt oder den kompletten *prey*-ORF durch *mismatch*-Oligonukleotide zu mutagenisieren, müssten mehrere möglichst lange Oligonukleotide hergestellt werden, die sich überlappen, wobei die nicht-variablen Enden stets die wt-Sequenz generieren würden. Aus derzeit noch laufenden Versuchen gibt es allerdings erste Hinweise, dass bei einer Verunreinigung von 15% pro Position kein 100%ig hybridisierender Bereich nötig ist, sondern aufgrund der Syntheseart lediglich eine feste Base am 3' Ende gewählt werden muss. Unter diesen Umständen könnten zur Mutation des gesamten *prey*-ORFs oder einzelner Sequenzabschnitte degenerierte Oligonukleotide direkt aneinander gereiht werden. Durch den Grad der Verunreinigung bei der Oligonukleotid-Synthese kann die Mutationsrate basengenau eingestellt werden. Wie hoch dieser gewählt werden kann, um die Anzahl an Mutanten möglichst hoch zu halten, aber dennoch eine genügend hohe Einbaurate zu garantieren, gilt es auszutesten. Um die Mutationsereignisse nahe benachbarter Positionen in einem kontinuierlichen Evolutionsprozess zu entkoppeln, sollten jedoch möglichst kurze Oligonukleotide verwendet werden, die an wenigen Positionen mit den benachbarten Oligonukleotiden überlappen.

Da die sequenzspezifische Mutation durch Oligonukleotide auch auf *prey*-DNA-Sequenzabschnitte beschränkt werden kann, könnten mit dieser Methode auch *complementary determining regions* (CDR) in Antikörpern mutagenisiert werden. CDRs sind kurze Aminosäureabschnitte in der N-terminalen variablen Region der Immunglobulingene. Pro leichter und schwerer Kette existieren drei CDRs (CDR1, CDR2, CDR3), die die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung vermitteln (Wu *et al.* 1970).

5.2 Weiterentwicklung der AID-Mutagenese

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal plasmid-kodierte Gene (*LEU2optNSM* und *Yes1-weak*) durch die humane AID in Hefe mutiert und die Evolution eines schwachen zu einem starken Interaktionspaar erfolgreich durchgeführt.

Anhand der Reversion von *LEU2optNSM* zeigte sich, dass die Mutationsrate der integrierten AID im Vergleich zur episomalen AID relativ niedrig ist, aber trotzdem eine erfolgreiche Evolution durchgeführt werden konnte. Da die Variantenzahl proportional zur Mutationsrate ist, wäre eine Erhöhung der Mutationsrate in Hinblick auf die Verbesserung von Protein-Protein-Interaktionspaaren sinnvoll. Ob es möglich ist, die Mutationsrate auf bis zu 10^{-3} pro bp und Generation zu erhöhen, wie es in AID exprimierenden Säugerzellen erreicht wird (Rogozin *et al.* 2006), muss ausgetestet werden.

Eine höhere Mutationsrate könnte zum einen über eine Steigerung der AID-Kopienzahl erreicht werden. Da AIDint bereits einen starken Promotor (*TEF1*) besitzt, könnten mehrere AID-Expressionskassetten (einzelne oder als *tandem repeat*) ins Hefegenom integriert werden. Dies würde die AID-Aktivität vermutlich nur mäßig erhöhen. Da die AID, kodiert auf dem *high copy*-Plasmid pGBKT7, bereits eine sehr mutagene Wirkung zeigte ($4,4 \times 10^{-4}$, 3.4.2.3), wäre diese zur Durchführung von Evolutionsexperimenten generell sehr geeignet, bzw. aufgrund der kontinuierlichen AID-Aktivität absolut zu bevorzugen, um den Organismus lediglich zum Zweck der Protein-Evolution dem mutagenen Einfluss auszusetzen. Allerdings gilt es, den Effekt der hohen AID-Aktivität auf das Hefegenom und damit das Hefewachstum genau zu beobachten und auszutesten, ob diese Hefen eine mehrwöchige Selektion überleben. Bei Verwendung der episomalen AID (pGBKT7-CYCp-bait/TEFp-AID) müsste folglich BD-bait auf ein separates Plasmid kloniert werden, da die Koexpression ausgehend von demselben Plasmid störend auf die bait-Expression wirkte (3.4.2.3). Aufgrund der beschränkten Plasmidmarker ist die genomische Integration von BD-bait eine mögliche Alternative. Optional kann AD-prey integriert werden, was zusätzlich das screening erleichtern würde, weil dann nur eine Kopie von *prey*-DNA oder dessen Varianten in einer Hefezelle existiert. Dies würde sich direkt auf die Y2H Interaktion also auf Hefewachstum auswirken und die *prey*-Region der evolvierten Hefeklone könnten direkt analysiert werden. Die Vereinzelung von *prey*-Plasmiden in *E. coli* wäre dadurch nicht mehr nötig, wodurch Zeit und Kosten gesenkt werden. Wie mutagen die AID auf *prey*-benachbarte Regionen im Genom wirkt, müsste dann ebenso untersucht werden. Da die Frequenz der AID-Mutation mit Abstand zum Promotor sinkt (Rada *et al.* 2001), ist anzunehmen, dass C-terminal benachbarte Regionen weniger stark mutiert werden, so dass es zweckdienlicher ist, die Aktivierungsdomäne an den C-Terminus von *prey* zu klonieren.

Nach Integration von *bait* und/oder *prey* ins Hefegenom verändert sich die Kopienzahl. Da die Menge an exprimiertem Protein die Y2H Interaktion beeinträchtigt, wie bereits unter 3.4.1.4.3 aufgegriffen,

muss deshalb neu überprüft werden, ob die Interaktionsstärke ohne Verstärkungseffekt noch auslesbar ist.

Zur Steigerung der AID-Aktivität wird des Weiteren der Einfluss des THO-Komplexes diskutiert. Dabei handelt es sich um einen konservierten Proteinkomplex, der bei der mRNP (*messenger ribonucleoprotein*)-Bildung eine entscheidende Rolle spielt. Durch den THO-Komplex wird die Wechselwirkung zwischen wachsender mRNA und transkribiertem DNA-Strang verhindert, wodurch der DNA-Doppelstrang möglichst schnell nach der Transkription wiederhergestellt wird. Fehlt der intakte THO-Komplex, bildet sich ein mRNA:DNA-Hybrid und der nicht-transkribierte DNA-Strang liegt einzelsträngig vor. Die AID-Mutationsrate konnte durch Mutation von THO-Komponenten um zwei Zehnerpotenzen erhöht werden (Gómez-González *et al.* 2007).

Da die AID-Mutagenese mit dem Hefe-eigenen Reparatursystem konkurriert, wäre zur Erhöhung der Mutationsrate eine Verschlechterung des Systems ein weiterer Lösungsansatz, wodurch allerdings auch die Vitalität der Hefen mit beeinflusst werden kann. Die Deletion von *UNG1*, der Hauptkomponente des *base excision repair*, in Kombination mit der episomalen AID brachte entgegen publizierter Daten (Mayorov *et al.* 2005) keinen weiteren Vorteil (3.4.2.3), könnte jedoch die Mutationsrate in AIDint-Stämmen steigern, da sie dort sehr viel niedriger war. Außerdem zeigten Experimente in Mäusen sowie in der Bäckerhefe, dass die Ereignisse der Hyperrekombination durch Deletion von *UNG1* verringert wurden (Rada *et al.* 2002; Poltoratsky *et al.* 2004; Mayorov *et al.* 2005). Da durch Desaminierung von Uracil sowohl Punktmutationen als auch Rekombinationen ausgelöst werden, Rekombinationen in diesem Evolutionssystem aber unerwünscht sind, ist es notwendig, diese Ereignisse weitestgehend zu unterbinden. Der Mechanismus wie aus Einzelstrangbrüchen beim *base excision repair* Doppelstrangbrüche entstehen, ist bislang unbekannt. Möglicherweise löst die AID selbst Rekombinationen aus. Dafür sprechen Experimente in *E. coli* und B-Zellen, die zeigten, dass Rekombinationen durch eine am C-Terminus verkürzte AID unterbunden werden, während die somatische Hypermutationsrate unbeeinflusst bleibt (Barreto *et al.* 2003).

SHM findet natürlicherweise sowohl auf dem Sinn- als auch auf dem Nicht-Sinnstrang statt (Shen *et al.* 2009). Dadurch erhöht sich die Anzahl an möglichen Varianten. In der Literatur finden sich Hinweise, wonach *UNG1* auch Einfluss auf die Strangbevorzugung haben soll. Da in dieser Arbeit keine Bevorzugung des einen oder anderen Strangs beobachtet werden konnte, besteht momentan nicht die Notwendigkeit, diesbezüglich Veränderungen vorzunehmen.

Neben der hohen Punktmutationsrate wäre eine noch zielgerichteter AID-Aktivität speziell auf die *prey*-DNA wünschenswert. Die humane AID agiert ausschließlich an einzelsträngigen DNA-Abschnitten, die v. a. während der Transkription gehäuft auftreten. Ob die AID durch zellspezifische Kofaktoren zur Zielsequenz in den variablen Regionen der Immunglobulin-Gene geführt wird, ist bislang nicht bekannt. Derzeit werden in B-Zelllinien DNA-Motive in oder nahe der Immunglobulin-Gene analysiert, die es der AID ermöglichen sollen, sich gezielt dort in die ssDNA einzuklinken und dann daran entlang zu gleiten (Tanaka *et al.* 2010). Um die AID gerichteter zur *prey*-DNA zu führen, könnten derartige Motive in die *prey*-Promotorregion eingesetzt werden. Dass für die zielgerichtete Steuerung spezifische DNA-bindende Proteine benötigt werden, ist sehr wahrscheinlich, wenngleich noch nicht ausreichend erforscht. Inwiefern diese Aufgabe von Homologen in Hefe übernommen werden kann, müsste des Weiteren überprüft werden.

Welche Aufgaben die humane AID selbst erfüllt und an welchen Prozessen zellspezifische Kofaktoren beteiligt sind, ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Dass durch die AID in Hefen *prey* spezifisch mutiert werden kann, wurde in den Evolutionsexperimenten klar gezeigt. Da sie ursprünglich für die Antikörpervariabilität in B-Zellen verantwortlich ist und in Immunglobulin-Genen sowohl Hypermutationen als auch Rekombinationsereignisse auslöst, erscheint dieses mutagene Enzym für die Verbesserung von Antigen-Antikörper-Bindungen in der Bäckerhefe gut geeignet zu sein. Aufgrund vieler natürlichen Sequenz-Voraussetzungen wie den variablen Regionen und darin enthaltenen AID-spezifischen Motiven sollten mit dem AID-Mutagenesesystem in Hefe ebenso Antikörper mutiert und mit dem daran gekoppelten Selektionssystem bessere Antigen-Antikörper-Paare selektiert werden können.

