

# Die Rolle des Zellproliferationsproteins Cdc123 bei der Initiation der Translation



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

vorgelegt von

Angelika Perzlmaier, geb. Batke

aus

Augsburg

im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 18.11.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift: \_\_\_\_\_

## Inhaltverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Der Zellteilungszyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>13</b>
3.1.1 Der Ablauf des Zellteilungszyklus.....	13
3.1.2 Die Regulation des Zellteilungszyklus .....	15
3.1.3 Der Arrest des Zellteilungszyklus durch Paarungsfaktoren.....	18
<b>3.2 Die Initiation der Translation .....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Der Mechanismus der Translationsinitiation.....	19
3.2.1.1 Der kanonische Mechanismus der Translationsinitiation .....	19
3.2.1.2 Varianten der Translationsinitiation.....	22
3.2.2 Der Translationsinitiationsfaktor eIF2.....	23
3.2.2.1 Aufbau von eIF2 und Bildung des ternären Komplexes .....	24
3.2.2.2 Der GTP/GDP-Zyklus von eIF2 .....	26
3.2.3 Die Regulation der Translationsinitiation.....	28
3.2.3.1 Die Regulation der Translationsinitiation durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ .....	29
3.2.3.2 Weitere Mechanismen zur Regulation der Translationsinitiation.....	32
<b>3.3 Cdc123 .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>37</b>
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Cdc123-Defekte verursachen einen Gcd<math>^{-}</math>-Phänotyp .....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Die rezessiven Allele <i>cdc123Δ327</i> und <i>cdc123-1</i> führen zu einem Gcn2-unabhängigen Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression .....	38
4.1.2 Die Überexpression von Cdc123(C144S) verursacht eine erhöhte <i>GCN4</i> -Expression .....	40
<b>4.2 Cdc123 bindet an monomeres Gcd11 .....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Cdc123 interagiert mit monomerem Gcd11, nicht mit dem eIF2-Komplex.....	42
4.2.2 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist direkt .....	43

<b>4.3 Cdc123 fördert die Interaktion der eIF2-Untereinheiten.....</b>	<b>45</b>
4.3.1 Die Depletion von Cdc123 verringert die Assoziation der eIF2-Untereinheiten und verursacht einen Arrest in der G1-Phase .....	45
4.3.2 Nur die Depletion von Cdc123, aber nicht die Depletion von Initiationsfaktoren verringert die Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten .....	48
4.3.3 Die Interaktion von eIF2 mit eIF2B ist bei <i>cdc123Δ327</i> reduziert .....	52
4.3.4 Eine gesteigerte Sui2-Gcd11-Interaktion supprimiert die Deletion von <i>CDC123</i> .....	53
<b>4.4 Analyse der funktionellen Bedeutung von Regionen und einzelnen Aminosäuren von Cdc123 .....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Die N-terminale Verkürzung von Cdc123 um 56 Aminosäuren ist letal.....	55
4.4.2 Die Kombination von S157A mit weiteren S/T-Austauschen führt zu temperatursensitivem Wachstum .....	56
4.4.3 Die Kombination von N- und C-terminalen Verkürzungen und S/T-Austauschen führt zu dosisabhängigen Wachstumsproblemen .....	58
4.4.4 Der N-Terminus von Cdc123 ist wichtig für die Interaktion mit Gcd11 .....	60
<b>4.5 Cdc123 interagiert mit der C-terminalen Domäne von Gcd11 .....</b>	<b>61</b>
4.5.1 Die C-terminale Region von Gcd11 ist hinreichend und notwendig für die Bindung an Cdc123.....	62
4.5.2 Eine C-terminale Verkürzung von Gcd11 führt zu verringelter Interaktion mit Cdc123, reduzierter eIF2-Komplexbildung und Letalität .....	64
<b>4.6 Die Funktion von Cdc123 ist nicht auf neu synthetisiertes Gcd11 beschränkt .....</b>	<b>65</b>
<b>4.7 Die Phosphorylierung von Cdc123 in wachsenden Zellen.....</b>	<b>68</b>
4.7.1 Cdc123 ist ein Phosphoprotein.....	68
4.7.2 Der C-terminale Bereich von Cdc123 ist phosphoryliert.....	70
<b>4.8 Die induzierte Phosphorylierung von Cdc123 .....</b>	<b>71</b>
4.8.1 Die Überexpression der Kinasen Yck1, Yck2, Cdc15 und Mps1 führt zur Hyperphosphorylierung von Cdc123.....	72
4.8.2 DNA-Schäden führen zur Hyperphosphorylierung von Cdc123 .....	79
<b>4.9 Die Rolle von eIF2 und Cdc123 bei Verschlechterung des Nährstoffangebots .....</b>	<b>86</b>
4.9.1 Die Relokalisation von eIF2 bei Aminosäuremangel ist bei <i>cdc123Δ327</i> beeinträchtigt .....	87
4.9.2 Die Manipulation der eIF2-Menge beeinträchtigt das Wachstum abhängig von der Kohlenstoffquelle .....	89
<b>4.10 Die Rolle von eIF2 und Cdc123 bei einem Arrest des Zellzyklus .....</b>	<b>94</b>

<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2 Die Assemblierung von eIF2 durch Cdc123 .....</b>	<b>103</b>
<b>5.3 Die Phosphorylierung von Cdc123.....</b>	<b>107</b>
<b>5.4 Cdc123 und die Zellzyklusprogression .....</b>	<b>110</b>
5.4.1 Der Einfluss von Cdc123 auf die Zellzyklusprogression.....	110
5.4.2 Der Einfluss der Zellzyklusprogression auf Cdc123 .....	111
<b>5.5 Die Rolle von Cdc123 bei Nährstoffmangel.....</b>	<b>113</b>
5.5.1 Cdc123 und die Bildung von eIF2-Foci bei Aminosäuremangel.....	113
5.5.2 Die Rolle von Cdc123 und eIF2 bei Glukosemangel.....	114
5.5.3 Cdc123 und die Phosphorylierung von eIF2.....	116
<b>5.6 Eine potentielle Rolle von Cdc123 in der Humanpathologie .....</b>	<b>118</b>
<b>6. MATERIAL.....</b>	<b>120</b>
<b>6.1 Antikörper und Antiseren .....</b>	<b>120</b>
6.1.1 Primäre Antikörper und Antiseren.....	120
6.1.2 Sekundäre Antikörper .....	120
<b>6.2 Nukleotide .....</b>	<b>121</b>
<b>6.3 Enzyme und Proteine.....</b>	<b>121</b>
<b>6.4 Chemikalien .....</b>	<b>121</b>
<b>6.5 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>123</b>
<b>6.6 Geräte und Software .....</b>	<b>124</b>
6.6.1 Geräte.....	124
6.6.2 Software .....	126
<b>6.7 Medien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>126</b>
6.7.1 Bakterienmedien.....	126
6.7.2 Hefemedien und deren Stammlösungen .....	127
6.7.3 Puffer und Lösungen .....	129
<b>6.8 Oligonukleotide.....</b>	<b>132</b>
<b>6.9 Plasmide und Vektoren .....</b>	<b>134</b>
<b>6.10 Hefestämme.....</b>	<b>137</b>

<b>7. METHODEN.....</b>	<b>142</b>
<b>    7.1 Arbeiten mit Bakterien.....</b>	<b>142</b>
7.1.1 Kultivierung von Bakterien .....	142
7.1.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation .....	142
7.1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	142
7.1.2.2 Elektroporation.....	143
<b>    7.2 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>143</b>
7.2.1 Kultivierung von Hefestämmen.....	143
7.2.1.1 Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren.....	143
7.2.1.2 Zellzyklusarrests.....	144
7.2.2 Konservierung von Hefestämmen.....	144
7.2.3 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen .....	144
7.2.4 Kreuzung von haploiden Hefestämmen .....	145
7.2.5 Sporulation von diploiden Hefestämmen und Tetradenanalyse .....	145
7.2.6 Transformation von Hefen mit der Lithiumacetat-Methode .....	146
<b>    7.3 Fixierung, Färbung, Mikroskopie und Durchflusszytometrie .....</b>	<b>146</b>
7.3.1 Ethanol-Fixierung von Hefezellen.....	146
7.3.2 Färbung der DNA mit Sytox Green und Durchflusszytometrie .....	146
7.3.3 Färbung mit DAPI und Mikroskopie.....	148
7.3.4 Mikroskopie von lebenden Zellen .....	148
<b>    7.4 Genetische und molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>149</b>
7.4.1 DNA-Isolation.....	149
7.4.1.1 Präparation von high-copy-Plasmiden aus <i>E. coli</i> : Kochlysat-Methode .....	149
7.4.1.2 Präparation von low-copy-Plasmiden aus <i>E. coli</i> : alkalische Lyse.....	149
7.4.1.3 Säulenreinigung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> : Mini- und Midipreps .....	150
7.4.1.4 Isolation von genomischer DNA aus Hefe .....	150
7.4.1.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe .....	151
7.4.1.6 Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung.....	151
7.4.2 PCR.....	151
7.4.2.1 PCR von DNA-Fragmenten für die Klonierung .....	152
7.4.2.2 PCR zur homologen Rekombination .....	152
7.4.2.3 PCR zur ortsspezifischen Mutagenese .....	153
7.4.2.4 Kontrolle der Integration mittels Kolonie-PCR .....	153
7.4.2.5 Analyse des Paarungstyps mittels MAT-PCR .....	154
7.4.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung .....	154