5.3 Anwendbarkeit des Y2H Systems zur Selektion von hochaffinen Protein-Interaktionspartnern

Das Y2H System eignete sich als eines der eukaryontischen Selektionssysteme aufgrund der einfachen Handhabung gut zur Etablierung von kontinuierlichen Evolutionssystemen, bei denen die räumliche und zeitliche Kopplung von Mutation und Selektion im Mittelpunkt stand. Sowohl mit der Oligonukleotid-vermittelten (3.4.1) als auch mit der AID-induzierten Mutagenese (3.4.2) konnte am Beispiel von Sam68/Yes1 eine erfolgreiche Evolution von wenig affinen zu hochaffinen Protein-Protein-Interaktionspartnern durchgeführt werden. Das Auslesen der Y2H Interaktion fand direkt über Hefewachstum statt: je besser die Protein-Protein-Interaktion, desto schneller wachsen die Hefen. Parallel zur Optimierung der beiden Mutagenesesysteme (5.1, 5.2.) sollte das Prinzip der Evolution anhand weiterer Protein-Protein-Interaktionspaare überprüft werden. Dass Protein-Protein-Interaktionen mit Bindungsaffinitäten im Bereich von 4 μ M bis 9 nM mittels Y2H unterschieden werden können, wurde gezeigt (3.4.1.4.3). Offen ist hingegen, ob eine zusätzliche Verbesserung durch das Auslesen im Y2H nachvollziehbar ist. Yes1-mut bindet laut ELISA ca. 150-fach stärker an Sam68 als Yes1-wt. Dass sich im Y2H die Wachstumsraten von Hefen mit Sam68/Yes1-mut und Sam68/Yes1-wt selbst unter stringenten Selektionsbedingungen nur mäßig unterscheiden (vgl. 13% bzw. 16% Zuwachs/h in DO TrpLeuHis/100 mM 3-AT, 3.1.1.2), zeigt, dass die Kapazität zur Selektion von starken Interaktionspartnern mit anfänglichen Bindungsaffinitäten < 6 nM im Y2H relativ schnell erschöpft sein wird. Eine Möglichkeit, den Expressionslevel der Reportergene generell zu senken, wäre die Kopienzahl von *prey* und *bait* zu verringern. Die effektivste Lösung hierfür wäre, *BD-bait* und *AD-prey* ins Hefegenom zu integrieren. Ob darüber hinaus schwache Promotoren zur Proteinexpression ausreichen, müsste anhand von Wachstumstests auf Selektivmedien ausgetestet werden. Durch die einzige Kopie der Expressionskassetten wird in der Hefezelle weniger *bait*- und *prey*-Protein gebildet, die Protein-Protein-Interaktion löst die Transkription der Y2H Reporter spezifischer aus, wodurch die Anzahl an falsch-Positiven reduziert und zugleich die Sensitivität des Selektionssystems signifikant gesteigert wird (Miyashita *et al.* 2008). Deshalb scheint dies ein erfolgversprechender Weg zu sein, zellspezifische Artefakte einzugrenzen und gleichzeitig die Selektionskapazität des Y2H Systems auszudehnen.

Um generell auszuschließen, dass die Verbesserung der Protein-Protein-Interaktionspartner aufgrund von Artefakten wie Expressionsunterschieden oder unbeabsichtigter Veränderung von *bait* oder der Gal4 Aktivierungs-/Bindedomäne hervorgerufen wurde, sollte – wie auch nach anderen

Selektionsmethoden üblich – im Anschluss an die Evolution die Affinität zwischen *bait* und selektierter *prey*-Mutante überprüft werden, und zwar mit möglichst unabhängigen Systemen. Zunächst sollten über Wachstumstests im Y2H die *in vivo* Ergebnisse verifiziert werden und des Weiteren *in vitro* Methoden wie ELISA oder Biacore-Messungen Anwendung finden. Dadurch kann gleichzeitig die Affinität des neu isolierten Protein-Partners gegenüber dem ursprünglich eingesetzten quantifiziert werden.

Für die Evolution speziell von Antigen-Antikörper-Komplexen stellt das *yeast cell surface display* (1.2.2) ein alternatives Selektionssystem dar, da damit die Selektion von hochaffinen Antikörpern sehr erfolgreich durchgeführt werden kann (Boder *et al.* 2000; Feldhaus *et al.* 2003). Um die Kontinuität bzw. Autonomie des Evolutionssystems beizubehalten, ist statt der herkömmlichen Selektion Antikörper-präsentierender Hefezellen mittels FACS-Analyse (über Fluoreszenz-markierte Antikörper) oder magnetischer Partikel (Biotin-Streptavidin-Bindung) die Kombination zwischen Oberflächen-Präsentation und selektivem Wachstum zu favorisieren. Ein Selektionssystem, indem die Information der extrazellulären Protein-Protein-Interaktion in den Zellkern gelangt und dort zu einer selektiven Expression von Nährstoffmarkern führt, wurde bislang nicht entwickelt. Erste Überlegungen gehen dahin, Oberflächenrezeptoren (wie Pheromonrezeptoren) zu nutzen, die aufgrund von Konformationsänderungen – hervorgerufen durch die Antigen-Antikörper-Bindung - eine Signalkaskade auslösen, die letztendlich zur Expression von Nährstoff- oder Antibiotikamarkern führt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die zielgerichtete Optimierung von Protein-Protein-Interaktionen (z. B. bei der Signaltransduktion oder Antigen-Antikörper-Bindung) spielt in vielen Bereichen von Medizin bis hin zur Industrie eine immer bedeutendere Rolle. Herkömmliche *in vitro*-Verfahren beruhen auf getrennten Mutations- und Selektionssystemen, mit denen die enorme Menge an potentiell möglichen Varianten nicht durchmustert werden kann, so dass der beste Binder unter Umständen nicht identifiziert wird. Statt einmalig eine große Menge an Varianten zu generieren, finden in der Natur über Generationen hinweg einzelne Gen-Mutationen statt, die sich in der Summe im Genpool durchsetzen, wenn sie dem Organismus einen Überlebensvorteil verschaffen. Ziel dieser Arbeit war es, in Anlehnung an die Darwin'sche Evolution ein autonomes, kontinuierliches Evolutionssystem bestehend aus räumlich und zeitlich gekoppelter Mutagenese, Selektion und Replikation zu etablieren, um damit in *Saccharomyces cerevisiae* die Affinität von zwei Interaktionspartnern über zahlreiche Generationen schrittweise zu verbessern. Das sollte erreicht werden, indem spezifisch das Zielgen (*prey*) zufällig an beliebigen Positionen mutiert wird und gleichzeitig eine Selektion mittels *yeast two-hybrid* (Y2H) Interaktion in Flüssigkultur stattfindet. Die verbesserte Protein-Protein-Interaktion verleiht der Hefezelle einen Wachstumsvorteil, wodurch sich die Interaktionsstärke in der Wachstumsgeschwindigkeit widerspiegelt und die „Gewinner“ unter Selektionsbedingungen bevorzugt repliziert werden.

Am Beispiel von RNA-abhängigen RNA Replikasen wurde die Entwicklung eines autonomen Replikons als Mutationssystem vorangetrieben. Da die *template*-Eigenschaften der autologen Hefeviren 20S und 23S noch relativ unerforscht sind, gestaltete sich der Aufbau durch rationales *template*-Design als komplex. Der Q β -Replikasekomplex, der bakterielle Wirtsfaktoren benötigt, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal in einem eukaryontischen Organismus funktionell exprimiert. Die Entwicklung eines stabilen RNA-Replikons in der Bäckerhefe war aufgrund der noch unzureichend bekannten Anforderungen für eine spezifische *template*-Erkennung jedoch nicht möglich.

Basierend auf der Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese wurde ein äußerst sequenzspezifisches Evolutionssystem etabliert. Die Mutationen können – mit oder ohne Berücksichtigung von Kenntnissen der Proteineigenschaften – präzise in die *prey*-DNA eingeführt und darüber hinaus auf definierte Sequenzabschnitte begrenzt werden, wobei jede Position einer beliebigen Mutationswahrscheinlichkeit unterworfen werden kann. Nach einer Evolutionsrunde, bestehend aus Hefe-Transformation mit Oligonukleotid-Bibliotheken und Selektion in Flüssigkultur mit ansteigendem Selektionsdruck wurden Hefen mit Interaktionspaaren angereichert, deren *bait-prey*-Affinität bis zu 400-fach verbessert wurde. Die Bedingung der Kontinuität wäre dann erfüllt, wenn die Aufnahme der degenerierten Oligonukleotide während des Hefewachstums ständig erfolgt oder weitere Runden bestehend aus Transformation von *prey*-Varianten-spezifischer Oligonukleotid-Bibliotheken und Selektion folgen.

Durch Kombination der humanen *activation-induced cytidine deaminase* (AID) mit dem Y2H System ist die Etablierung eines autonomen und kontinuierlichen Evolutionssystems gelungen. Dazu wurde ein Hefestamm, der mutagene AID stabil exprimiert, mit *bait*- und *prey*-Plasmid-DNA transformiert und über zahlreiche Generationen hinweg unter steigenden Selektionsbedingungen kultiviert. Hefen mit einem besseren Bindepaar wurden generiert und reicherten sich in der Kultur zu 100% an, was durch den Verlauf der Wachstumsrate beobachtet werden konnte. Indem *prey* mutiert wurde, wurde aus einem schwachen Interaktionspaar mit einer Affinität im μ -molaren Bereich ein 4,5-fach stärkerer Bindepartner erzeugt. Durch Erhöhung der *prey*-Mutationswahrscheinlichkeit, was beispielsweise über die Steigerung der AID-Aktivität erreicht werden kann, könnte dieses Evolutionssystem optimiert werden, um im gleichen Zeitraum mehr Varianten und somit potentiell noch bessere Binder zu erzeugen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Albers M, Kranz H, Kober I, Kaiser C, Klink M, Suckow J, Kern R, Koegl M. 2005.** Automated Yeast Two-hybrid Screening for Nuclear Receptor-interacting Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**: 205-213.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Amberg DC, Burke D, Strathern JN. 2005.** *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde J. 2002.** Requirement of the Activation-Induced Deaminase (AID) Gene for Immunoglobulin Gene Conversion. *Science* **295**: 1301-1306.
- Arnold FH, Georgiou G. 2003.** *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Arnold FH, Georgiou G. 2010.** *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*. Humana Press.
- Asbach B. 2010.** Charakterisierung der Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen - Implikationen für die HIV-Replikation. Diss., Universität Regensburg.
- Banerjee AK, Rensing U, August JT. 1969.** Replication of RNA viruses , , : X. Replication of a natural 6 s RNA by the Q[β] RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **45**: 181-193.
- Barreto V, Reina-San-Martin B, Ramiro AR, McBride KM, Nussenzweig MC. 2003.** C-Terminal Deletion of AID Uncouples Class Switch Recombination from Somatic Hypermutation and Gene Conversion. *Molecular Cell* **12**: 501-508.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. 1993.** Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* **14**: 920-924.
- Beale RCL, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Harris RS, Rada C, Neuberger MS. 2004.** Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *Journal of Molecular Biology* **337**: 585-596.
- Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger K, Kolmar H. 2005.** A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Letters* **579**: 1177-1182.
- Beekwilder J, Nieuwenhuizen R, Poot R, van Duin J. 1996.** Secondary structure model for the first three domains of Q beta RNA. Control of A-protein synthesis. *Journal of Molecular Biology* **256**: 8-19.
- Beekwilder MJ, Nieuwenhuizen R, van Duin J. 1995.** Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q beta. *Journal of Molecular Biology* **247**: 903-917.
- Berek C, Berger A, Apel M. 1991.** Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**: 1121-1129.
- Blumenthal T. 1980.** Interaction of host-coded and virus-coded polypeptides in RNA phage replication. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* **210**: 321-335.
- Blumenthal T, Carmichael GG. 1979.** RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annual Review of Biochemistry* **48**: 525-548.
- Blumenthal T, Hill D. 1980.** Roles of the host polypeptides in Q beta RNA replication. Host factor and

ribosomal protein S1 allow initiation at reduced GTP concentration. *The Journal of Biological Chemistry* **255**: 11713-11716.

Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD. 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10701-10705.

Boder ET, Wittrup KD. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* **15**: 553-557.

Bransteitter R, Pham P, Scharff MD, Goodman MF. 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4102-4107.

Brar SS, Sacho EJ, Tessmer I, Croteau DL, Erie DA, Diaz M. 2008. Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA Repair* **7**: 77-87.

Broders O, Breitling F, Dübel S. 2003. Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **205**: 295-302.

Bulter T, Alcalde M. 2003. Preparing Libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *Directed Evolution Library Creation*. 17-22.

Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. 2001. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **410**: 235-240.

Cadwell RC, Joyce GF. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Applications* **2**: 28-33.

Cattoretti G, Buttner M, Shaknovich R, Kremmer E, Alobeid B, Niedobitek G. 2006. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* **107**: 3967-3975.

Chen HI, Sudol M. 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7819-7823.

Chen T, Damaj BB, Herrera C, Lasko P, Richard S. 1997. Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 5707-5718.

Chetverin AB, Spirin AS. 1995. Replicable RNA vectors: prospects for cell-free gene amplification, expression, and cloning. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **51**: 225-270.

Cole-Strauss A, Gamper H, Holloman WK, Muñoz M, Cheng N, Kmiec EB. 1999. Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Research* **27**: 1323-1330.

Costanzo MC, Fox TD. 1988. Transformation of Yeast by Agitation With Glass Beads. *Genetics* **120**: 667-670.

Darwin C. 1866. *On the origin of species by means of natural selection*. John Murray.

Darwin C. 1868. *The variation of animals and plants under domestication*. O. Judd & company.

Darwin C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex [microform] / by Charles Darwin*. London :: J. Murray.

Dekker M, Brouwers C, te Riele H. 2003. Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **31**: e27.

Delorme E. 1989. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2242-2246.

- Di Noia JM, Neuberger MS. 2004.** Immunoglobulin gene conversion in chicken DT40 cells largely proceeds through an abasic site intermediate generated by excision of the uracil produced by AID-mediated deoxycytidine deamination. *European Journal of Immunology* **34**: 504-508.
- Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. 2003.** AID Mediates Hypermutation by Deaminating Single Stranded DNA. *The Journal of Experimental Medicine* **197**: 1291-1296.
- van Dijk AA, Makeyev EV, Bamford DH. 2004.** Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *The Journal of General Virology* **85**: 1077-1093.
- Disney MD, Haidaris CG, Turner DH. 2003.** Uptake and antifungal activity of oligonucleotides in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1530-1534.
- Esteban R, Fujimura T. 2003.** Launching the yeast 23S RNA Narnavirus shows 5' and 3' cis-acting signals for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2568-2573.
- Esteban R, Vega L, Fujimura T. 2005.** Launching of the Yeast 20 S RNA Narnavirus by Expressing the Genomic or Antigenomic Viral RNA in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 33725-33734.
- Esteban R, Vega L, Fujimura T. 2008.** 20S RNA narnavirus defies the antiviral activity of SKI1/XRN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 25812-25820.
- Everett JG, Gallie DR. 1992.** RNA delivery in *<I>Saccharomyces cerevisiae</I>* using electroporation. *Yeast* **8**: 1007-1014.
- Faitar SL, Brodie SA, Ponticelli AS. 2001.** Promoter-specific shifts in transcription initiation conferred by yeast TFIIB mutations are determined by the sequence in the immediate vicinity of the start sites. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 4427-4440.
- Feldhaus MJ, Siegel RW, Opresko LK, Coleman JR, Feldhaus JMW, Yeung YA, Cochran JR, Heinzelman P, Colby D, Swers J, Graff C, Wiley HS, Wittrup KD. 2003.** Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotech* **21**: 163-170.
- de Fernandez MTF, Hayward WS, August JT. 1972.** Bacterial Proteins Required for Replication of Phage Q β Ribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry* **247**: 824-831.
- Fields S, Song O. 1989.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fisher CR. 1969.** Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **34**: 306-310.
- Francisco JA, Stathopoulos C, Warren RA, Kilburn DG, Georgiou G. 1993.** Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* **11**: 491-495.
- FRANZE de FERNANDEZ MT, EOYANG L, AUGUST JT. 1968.** Factor Fraction required for the Synthesis of Bacteriophage Q[math]\beta-RNA. *Nature* **219**: 588-590.
- French CT, Ross CD, Keysar SB, Joshi DD, Lim C, Fox MH. 2006.** Comparison of the mutagenic potential of 17 physical and chemical agents analyzed by the flow cytometry mutation assay. *Mutation Research* **602**: 14-25.
- Fujimura T, Esteban R. 2004.** Bipartite 3'-Cis-acting Signal for Replication in Yeast 23 S RNA Virus and Its Repair. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 13215-13223.
- Fujimura T, Esteban R. 2007.** Interactions of the RNA polymerase with the viral genome at the 5'- and 3'-ends contribute to 20S RNA narnavirus persistence in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 19011-19019.

- Fukano H, Tamotsu Z, Eiji S, Kimitsuna W, Teruyuki N. 2002.** Genetically engineered active Qbeta replicase in rabbit reticulocyte cell-free system: a fusion protein of EF-Tu and EF-Ts is functional as the subunit of Qbeta replicase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93**: 20-24.
- Fukuda I, Kojoh K, Tabata N, Doi N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Yanagawa H. 2006.** In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic Acids Research* **34**: e127-e127.
- Fumagalli S, Totty NF, Hsuan JJ, Courtneidge SA. 1994.** A target for Src in mitosis. *Nature* **368**: 871-874.
- Fusz S, Eisenführ A, Srivatsan SG, Heckel A, Famulok M. 2005.** A ribozyme for the aldol reaction. *Chemistry & Biology* **12**: 941-950.
- García-Cuéllar MP, Esteban LM, Fujimura T, Rodríguez-Cousío N, Esteban R. 1995.** Yeast Viral 20 S RNA Is Associated with Its Cognate RNA-dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 20084-20089.
- Garvik B, Haber JE. 1978.** New cytoplasmic genetic element that controls 20S RNA synthesis during sporulation in yeast. *J. Bacteriol.* **134**: 261-269.
- Gietz RD, Woods RA. 2002.** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Gilbert W. 1986.** Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**: 618.
- Giniger E, Ptashne M. 1988.** Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 382-386.
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. 1985.** Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767-774.
- Gold L. 2001.** mRNA display: Diversity matters during in vitro selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4825-4826.
- Gómez-González B, Aguilera A. 2007.** Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 8409-8414.
- Greener A, Callahan M, Jerpseth B. 1997.** An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Molecular Biotechnology* **7**: 189-195.
- Guikema JE, Linehan EK, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Strauss PR, Stavnezer J, Schrader CE. 2007.** APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine* **204**: 3017-3026.
- Haber JE. 1999.** DNA recombination: the replication connection. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 271-275.
- Hanes J, Plückthun A. 1997.** In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4937-4942.
- Hapala I, Klobucníková V, Mazánová K, Kohút P. 2005.** Two mutants selectively resistant to polyenes reveal distinct mechanisms of antifungal activity by nystatin and amphotericin B. *Biochemical Society Transactions* **33**: 1206-1209.
- Haruna I, Spiegelman S. 1965.** Autocatalytic Synthesis of a Viral RNA in vitro. *Science* **150**: 884-886.
- Haughn GW, Somerville CR. 1990.** A Mutation Causing Imidazolinone Resistance Maps to the Csr1 Locus of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **92**: 1081-1085.
- Hermes JD, Parekh SM, Blacklow SC, Köster H, Knowles JR. 1989.** A reliable method for random

mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene* **84**: 143-151.

Honjo T, Nakai S, Nishida Y, Kataoka T, Yamawaki-Kataoka Y, Takahashi N, Obata M, Shimizu A, Yaoita Y, Nikaido T, Ishida N. 1981. Rearrangements of immunoglobulin genes during differentiation and evolution. *Immunological Reviews* **59**: 33-67.

Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry* **253**: 6551-6560.

Itoh M, Haga I, Li Q, Fujisawa J. 2002. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucl. Acids Res.* **30**: 5452-5464.

Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**: 1693-1696.

Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. 1991. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J. Exp. Med.* **173**: 1165-1175.

Jacobson A, Peltz SW. 1996. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 693-739.

James AP, Kilbey BJ. 1977. The Timing of Uv Mutagenesis in Yeast: A Pedigree Analysis of Induced Recessive Mutation. *Genetics* **87**: 237-248.

Joung JK, Ramm El, Pabo CO. 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7382-7387.

Joyce GF. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature* **338**: 217-224.

Kacian DL, Mills DR, Kramer FR, Spiegelman S. 1972. A Replicating RNA Molecule Suitable for a Detailed Analysis of Extracellular Evolution and Replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 3038-3042.

Kadowaki K, Halvorson HO. 1971a. Appearance of a New Species of Ribonucleic Acid During Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **105**: 826-830.

Kadowaki K, Halvorson HO. 1971b. Isolation and Properties of a New Species of Ribonucleic Acid Synthesized in Sporulating Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **105**: 831-836.

Kamen R, Kondo M, Römer W, Weissmann C. 1972. Reconstitution of Q replicase lacking subunit with protein-synthesis-interference factor i. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **31**: 44-51.

Kanayama N, Todo K, Takahashi S, Magari M, Ohmori H. 2006. Genetic manipulation of an exogenous non-immunoglobulin protein by gene conversion machinery in a chicken B cell line. *Nucleic Acids Research* **34**: e10.

Kellner M. 2007. Generierung von SH3-Domänen mit verbesserter Affinität zu Sam68 mittels Phagen-Display-Technologie. Diplomarbeit. Universität Regensburg.

Kita H, Cho J, Matsuura T, Nakaishi T, Taniguchi I, Ichikawa T, Shima Y, Urabe I, Yomo T. 2006. Functional Qbeta replicase genetically fusing essential subunits EF-Ts and EF-Tu with beta-subunit. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 421-426.

Klein U, Dalla-Favera R. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* **8**: 22-33.

Kłopotowski T, Wiater A. 1965. Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **112**: 562-566.

- Kondo M. 1975.** Structure and function of RNA replicase of bacteriophage Qbeta. *Archives Internationales De Physiologie Et De Biochimie* **83**: 909-948.
- Kopsidas G, Carman RK, Stutt EL, Raicevic A, Roberts AS, Siomos MV, Dobric N, Pontes-Braz L, Coia G. 2007.** RNA mutagenesis yields highly diverse mRNA libraries for in vitro protein evolution. *BMC Biotechnology* **7**: 18.
- Kopsidas G, Roberts AS, Coia G, Streltsov VA, Nuttall SD. 2006.** In vitro improvement of a shark IgNAR antibody by Qbeta replicase mutation and ribosome display mimics in vivo affinity maturation. *Immunology Letters* **107**: 163-168.
- Kow YW, Bao G, Reeves JW, Jinks-Robertson S, Crouse GF. 2007.** Oligonucleotide transformation of yeast reveals mismatch repair complexes to be differentially active on DNA replication strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 11352-11357.
- Kraal G, Weissman IL, Butcher EC. 1985.** Germinal center cells: antigen specificity, heavy chain class expression and evidence of memory. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **186**: 145-151.
- Krause K, Marcu KB, Greeve J. 2006.** The cytidine deaminases AID and APOBEC-1 exhibit distinct functional properties in a novel yeast selectable system. *Molecular Immunology* **43**: 295-307.
- Labbé S, Thiele DJ. 1999.** Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods in Enzymology* **306**: 145-153.
- LAEMMLI UK. 1970.** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li B, Fields S. 1993.** Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**: 957-963.
- Lin B, Skidmore JM, Bhatt A, Pfeffer SM, Pawloski L, Maddock JR. 2001.** Alanine scan mutagenesis of the switch I domain of the Caulobacter crescentus CgtA protein reveals critical amino acids required for in vivo function. *Molecular Microbiology* **39**: 924-934.
- Liss M, Wagner R. 2007.** Tailor-Made Proteins for Pharma and Industry. *European BioPharmaceutical Review*.
- Liu L, Cheng S, van Brabant AJ, Kmiec EB. 2002.** Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Research* **30**: 2742-2750.
- Liu L, Maguire KK, Kmiec EB. 2004.** Genetic re-engineering of *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 leads to a significant increase in the frequency of gene repair in vivo. *Nucleic Acids Research* **32**: 2093-2101.
- Liu R, Barrick JE, Szostak JW, Roberts RW. 2000.** Optimized synthesis of RNA-protein fusions for in vitro protein selection. *Methods in Enzymology* **318**: 268-293.
- Liu Y, Prasad R, Beard WA, Kedar PS, Hou EW, Shock DD, Wilson SH. 2007.** Coordination of Steps in Single-nucleotide Base Excision Repair Mediated by Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 and DNA Polymerase β . *The Journal of biological chemistry* **282**: 13532-13541.
- Lizardi PM, Guerra CE, Lomeli H, Tussie-Luna I, Russell Kramer F. 1988.** Exponential Amplification of Recombinant- RNA Hybridization Probes. *Nat Biotech* **6**: 1197-1202.
- López V, Gil R, Carbonell JV, Navarro A. 2002.** Occurrence of 20S RNA and 23S RNA replicons in industrial yeast strains and their variation under nutritional stress conditions. *Yeast* **19**: 545-552.
- Lorenz M, Radbruch A. 1996.** Developmental and molecular regulation of immunoglobulin class switch recombination. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **217**: 151-169.

- Maguire KK, Kmiec EB. 2007.** Multiple roles for MSH2 in the repair of a deletion mutation directed by modified single-stranded oligonucleotides. *Gene* **386**: 107-114.
- Martín-García JM, Luque I, Mateo PL, Ruiz-Sanz J, Cámera-Artigas A. 2007.** Crystallographic structure of the SH3 domain of the human c-Yes tyrosine kinase: loop flexibility and amyloid aggregation. *FEBS Letters* **581**: 1701-1706.
- Matsumoto Y, Fishel R, Wickner RB. 1990.** Circular single-stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7628-7632.
- Matsumoto Y, Wickner RB. 1991.** Yeast 20 S RNA replicon. Replication intermediates and encoded putative RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 12779-12783.
- Mayorov VI, Rogozin IB, Adkison LR, Frahm C, Kunkel TA, Pavlov YI. 2005.** Expression of human AID in yeast induces mutations in context similar to the context of somatic hypermutation at G-C pairs in immunoglobulin genes. *BMC Immunology* **6**: 10.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. 1990.** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.
- Miller SL. 1953.** A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions. *Science* **117**: 528-529.
- Mills DR, Kramer FR, Dobkin C, Nishihara T, Speigelman S. 1975.** Nucleotide sequence of microvariant RNA: another small replicating molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 4252-4256.
- Mills DR, Peterson RL, Speigelman S. 1967.** An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**: 217-224.
- Miyashita S, Shirako Y. 2008.** Chromosomal integration of a binding domain:bait gene into yeast enhances detection in the two-hybrid system. *Journal of Microbiological Methods* **73**: 179-184.
- Mobini-Dehkordi M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Ghaedi K, Tavassoli M, Akada R. 2008.** Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **105**: 403-408.
- Moerschell RP, Tsunasawa S, Sherman F. 1988.** Transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 524-528.
- Moldenhauer G, Popov SW, Wotschke B, Brüderlein S, Riedl P, Fissolo N, Schirmbeck R, Ritz O, Möller P, Leithäuser F. 2006.** AID expression identifies interfollicular large B cells as putative precursors of mature B-cell malignancies. *Blood* **107**: 2470-2473.
- Morozov IY, Ugarov VI, Chetverin AB, Spirin AS. 1993.** Synergism in replication and translation of messenger RNA in a cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9325-9329.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mumberg D, Müller R, Funk M. 1995.** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Munishkin AV, Voronin LA, Ugarov VI, Bondareva LA, Chetverina HV, Chetverin AB. 1991.** Efficient templates for Q beta replicase are formed by recombination from heterologous sequences. *Journal of Molecular Biology* **221**: 463-472.

- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. 2000.** Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**: 553-563.
- Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. 1999.** Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 18470-18476.
- Nakaishi T, Iio K, Yamamoto K, Urabe I, Yomo T. 2002.** Kinetic properties of Qbeta replicase, an RNA dependent RNA polymerase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93**: 322-327.
- Neuberger MS, Milstein C. 1995.** Somatic hypermutation. *Current Opinion in Immunology* **7**: 248-254.
- Nilsen H, Stamp G, Andersen S, Hrvnak G, Krokan HE, Lindahl T, Barnes DE. 0.** Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas. *Oncogene* **22**: 5381-5386.
- Nguyen Y.** Unpublizierte Daten (Clontech Manual).
- Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R, Datta N, Falkow S. 1976.** Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriological Reviews* **40**: 168-189.
- Okazaki I, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. 2003.** Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *The Journal of Experimental Medicine* **197**: 1173-1181.
- Perrotta AT, Been MD. 1996.** Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Research* **24**: 1314-1321.
- Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS. 2002.** AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* **418**: 99-104.
- Pfeiffer T, Bonhoeffer S. 2004.** Evolution of cross-feeding in microbial populations. *The American Naturalist* **163**: E126-135.
- Pham P, Bransteitter R, Petruska J, Goodman MF. 2003.** Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424**: 103-107.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. 1989.** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* **8**: 3867-3874.
- Poltoratsky VP, Wilson SH, Kunkel TA, Pavlov YI. 2004.** Recombinogenic Phenotype of Human Activation-Induced Cytosine Deaminase. *J Immunol* **172**: 4308-4313.
- Pomerance M, Thang MN, Tocque B, Pierre M. 1996.** The Ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and mos induction by oncogenic Ras in Xenopus oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 3179-3186.
- Powner MW, Gerland B, Sutherland JD. 2009.** Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **459**: 239-242.
- Pucharcos C, Estivill X, de la Luna S. 2000.** Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Letters* **478**: 43-51.
- Rada C, Williams GT, Nilsen H, Barnes DE, Lindahl T, Neuberger MS. 2002.** Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Current Biology* **12**: 1748-1755.
- Rada C, Milstein C. 2001.** The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J* **20**: 4570-4576.
- Rader C, Barbas CF. 1997.** Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current Opinion in*

Biotechnology **8**: 503-508.

Rao P, Yuan W, Krug RM. 2003. Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J* **22**: 1188-1198.

Reineke LC, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC. 2008. A Small Stem Loop Element Directs Internal Initiation of the URE2 Internal Ribosome Entry Site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 19011-19025.

Resnick RJ, Taylor SJ, Lin Q, Shalloway D. 1997. Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene* **15**: 1247-1253.

Rice MC, Bruner M, Czymbek K, Kmiec EB. 2001. In vitro and in vivo nucleotide exchange directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **40**: 857-868.

Richard S, Yu D, Blumer KJ, Hausladen D, Olszowy MW, Connelly PA, Shaw AS. 1995. Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 186-197.

Roberts RW, Szostak JW. 1997. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12297-12302.

Rodriguez-Cousiño N, Esteban LM, Esteban R. 1991. Molecular cloning and characterization of W double-stranded RNA, a linear molecule present in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of its single-stranded RNA form as 20 S RNA. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 12772-12778.

Rogozin IB, Kolchanov NA. 1992. Somatic hypermutation in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1171**: 11-18.

Rogozin IB, Pavlov YI. 2006. The cytidine deaminase AID exhibits similar functional properties in yeast and mammals. *Molecular Immunology* **43**: 1481-1484.

Rohde N, Daum H, Biebricher CK. 1995. The mutant distribution of an RNA species replicated by Q beta replicase. *Journal of Molecular Biology* **249**: 754-762.

Russell DW, Smith M, Williamson VM, Young ET. 1983. Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 2674-2682.

Russell PJ, Hambidge SJ, Kirkegaard K. 1991. Direct introduction and transient expression of capped and non-capped RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4949-4953.

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning*. CSHL Press.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.

Schäfer T, Borchert TW, Nielsen V, Skagerlind P, Gibson K, Wenger K, Hatzack F, Nilsson L, Salmon S, Pedersen S, Heldt-Hansen H, Poulsen P, Lund H, Oxenbøll K, Wu G, Pedersen H, Xu H. 2007. Industrial Enzymes. *White Biotechnology*. 59-131.

Schenborn ET, Mierendorf RC. 1985. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucl. Acids Res.* **13**: 6223-6236.

Schmidt-Dannert C, Arnold FH. 1999. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends in Biotechnology* **17**: 135-136.

Schuppli D, Miranda G, Tsui HT, Winkler ME, Sogo JM, Weber H. 1997. Altered 3'-terminal RNA structure in phage Q β adapted to host factor-less *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10239-10242.

- Scott J. 1989.** Messenger RNA editing and modification. *Current Opinion in Cell Biology* **1**: 1141-1147.
- Seino A, Yanagida Y, Aizawa M, Kobatake E. 2005.** Translational control by internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1681**: 166-174.
- Sekiguchi M, Hayakawa H, Makino F, Tanaka K, Okada Y. 1976.** A human enzyme that liberates uracil from DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **73**: 293-299.
- Senear AW, Steitz JA. 1976.** Site-specific interaction of Qbeta host factor and ribosomal protein S1 with Qbeta and R17 bacteriophage RNAs. *Journal of Biological Chemistry* **251**: 1902-1912.
- Shah JS, Liu J, Buxton D, Stone B, Nietupski R, Olive DM, King W, Klinger JD. 1995.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from spiked human sputum by Q-beta replicase-amplified assay. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 322-328.
- Shen HM, Poirier MG, Allen MJ, North J, Lal R, Widom J, Storb U. 2009.** The activation-induced cytidine deaminase (AID) efficiently targets DNA in nucleosomes but only during transcription. *The Journal of Experimental Medicine* **206**: 1057-1071.
- Sikorski RS, Hieter P. 1989.** A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Singh MV, Weil PA. 2002.** A method for plasmid purification directly from yeast. *Analytical Biochemistry* **307**: 13-17.
- Smith G. 1985.** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1317.
- Solórzano A, Rodríguez-Cousiño N, Esteban R, Fujimura T. 2000.** Persistent Yeast Single-stranded RNA Viruses Exist in Vivo as Genomic RNA-RNA Polymerase Complexes in 1:1 Stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 26428-26435.
- Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. 1999.** Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 5166-5169.
- Spencer H. 1873.** *The principles of biology*. D. Appleton and Co.
- Stemmer WP. 1994.** Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Sumper M, Luce R. 1975.** Evidence for de novo production of self-replicating and environmentally adapted RNA structures by bacteriophage Qbeta replicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 162-166.
- Takahashi T, Shimoi H, Ito K. 2001.** Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG* **265**: 1112-1119.
- Tanaka A, Shen HM, Ratnam S, Kodgire P, Storb U. 2010.** Attracting AID to targets of somatic hypermutation. *The Journal of Experimental Medicine* **207**: 405-415.
- Taylor SJ, Shalloway D. 1994.** An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* **368**: 867-871.
- Thompson SR, Gulyas KD, Sarnow P. 2001.** Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12972-12977.
- Tretheway DM, Yoshinari S, Dreher TW. 2001.** Autonomous Role of 3'-Terminal CCCA in Directing Transcription of RNAs by Qbeta Replicase. *J. Virol.* **75**: 11373-11383.

Tyagi S, Landegren U, Tazi M, Lizardi PM, Kramer FR. 1996. Extremely sensitive, background-free gene detection using binary probes and beta replicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5395-5400.

Ugarov VI, Demidenko AA, Chetverin AB. 2003. Q β Replicase Discriminates between Legitimate and Illegitimate Templates by Having Different Mechanisms of Initiation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 44139-44146.

Waldron C, Lacroute F. 1975. Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *Journal of Bacteriology* **122**: 855-865.

Wang KC, Patel CA, Wang J, Wang J, Wang X, Luo PP, Zhong P. 2010. Yeast surface display of antibodies via the heterodimeric interaction of two coiled-coil adapters. *Journal of Immunological Methods* **354**: 11-19.

Weissmann C, Feix G, Slor H. 1968. In vitro Synthesis of Phage RNA: The Nature of the Intermediates. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **33**: 83-100.

Wesolowski M, Wickner RB. 1984. Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 181-187.

Widner WR, Matsumoto Y, Wickner RB. 1991. Is 20S RNA naked? *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2905-2908.

Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. 2001. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**: 237-246.

Wong G, Müller O, Clark R, Conroy L, Moran MF, Polakis P, McCormick F. 1992. Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell* **69**: 551-558.

Wormington M. 1993. Poly(A) and translation: development control. *Current Opinion in Cell Biology* **5**: 950-954.

Wu TT, Kabat EA. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *The Journal of Experimental Medicine* **132**: 211-250.

Wu Y, Zhang DY, Kramer FR. 1992. Amplifiable Messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 11769-11773.

Yamamoto T, Moerschell RP, Wakem LP, Ferguson D, Sherman F. 1992. Parameters affecting the frequencies of transformation and co-transformation with synthetic oligonucleotides in yeast. *Yeast (Chichester, England)* **8**: 935-948.

Ye Q, Worman HJ. 1995. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Experimental Cell Research* **219**: 292-298.

Yoshikawa K, Okazaki I, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. 2002. AID Enzyme-Induced Hypermutation in an Actively Transcribed Gene in Fibroblasts. *Science* **296**: 2033-2036.

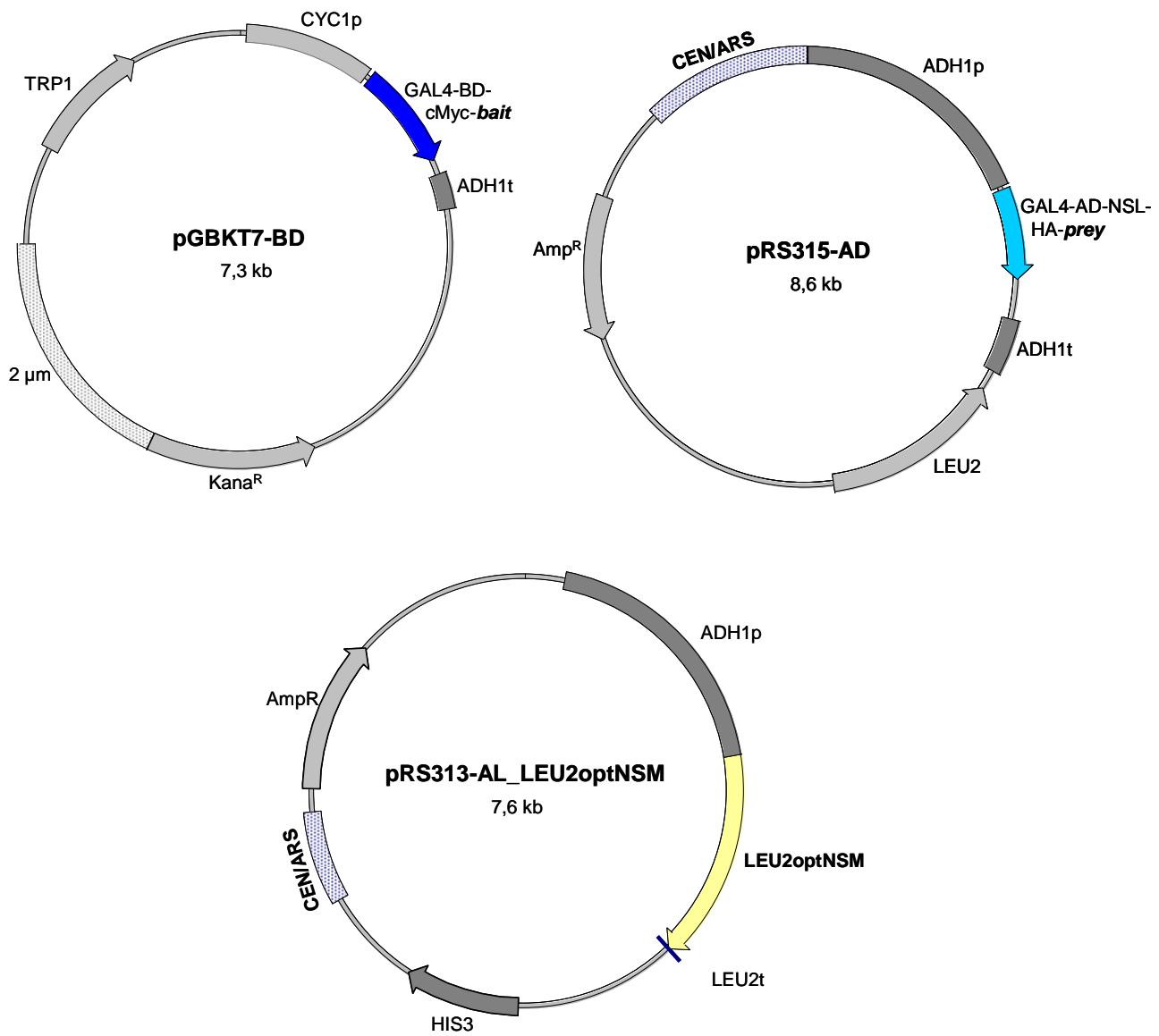
Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JHD, Noller HF. 2001. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* **292**: 883-896.

Zahnd C, Amstutz P, Pluckthun A. 2007. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Meth* **4**: 269-279.

Zhou W, Edelman GM, Mauro VP. 2001. Transcript leader regions of two *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs contain internal ribosome entry sites that function in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1531-1536.

8 ANHANG

8.1 Plasmidkarten



8.2 Nukleinsäuresequenzen der synthetisch hergestellten Gene

8.2.1 Activation-induced cytidine deaminase (AID) (-flag)

```

1  ATGGATTCTT TGTTGATGAA TAGAAGAACAG TTCTTGACCC AATTCAAAAAA TGTTAGATGG
61 GCTAAAGGTA GAAGAGAAC TTATTTGTTG TACGTTGTTA AGAGAAAGAGA TTCTGCTACT
121 TCTTTTCTT TGGATTTCGG TTACTTGAGA AACAAAAACG GTTGTCTATGT TGAATTGTTG
181 TTCTTGAGAT ACATTTCTGA TTGGGATTAA GATCCAGGTA GATGTTATAG AGTTACTTGG
241 TTTACTTTCTT GGTCACCATG TTATGATTGT GCTAGACATG TTGCTGATTT TTTGAGAGGT
301 AATCCAATT TGCTTTGAG AATTTTCACT GCTAGATTGT ACTTTTGTGA AGATAGAAAA
361 GCTGAACCG AAGGTTTGAG AAGATTGCAT AGAGCTGGTG TTCAAATTGC TATTATGACT
421 TTCAAGGATT ACTTTTACTG TTGGAACACT TTTGTTGAAA ACCATGAAAG AACTTTAAA
481 GCATGGGAAG GTTGCATGA AAATTCTGTT AGATTGTCAA GACAATTGAG AAGAATTGGG
541 TTGCCATTGT ACGAAGTTGA TGATTTGAGA GATGCTTTA GAACTTTGGG TTTGGATTAC
601 AAAGATGATG ATGATAAGTA ATAA

```

8.2.2 Ts-His-Tu-Linker-Q β -flag

```

1      ATGGCTGAAA TTACTGCTTC TTTGGTTAAA GAATTGAGAG AAAGAACTGG TGCTGGTATG
61     ATGATTGTA AAAAGGCTTT GACTGAAGCT AATGGTGATA TTGAAATTGGC TATTGAAAAC
121    ATGAGAAAGT CTGGTGTAT TAAAGCTCT AAAAGGCTG GTAAATGTTGC TGCTGATGGT
181    GTTATTAAGA CTAAGATTGA TGGTAACTAC GGTATCATTT TGGAAAGTTAA TTGTCAAACT
241    GATTTCGGT CAAAGATGC TGGTTTCAA GCATTGCTG ATAAAGTTTT GGATGCTGCT
301    GTTGCCTGTA AAATTACTGA TGTTGAAGTT TTGAAGGCTC AATTGAAGA AGAAAGAGTT
361    GCTTGGTTG CTAAAATTGG TGAAAACATT AACATTAGAA GAGTTGCTGC TTTGAAAGGT
421    GATGTTTGG GTTCTTATCA ACATGGTGT AGAATTGGT TTTGGTTGC TGCTAAAGGT
481    GCTGATGAAG AATTGGTTAA GCATATTGCT ATGCATGTTG CTGCTTCTAA ACCAGAGTTC
541    ATTAAGCCAG AAGATGTTT TGCTGAAGTT GTTGAAGAAAG AATACCAAGT TCAATTGGAT
601    ATTGCAATGC AATCTGGTAA ACCAAAAGA ATTGCTGAAA AGATGGTTGA AGGTAGAAATG
661    AAAAGTTTA CTGGTGAAGT TTCTTGTACT GGTCAACCAT TTGTTATGGA ACCATCTAAA
721    ACTGTTGGTC AATTGTTGA AGAACATAAC GCTGAAGTTA CTGGTTTTAT TAGATTGAA
781    GTTGGTGAAG GTATTGAAAA AGTTGAAACA GATTGCTG CCGAAGGTTGC TGCTATGTC
841    AAACAATCTC ATATGTC TAA AGAAAAGTTC GAAAGAACTA AGCCACATGT TAATGTTGGT
901    ACTATTGGTC ATGTTGATCA TGGTAAACT ACTTTGACTG CTGCTATTAC TACTGTTTG
961    GCTAAAACCTT ATGGTGGTGC TGCTAGAGCT TTTGATCAA TTGATAACGC TCCAGAAGAA
1021   AAAGCTAGAG CTATTACTAT TAACACTT CATGTTGAAT ATGATACTCC AACTAGACAT
1081   TATGCTCATG TTGATTGTC AGGTCACTGCT GATTACGTTA AGAATATGAT TACTGGTGC
1141   GCTCAATGG ATGGTGTAT TTTGGTTGTT GCTGCTACTG ATGGTCAAAT CCCACAAACT
1201   AGAGAACATA TTTTGTGGG TAGACAAGTT GGTGTTCCAT ACATTATTGT TTTCTGAAAC
1261   AAGTGTGATA TGGTTGATGA CGAAGAATTA TTGGAATTGG TTGAAATGGA AGTTAGAGAA
1321   TTGTTGTC TATATGATT TCCAGGTGAT GATACACCAA TTGTTAGAGG TTCTGTTTG
1381   AAAGCATTAG AAGGTGATGC TGAATGGAA GCTAAGATCC TGGAACTGGC TGGCTTCTG
1441   GATTCTTACA TTCCGGAAC AGAGCGTGC ATTGACAAAGC CGTCTCTGCT GCCGATCGAA
1501   GACGTATTCT CCATCTCCGG TCGTGGTACCG GTGTTACCG GTCTGTAGA ACGGGTATC
1561   ATCAAAGTTG GTGAAGAAGT TGAAATCGTT GGTATCAAAG AGACTCAGAA CTCTACCTGT
1621   ACTGGCGTT AAATGTTCCG CAAACTGCTG GACGAAGGCC GTGCTGGTGA GAACGTAGGT
1681   GTTCTGCTGC GTGGTATCAA ACGTGAAGAA ATCGAACGTG GTCAAGGTACT GGCTAAGCCG
1741   GGCACCATCA AGCCGACAC CAAGTTCGAA TCTGAAGTGT ACATTCTGTC CAAAGATGAA
1801   GGGGGCGTC ATACTCCGT CTTCAAAGGC TACCGTCCGC AGTCTACTT CCGTACTACT
1861   GACGTGACTG CTACCATCGA ACTGCCGAA GGCCTAGAGA TGTTAATGCC GGGCGACAAAC
1921   ATCAAATGG TTGTTACCTT GATCCACCGG ATCGCGATGG ACGACGGTCT GCGTTTCGCA
1981   ATCCGTGAAG GCGGCCGTAC CGTTGGCGCG GGCCTTGTAG CAAAGTTCT GAGCGGGGCC
2041   TCTGGGGCCG CAGGTGGAGG CGGTTCAAGG GGAGGTGGCT CTATGCTAA GACAGCATCT
2101   TCGCGTAAC TCTCGACGC ACAATTGCGC CGAGCCCGCA ACACAAGAAT TGAGGTTGAA
2161   GGTAACCTCG CACTTTCCAT TGCCAACGAT TTACTGTTGG CCTATGGTCA GTCGCCATT
2221   AACTCTGAGG CTGAGTGAT TTCATTCA CGCGAGATTG ACGGGACCCC CGATGACTTT
2281   AGGATAAATT ATCTTAAAGC CGAGATCATG TCGAAGTATG ACGACTTCAG CTTGGGTATT
2341   GATAGTGAAG CTGTTGCTTGGT GAAAAGTTTT TTGGCTGCTG AAGCAGAATG TGCTTGACT
2401   AATGCTGTT TGTATGTC AGATTACTCT GAAGATTTC AATTTCATT GGGTGAATCT
2461   TGTATTCTATA TGGCTCGTGC TAAAATTGCT AAGTTGATTG GTGATGTTCC ATCTGTTGAG
2521   GGAATGTTGC GTCATTGTC TTTTCTGTT GGTGCTACTA CTACAAACAA TCGTTCTTAT
2581   GGTCATCCAT CTTTTAAGTT TGCTTTGCCA CAAGCATGTA CTCCACGTGC TTTGAAATAC
2641   GTTTGCTT TGCCTGCTTC TACTCATTT GATACTCGT TTTCTGTAT TCTCCATT
2701   AACAAAGCTG TTACTGTTCC AAAAAGCTT AAGACTGATC GTTGTATTG TATTGAACCA
2761   GTTGGAAACA TGTGTTTCA ATTGGGTATT GGTGGTATT TGCGTGATCG TTGCGTTGT
2821   TGGGGTATTG ATTGTAACGA CAAACTATT AATCAACGTC GTGCACACGA AGTTCTGTT
2881   ACAAAACATT TGGCTACTGT TGATTTATCT GCTGCTTCTG ATTCTATTTC TTTGGCTTTG
2941   TGTGAATTGT TGTGCCCCAG AGGTTGGTTT GAAGTTTTAA TGGATTGCG TTCTCCAAA
3001   GTGCTTTGC CAGATGGTC TGTTGTTACT TACGAAAAGA TTCTCTTAT GGGTAATGGT
3061   TACACTTTTG AATTGAAATC TTTGATTTTT GCTTCTTGG CTGCTCTGT TTGTGAATT
3121   TTGGATTTCG ATTCTCTGTA AGTTACAGTT TACGGTGATC ATACATTCTT GCCATCTTGT
3181   GCTGTTCCAG CTTGCGTGA AGTTTTAAG TACGGTTGGT TCACTACTAA TACTAAAAG
3241   ACTTTCTCTG AAGGTCCATT TCGTGAATCT TGTGGTAAAC ATTATTACTC TGTTGTTGAT
3301   GTTACTCCAT TCTACATCGC TCACCGTATT TTTCTCCAG CTGATTGAT TTTGGTTTG
3361   AACAAACTTGT ATCGTTGGGC TACTATTGAT GGTGTTGGG ACCCACGTGC ACATTCTGTT
3421   TACTTGAAGT ACCGTAATT GTGCCAAAA CAATTGCAAC GTAACACTAT TCCAGATGGT
3481   TATGGTGTAG TGCTTCTGTT TGTTCTGTT TTGATTAATC CATTCGCTAA AAATCGTGGT
3541   TGGATACTGTT ACGTTCCAGT TACTACTGAT CATACTCGT ATCGTGAACG TGCTGAATT
3601   GTTCTTATTG TGTACGATTG TTGCTCACGT TGTTGCTCTG AATCTAATGA TGGTTTGCCA
3661   TTGCGTGGTC CATCTGGTTG TGATTTCTG GATTTGTTG TTGATTAATC ATTGATTGTT
3721   CGTTCTAACCC CAACTAAGAT TTCACTGTTCT ACTGGTAAGT TCGATATTCA ATACATTGCT
3781   TGTCTTCAC GTGTTTGGC TCCATATGGT GTTTTCAAG GTACTAAAGT TGCTTCTTG
3841   CATGAAGCTG ATTACAAAGA TGATGATGAT AAGTAATAA

```

8.2.3 S1-flag

```

1      ATGACTGAAT CTTTTGCTCA ATTGTTCGAA GAATCTTGA AAGAAATTGA AACTAGACCA
61     GGTTCTATTG TTAGAGGTGT TGTTGTTGCT ATTGATAAGG ATGTTGTTTT GGTTGATGCT
121    GGTTGAAAT CTGAATCTGC TATTCCAGT GAACAATTAA AGAATGCTCA AGGTGAATTG
181    GAAATTCAAG TTGGTGTAGA AGTTGATTT GCTTGGATC CTGTTGAAGA TGGTTTGCG
241    GAAACTTGT TGTCTAGAGA AAAAGCTAA AGACATGAAG CATGGATTAC TTGGAAGAAAG
301    GCTTATGAAG ATGCTGAAAC TGTTACTGGT GTTATTAAATG GTAAAGTTAA GGGTGGTTTT
361    ACTGTTGAAT TGAACGGTAT TAGAGCTTTT TTGCCAGGTT CTTGGTTGA TGTTAGACCA

```

421 GTTAGAGATA CTTTGCATTT GGAAGGTTAA GAATTGGAAT TTAAGGTTAT TAAGTTGGAT
 481 CAAAGAGAA ACAACGTTGT TGTTTCTAGA AGAGCTGTTA TTGAATCTGA AACTCTGCT
 541 GAAAGAGATC AATTGTTGGA AAATTTGCAA GAAGGTATGG AAGTTAAAGG TATTGTTAAG
 601 AACTTGAATG ATTATGGTGC TTTTGGTTGT TTGGGTGGTG TTGATGGTTT TTGTCATATT
 661 ACTGATATGG CTTGGAAAAG AGTTAAACAT CCATCTGAAA TTGTTAATGT TGGTGATGAA
 721 ATTACTGTTA AGGTTTGAA GTTCGATAGA GAAAGAACTA GAGTTTCTTT GGGTTGAAA
 781 CAATTGGTG AAGATCCATG GGTTGCTATT GCTAAAGAT ATCCAGAAGG TACTAAATTG
 841 ACTGGTAGAG TTACTAATTT GACTGATTAC GGTTGGTTCG TTGAAATTGA AGAAGGTGTT
 901 GAAGGTTTGG TTCACTGTTG AGAAATGGAT TGGACTAACAGA AGAATATTCA CCCTCTAAG
 961 GTTGAAACG TCGGTGACGT TGTTGAAGTT ATGGTACTAG ATATTGATGA AGAGAGGAGA
 1021 AGAATTTCAT TGGGTTTTAA GCAGTGAAA GCTAACTCAT GGCAACAAATT TGCTGAAACT
 1081 CATAACAAAG GTGATAGAGT TGAAGGTAAG ATTAAGTCTA TTACTGATT CGGTATTTTC
 1141 ATTGGTTTGG ATGGTGAAT TGACGGTTA GTTCATTGTT CTGATATTTC TTGGAACGTT
 1201 GCTGGTGAAG AAGCTGTTAG AGAATACAAA AAGGGCGACG AAATTGCTGC TGGTGTGTTG
 1261 CAAGTTGACG CAGAGAGAGA AAGGATATCT TTAGGTGTTA AGCAGTTAGC TGAAGATCCT
 1321 TTCAACAAATT GGGTTGCTTT GAACAAAAAA GGTGCTATTG TTACTGGTAA AGTTACTGCT
 1381 GTTGATGCTA AAGGTGCTAC AGTTGAATTG GCTGATGGTG TAGAAGGCTA TTGAGAGCT
 1441 TCTGAAGCAT CTAGAGATAG GGGTGAGGAT GCTACTTTGG TTTTGTCTGT TGAGATGAA
 1501 GTAGAAGCTA AATTACTGG TGTTGATAGA AAGAATAGAG CTATTCCTT GTCTGTTAGA
 1561 GCTAAAGATG AAGCTGATGA AAAAGATGCT ATTGCTACAG TCAACAAGCA AGAAGATGCT
 1621 AATTTCATA ACAATGCTAT GGCTGAAGCA TTTAAAGCTG CAAAGGTGA AGATTACAAG
 1681 **GATGATGATG ATAAGTAATG A**

8.2.4 Hfq-flag

1 ATGGCTAAAG GTCAATCTT GCAAGATCCA TTTTGAAATG CTTTGAGAAG AGAAAGAGTT
 61 CCAGTTTCAA TTACTTGGT TAATGGTATT AAGTTGCAAG GTCAAATTGA ATCTTTCGAT
 121 CAATTGTTA TTTGTTGAA GAACACTGTT TCTCAATGG TTTACAAGCA TGCTATTTCT
 181 ACTGGTGTTC CATCTAGACC AGTTCTCAT CATTCAAACA ATGCAGGTGG TGTTACTTCT
 241 TCTAATTATC ATCATGGTT TTCAGCTCAA AATACTCTG CTCACAAAGA TTCTGAAGAA
 301 ACTGAGGACT **ATAAAAGATGA CGATGACAAG TAATAG**

8.2.5 LEU2opt

1	ATGTCTGTC CAAAAAAAGAT TGTTGTTTA CCAGGTGATC ATGTAGGTCA AGAAATTACT	LEU2
1C. .T..G.... C..C.....GC. .C..T..... C..A	LEU2optNSM
61	GCTGAAGCTA TCAAAGTTTT GAAAGCCATT TCAGATGTCA GATCTAACGT TAAGTTGAC	LEU2
61	..C.....C. .T..G...C. T.....T.... .T.....TC .T..C..T.. C.....C..T	LEU2optNSM
121	TTCGAAAACC ACTTGATAGG TGGTGCAGCT ATTGATGCAA CTGGTGTCC ATTGCCTGAT	LEU2
121T. .T..A..T..T... ..C.....T. .A..... .C..T..A..	LEU2optNSM
181	GAAGCTTTGG AAGCTTCTAA AAAAGCTGAT GCTGTTTAT TGGGTGCAGT TGGTGGTCCA	LEU2
181	..G..GC...C..C.. G..G..... .C.....G. .A.....T.. G.....T	LEU2optNSM
241	AAGTGGGTA CTGGTTCTGT AAGACCAGAA CAAGGTTGTG TGAAGATCAG AAAAGAATTG	LEU2
241	..A..... .C...AG... T.....T... ..AC .A..A..C. T.....C..T	LEU2optNSM
301	CAATTGTACG CTAATTGAG ACCTTGCAT TTTGCTTCTG ATTCTTTGTT GGATTTGTCT	LEU2
301C..C..A..A..T..CA..C. .C...C..T.. A..C..A..	LEU2optNSM
361	CCAATTAAAC CTCAATTGCG AAAGGGTACT GATTTGTTG TAGTTAGAGA ATTGGTTGGT	LEU2
361C..G. .A.....T.. T..A..... .C..C..... T..C..... .A..G..A	LEU2optNSM
421	GGTATCTATT TCGTAAAG AAAAGAAGAT GATGGTGACG GCGTTGCATG GGACTCAGAA	LEU2
421T..C. .T.....G.. . ..G.....CT. .T..C..T.. . ..TAGT..	LEU2optNSM
481	CAATATACTG TTCCCTGAACT TCAAAGAATT ACTAGAATGG CTGCATTTAT GGCTTTGCAA	LEU2
481C..C.A..... G.....C ..A..... .C..T..C..CC..A..	LEU2optNSM
541	CATGAACCAC CATTACCAAT TTGGAGTTTG GATAAGGCAA ACGTTTTAGC TTCTTCTAGA	LEU2
541G....G..T..TCC...A..T. .T.....G.. C.....A..	LEU2optNSM
601	TTGTGGAGAA AAACAGTTGA AGAAACTATT AAGAATGAAT TTCCAACCTT GAAAGTTCAA	LEU2
601	..A.....T..G.. G.....C..CC.. .C..T..A..G.....	LEU2optNSM
661	CACCAATTAA TAGATTGACG TGCTATGATT TTGGTTAAGA ACCCAACTCA TTTGAATGGT	LEU2
661	..T.....G. .T.....T.. C..C.....C C.A.....C.. CC..A.....	LEU2optNSM
721	ATTATCATTA CCTCTAACAT GTTCGGTGAT ATTATCAGTG ATGAAGCTTC TGTTATTCC	LEU2
721A..C. .AGC.....T..... .C..TCC.C.. C.....C..A	LEU2optNSM
781	GGTTCTTAG GTTTGTTACC ATCTGCTCA TTGGCTTCAT TACAGATAA GAATACTGCT	LEU2
781C..G.G..G..CC..T. .G.....C..C..C..A	LEU2optNSM

841 TTCCGGTTGT ATGAACCAGT TCACGGTTCA GCACCTGATT TACCAAAAAA CAAGGTTAAT *LEU2*
 841 ..T..... .C..... C.....T ..T..A.... .G....G.. T.....C..C *LEU2optNSM*
 901 CCAATTGCTA CTATTTTATC TGCAGCCATG ATGTTAAAGT TGTCTTAAA CTTACCAGAA *LEU2*
 901 ..T..C..C.C..G.. ...T..A...G..A.A..G..G..T... *LEU2optNSM*
 961 GAAGGTAAAG CTATAGAAGA TGCTGTCAAG AAAGTTTTGG ATGCTGGTAT TAGAACAGGT *LEU2*
 961G. .C..T..... .A..T..A ..G..... .A..... C.....T... *LEU2optNSM*
 1021 GACTTGGGTG GTAGTAATTC TACTACTGAA GTTGGGTGATG CAGTTGCTGA AGAAGTAAAA *LEU2*
 1021 ..T..A.... .TCC..CAG ...C..C... ..C..... .T..C..C... ..T..G *LEU2optNSM*
 1081 AAGATTTGG CTTGA *LEU2*
 1081 ..A..CC.T. ...A. *LEU2optNSM*

8.2.6 TRP1opt

1 ATGTCTGTTA TTAATTTCAC AGGTAGTTCT GGTCCATTGG TGAAAGTTTG CGGCTTGCAG *TRP1*
 1A.... .A..C..T.. T..TC...AT..A. ..T..G..A.. ..T.....A *TRP1opt*
 61 AGCACAGAGG CCGCAGAAATG TGCTCTAGAT TCCGATGCTG ACTTGCTGGG TATTATATGT *TRP1*
 61 TCT..T..A. ..T..T..G.. C..AT.G.... .T.....A. ..T..T..A.. C..A..T..C *TRP1opt*
 121 GTGCCAATA GAAAGAGAAC AATTGACCCG GTTATTGCAA GGAAATTTTC AAGTCTTGT *TRP1*
 121 ..T..A..C.A..... C.....T..AA..T. ..A..G..... TTCAT.G..T *TRP1opt*
 181 AAAGCATATA AAAATAGTTC AGGCACTCCG AAATACTTGG TTGGCGTGT *TRP1*
 181T..C. ..G..TC... T..T.....A ..G....A. ..A..T..T.. ..A..A..C..G *TRP1opt*
 241 CCTAAGGAGG ATGTTTTGGC TCTGGTCAAT GATTACGGCA TTGATATCGT CCAAATGCAT *TRP1*
 241 ..A..A.... .C..A..A.. CT.....T..CT..T. ..C.....T.. T...T..A..C *TRP1opt*
 301 GGAGATGAGT CGTGGCAAGA ATACCAAGAG TTCCTCGT *TRP1*
 301 ..T..C..AA GT.....G..T..G..A ..TT..G..A. ..A..T..C.. C..G....T..G *TRP1opt*
 361 GTATTTCATAA AAGACTGCAA CATACTACTC AGTGCAGCTT CACAGAAACC TCATTGTT *TRP1*
 361 ..T..C..T. ..G..T..T..TT..GT..G TC...T..C. ..T..... A..C..T..C *TRP1opt*
 421 ATTCCCTTGT TTGATTCAAG AGCAGGTGGG ACAGGTGAAC TTTTGGATTG GAACTCGATT *TRP1*
 421 ..A..A..A. ..C..C..T.. G..C..A..T ..T..A...T ..G..A..C... ..TAGT..A *TRP1opt*
 481 TCTGACTGGG TTGGAAGGCA AGAGAGCCC GAAAGCTTAC ATTTTATGTT AGCTGGTGG *TRP1*
 481 ..A..T.... .A..C..A... ..ATCT..A ...TCT..G. ..C..C..... G..A..A..T *TRP1opt*
 541 CTGACGCCAG AAAATGTTGG TGATGCGCTT AGATTAATG GCGTTATTGG TGTTGATGTA *TRP1*
 541 T....T..T. ..G..C..A.. C..C..TT..GG..C. ..T..C..A.. C..C..C..T *TRP1opt*
 601 AGCGGAGGTG TGGAGACAAA TGGGTAAAGA GACTCTAACAA AAATAGCAAA TTTCGTCAA *TRP1*
 601 TCT..T.... .T..A..T.. C..C..T..G ..T..A.... .G..T..T.. ..C..T..T..G *TRP1opt*
 661 AATGCTAAGA AATAG *TRP1*
 661 ..C..C.... .G..GA *TRP1opt*

8.2.7 20S-Ribozym

1 GGGGCTGATC CCATGAAGGA ACCAGTAGAC TGCCGTCTTT CGACGCCAGC CGGTTTCTCG
 61 GGGACAGTCC CCCCTCTGG TCGCACTAAG GCGGCCAGGC CGGGAACCAT CCCTGTGAGG
 121 CGTTCGCGTG GAAGCGCGTC TGCCATTACCG GGTAAATCT ACGGTTGGAG CCGTCGACAA
 181 CGGGATAGGT TCGCGATGTT GCTGTCGTCT TTGACCGCGG CTCTCGCGGC CTACTCCGGC
 241 GTCGTCGTTT CCAGAGGTAC ACGCTCTCTA CGGCCATCGA TCCGGTTATT CGGGCGATG
 301 ACGCGTAAGT GGCTTTCAGT GACCGCCCGC GGGAACGGGG TCGAGTTCGC CATCGCTTCT
 361 GCGAAGGAGT TCTCAGGCCG GTGCCGCCGC GGTTGGATTG CGGGGACCGT TCCGGACAC
 421 TTCTTTATGA AGTGGCTTCC GGAACCCGGT CGCCGTAAT CGGGGTTGTG GCCCAGCTT
 481 TCATTCAATTG GACGTTCGCT CCCCAGGGG GGCAGCGCC ATGAAATCGA GGCAGTGGC
 541 AACCCACAAGG CTGCGTTGTC CAGTTCTT GAGGTTCTG CGGACGTACT TACTTCTCTA
 601 AGGAATTACT CAGAGGACTG GGCCCGCCGC CACCTCGCTG CGGATCCTGA TCCTTCGCTG
 661 CTCCTGTGAGC CCTGTACGGG TAACAGGCCA ACCTGCGAAC GGACTCGCCG CGAGGGTGGT
 721 TTTGCACAAAT CTATCACTGA CTTGGTTTCG TCCTCACCCA CTGACAACCT CCCTCCCCCTT
 781 GAGTCGATGC CCTTCGGGCC GACCCAAGGC CAGGGCTTGC CAGTGCACGT GCTCGAGGT
 841 TCTCTCTCTC GATACCAAA TGGCTCAGAC CCTAAGGGTA GAGTCTCTGT CGTGAGGGAG
 901 AGAGGCCACA AGGTCCGTGT GGTCTCTGCA ATGGAGACTC ACGAACTTGT ACTCGGTAC
 961 GCGGCTAGGC GCAGACTCTT TAAGGGACTG CGTCGTGAGC GTGCTTTGAG GGACACCCCTC
 1021 AAGGGTACT TCGAGGGCAG AACCAAGGC TTTGTGGTT GTGCTGGTAC TGTTATCTCA
 1081 TCAGATATGA AATCTGCTC GGACCTCATC CCTCTATCGG TCGCTTCTGC GATCGTAGAT
 1141 GGTCTGGAGG CCTCTGGTAG ACTCCTACCT GTCGAGATAG CTGGTTGCG GGCCTGTACT
 1201 GGCCCTCAGC ACTTAGTCTA CCCTGACGGT TCTGAAATCA CCACACGGCG AGGGATCCTT

1261 ATGGGACTCC CCACCACGTG GGCGATTCTG AATCTCATGC ACCTATGGTG CTGGGATTCT
 1321 CGGGATCGTC AGTATAGATT AGAGGGACAT CCCTTCGGCC CCACGGTTAG ATCGGATTGT
 1381 CGCGTTTGC GCGACGATCT AATCGGGCTG GGTCCGGACT CCTTACTACG GTCTTATGAC
 1441 CGCAATTGG GTCTGGTTGG GATGATCCTC TCCCCCTGGCA AGCACTTCCG CAGTAACAGG
 1501 AGGGGGTTT TCCTCGAGCG TTTACTCGAG TTCCAGACCC GTAAAACCGT GTACGAACAC
 1561 GCTGTGATTT ACCGTAAGGT AGGTACCCGT CGCGTGCCTG TGGATCGGTC TCACATTCCC
 1621 GTCGTACCC GAGTGACCGT CCTGAATACC ATCCCACCTA AAGGGTTGGT TCAGGCTTCG
 1681 GTTCTCGGTC GTGACGATCC TCCCCGTTGG TGGGCTGCGG CGTGGCGGA ATCTTCACTG
 1741 CTCAGTGAATC ATCCTCGTAA GAAGATATTC GCTGCAGCAC GGACTCTCCG CCCTGGCCTC
 1801 TCCCGCAAT TCAGAAGGT GGGAACTCCA CCATTCCTC CCGGTGAAC CCGGGCGCA
 1861 GGCTTGGTC GACCTTCCGA TCGTGTGAC GCCCCGTGCGT TCCACAGGAA AGCCATTCT
 1921 TCCCTGGTGT GGGGCTCTGA TGCCACTGCT GCATACAGTT TTATCCGTAT GTGGCAGGGG
 1981 TTGGAGGGCC ACCCTTGAA AACGGCGGC TCACAGGAGA CTGACACTTG GTTCGGCGAC
 2041 TATAAGGTCA CCCGGCCGG TAAGATGTAC CCAGACCGTT ACGGCTTTCT TGATGGAGAG
 2101 TCTCTTCGGA CCAAGTCAAC TATGTTGAAC TCGGCGTCT ATGAGACTTT TCTCGGACCT
 2161 GACCCGTACG CCACCCATTAA CCCTTCCTG CGAACATCGT CCAGTAGACT CGCGAAGGTC
 2221 CGGAAGGATT GTGTTAACATCG GTGGCCATCG GTCAAGGCGG TGGGAAAGGA TCTTGGTACT
 2281 ATCTTAGAAG CTTTCGAAGA GTCAAAGTT TGCAACCTTT GGGTGACACC TTACGACGCT
 2341 TCGGGCTACT TTGATGATTC CTTGTTACTG ATGGATGAGA GCGTGTACCA ACGTAGATTC
 2401 CGGCAACTGG TCATTGCCGG CTTGATGCGT GAGGGCCGGA TGGGCGACTT ATTGTTCCC
 2461 AACTGGCTTC CACCATCCAC CGTGGTCTCG GGTTTCCCT GAGGCCACGG CCCC~~GGGT~~CG
 2521 **GCATGGCATC** TCCACCTCT CGCGGTCCGA CTTGGGCATC **CGAAGGAGGA** CGTCGTCCAC
 2581 **TCGGATGGCT** AAGGGA

8.2.8 23S-Ribozym

1 GGGCCATGC ATCACAAGGT TAATGTGAAA ACACAGCGAG AAGTCCATT CCCAATGGAC
 61 CTCTTGCAGAAG CCTGTGGTGC ATCTGCCCA AGGCCAGTT CCCGTGTTTC ACCTGCAACC
 121 GACCTAGACC GACGCTACAG GTGCGTCTC AGTTTACCTG AGGAGCGTGC TCCAGTGT
 181 GGGTGTAAAT GTGCGTCGAC CCGAGCGGG TTACGACGTG GACTCGAGGA CCTTGGCTCC
 241 CGCGAGTTCC GCGTCGTTT GCGTTGGCG GACGATTGCT GGCGCGCGAT CTGCGCGGCC
 301 GTCTGCACGG GTCGGAAGTT TCCCTCCTC TCGGTGACAG ATCGGCCGGC AAGAGCACGC
 361 CTTGCAAAAG TCTACCGTAT GGGTCGTCGA CTGCTAGTAG GTGTGGTCTG CCGAGGCGAA
 421 TCGTCGTTT CCGACCTCAA GCAGGACGTG GCAGATTGCG GGGTGTGAT CCTCGAAGGG
 481 TCCACCCGGA TCCCCTGCCAG TTCCCTTATGG GGAAGCTGTC GGGCTTGGG TTGGACCTCT
 541 CCGGAGGGG CGATGCGACT GACGTTCATC GGCGGGCTC TCCCTTATGG GAGTCCAGAC
 601 GTTGAGCGTC GTGCTCTCG CTCACATGCC GCCACTCTGT CCATCCCCGC TGAGTGCAT
 661 CCTAACTACC TCGTAGGCCG GGAACAATTG CGAAATCCT GGGCAGATGA TAACCTGCC
 721 CGGAAATTCC GGATTTATCC CATTGCGGT CAGGAGTCCT CCTGTATGGA GTACTCCGT
 781 GCGCAAGGCG GTCTACTGCA GTCGTTTAGG AAAGGCTTTG TGCGGTACGA TCCCGCGGCC
 841 CCTTCGGCAG ACCCTGATGA TCTCGAGTTG GCAAAGGAGC GTGGATTCTC TCGAATCCGC
 901 GCCTCTGGT ACTCCACTT CCGTATCGC GGAGAGTTGA AGTCCACCAA TCAGTCTCTC
 961 GAGGCCGGG TCGCTGTTG CCTCGAGAG GGGTCAAGG CGAGGATTGT GACCACGCC
 1021 AGCGCATCGC GCGTGACGTT CGGTACATCA TTCCGGCTT ACCTCCTCCA GGGGATCAGG
 1081 CGACACCCGG CTCTGGTTGA CGTGATTGGA GGCGATCATA GACGAGCTGT CGAAACTATG
 1141 GATGGCAGT TCGGCCTGTT AAGGCCAGAT GGTGTTTGC TTTCCGGGA CTTGACGTCA
 1201 GCATCTGACC GGATACCCCA TGACTTGGTG AAAGCATTG TGCGGGGCAT CTTCTGGAT
 1261 CCTGATCGAC GTCCCTCCGG AACGTCCTT GCGGACGTTT TCGACCTCGT CCTCGGACCC
 1321 TATCACCTTC ACTACCTGT CGGTAGTGA GTGACCGTTC GTCAAGGGAAAT CCTTATGGG
 1381 CTCCCGACGA CTCGGCTCT GCTATGTCAT ATCCACCTGT TCTGGTGGAA ACTCTCCGAT
 1441 TGGGCCCCCG CGCGTCCTAA TCAATTGCGC GGGTTTGTCC TGCGGGAGTC CTTCAGAATT
 1501 TGTGGCAGC ACCTGATTGC TTGGTGGCGA CCCGAAAGGA TCGCCCTCTA CAATCAGATT
 1561 GCGCTAGACT GCGGAGCCCA GTTTCAGCG GGGAAAGCACC TCGAGTCGAA AACTGGGGG
 1621 ATCTTCACTG AAAAGGTTT CACGGTTAAA CCGTGAAGA TGAAGGTCCG GTTCGCTCT
 1681 GAGGCATCTT TGAAGGGCTA CGTGTCTCC CGATCTAGTG CCTTCTCCGT CGGAATGGG
 1741 GGAAAGGCC TAACTGGTAT CGGGGCCGGC CGGCTATACA CCATCGGAGC GATGCTCTCG
 1801 TGGAGTCGTC GCATCCGGGA TGTCTATCCG GTTCCGCTC AACATCGTAC TGCTTCTCAG
 1861 CGGTACGGT AACCGGTTAC TGTGTACCG TTTGGTCGCT GGTCCATCCGC AATTCCACTT
 1921 CGGTGGCTG TTGGGGCCCG CACCGTAGC GTGGGGAACC CTGTCAGTC CTTACCGGAT
 1981 TGGGTCACGG TGGGACCGAG TGCTTCTCG GTCGCTGCTG ATTCAAACGC CTTTGGGGCG
 2041 GTATCGAGGG TCCTTCGACG GATGTTCCCG GGTTTACCCC GGAAACTTGC GTCAGCGGGC
 2101 ATTCCTCCGT ACCTCCCTG GGTGTTTGGC GGCAGCGGTG TGGTGAATGC CACCGGACTC
 2161 ACAACTAAGA TCGGGGCCGT TGCTTCCCG CGCTGATGTA GTCGGATCGG GCACGATCTT
 2221 TATAGATCCC GTGAGAGGAA GTGCGACGTTA GGGAGGGTGT GGACACTGTC CACATCCCC
 2281 GCTTACCGC CTCCTCCCA CGAGGTGGAG AAGTTCATGG ACCGCCCCGA CATCATCTT
 2341 ACGAGGAAGT GTCGGAACCC CATGCTGAAG CATGCTCGGG AACTCGGTTT ATTGAGGAG
 2401 GTTTTCGAGA GTCGGGTGGG AGGTGGAATC CTATGGCCTT CCCTTAATGG AAAAGCCATT
 2461 GTGGAATCCC ACTCCCCCTC GATCCTCCAA GTCTCCCGA ATCTCCGGCG ATCCCTTGCG
 2521 TGCCCCAGTG GGGGTTTCTT CAGACCATCT GCCCTATAG GGAAGCTGGT CCAACGACAT
 2581 ACGTTGCTC GGGGAACCGT CTGGTTCTTA GAAAGTCCCG CGACCGACTC GGCCCGTCAG
 2641 GGAGGGATGG GTCTGCCACC ACCACCCAGG CGCCCTCTAG GCGGAGGTGG GATGGGGGG
 2701 CGGCCACAC CTCCTTCTAT GGGCCTTCGC CGCGAATCAT CAGTTCCCTAC TAGTGTCTCA
 2761 TTTACACCTT CAATGTTCTC TGAACGCCCT GCTGCGTTAG AGTCATTGTT CGGCCGCCCG
 2821 CCACCTTCAT GATGGCAGAA CGGGGAAACT CGTCCGCTC AGGCACGGTA TAATTACCG
 2881 GCCTGAGCCC CGGGTGGCA TGGCATCTCC ACCTCTCGC GGTCCGACCT GGGCATCCGA
 2941 **AGGAGGACGT** CGTCCACTCG **GATGGCTAAG** GGAG

DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation bedanke ich mich in erster Linie beim Vorstand der Geneart AG. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Betreuung. Die fachliche Kompetenz und Diskussionsbereitschaft waren stets eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die Betreuung seitens der Universität und die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) bedanke ich mich sehr für die finanzielle Förderung.

Mein außerordentlicher Dank gilt Dr. Michael Liss für die herausfordernde Themenstellung und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Durch zahlreiche Diskussionen und sein Ideenreichtum leistete er wertvolle Hilfestellungen.

Vielen Dank an Melanie für die gute Zusammenarbeit und den regen Gedankenaustausch. Meinen Laborkollegen Maren, Daniela, Melanie, Claudi, Lissy, Kristina und Stefan danke ich sehr für das entspannte Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und amüsante Zeit im Laboralltag und darüber hinaus.

Des Weiteren danke ich all denen, die mich während der Entstehungszeit dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Die Mittagspausen und die abwechslungsreichen Freizeitgestaltungen waren ein toller Ausgleich.

Nicht zuletzt geht mein ganz spezieller Dank an meine lieben Eltern, die immer an mich geglaubt haben, mich zu jeder Zeit unterstützt und seelischen Beistand geleistet haben. Darüber hinaus danke ich dir, Martin, für deine Liebe und Gelassenheit, dass ich mich jederzeit an deiner Schulter anlehnen konnte und du mir die Stärke gegeben hast, auch in den stressigen Abschnitten an mich selbst zu glauben.