---

7.4.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen und Isolation der DNA-Fragmente.....	155
7.4.5 Ligation.....	156
7.4.6 Sequenzierung.....	156
<b>7.5 Proteinanalytische Methoden.....</b>	<b>156</b>
7.5.1 Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus Bakterien.....	156
7.5.1.1 Testexpression.....	156
7.5.1.2 Zellaufschluss mittels French Press .....	157
7.5.1.3 Interaktionstest mittels mbp-Affinitätspräzipitation .....	157
7.5.1.4 Reinigung von mbp-Fusionsproteinen.....	158
7.5.1.5 Reinigung von his6-Fusionsproteinen .....	158
7.5.2 Proteinlysate aus Hefen .....	158
7.5.3 Bradford-Tests.....	159
7.5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test .....	159
7.5.3.2 Verfolgung von Proteinreinigungen mittels Bradford-Schnelltest .....	159
7.5.4 Immunpräzipitation.....	160
7.5.4.1 Co-Immunpräzipitation .....	161
7.5.4.2 Behandlung mit $\lambda$ -Phosphatase .....	161
7.5.5 Reinigung von Proteinen für die Massenspektrometrie .....	161
7.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	162
7.5.7 Färbung von SDS-Gelen.....	163
7.5.7.1 Rapid Stain-Färbung .....	163
7.5.7.2 Silbernitrat-Färbung .....	163
7.5.8 Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen .....	164
<b>7.6 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) .....</b>	<b>165</b>
<b>7.7 Analyse der Expression des <i>GCN4-lacZ</i>-Reporters: ONPG-Test.....</b>	<b>166</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>167</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>174</b>
<b>9.1 Translationsinitiationsfaktoren .....</b>	<b>174</b>
9.1.1 Translationsinitiationsfaktoren in <i>S. cerevisiae</i> .....	174
9.1.2 Sequenzvergleich und Domänen von Gcd11 .....	175
<b>9.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen .....</b>	<b>177</b>
9.2.1 Zeitreihen zur Depletion von eIF2B und Immunpräzipitation von Gcd11-myc .....	177
9.2.2 Suppression der <i>CDC123</i> -Deletion durch Überexpression von eIF2-Untereinheiten.....	178

9.2.3 N-terminale Verkürzungen von Cdc123: Proteinmengen .....	178
9.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zur Identifizierung von Cdc123-Interaktionspartnern .....	179
9.2.5 Reinigung von flag-Cdc123 und Cdc123-flag für die Massenspektrometrie .....	181
9.2.6 Überexpression von Kinasen .....	182
9.2.6.1 Ergebnisse des Screens.....	182
9.2.6.2 Einfluss der Kinase-Überexpression auf das Wachstum.....	184
9.2.7 Wachstumstest zur MMS-Sensitivität .....	186
9.2.8 Cdc123, eIF2 und der Einfluss der Kohlenstoffquelle.....	188
9.2.8.1 Analyse weiterer Kohlenstoffquellen .....	188
9.2.8.2 Getrennte Überexpression von <i>GCD11</i> und <i>SUI2</i> .....	188
9.2.8.3 Überexpression von <i>SUI3</i> und <i>CDC123</i> .....	189
9.2.8.4 Effekt der Kohlenstoffquelle auf die Mobilität der eIF2B-Untereinheit Gcd2 .....	191
<b>9.3 Produktion und Affinitätsreinigung von Antiseren .....</b>	<b>192</b>
9.3.1 Produktion eines Antiserums gegen Cdc123.....	192
9.3.2 Affinitätsreinigung von α-Cdc123.....	193
9.3.3 Affinitätsreinigung von α-Gcd11 .....	195
<b>9.4 Verzeichnisse.....</b>	<b>197</b>
9.4.1 Nomenklatur, Einheiten und Abkürzungen .....	197
9.4.2 Abbildungsverzeichnis .....	201
9.4.3 Tabellenverzeichnis .....	203
<b>10. LEBENSLAUF .....</b>	<b>204</b>
<b>11. DANKSAGUNG.....</b>	<b>205</b>

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Cdc123 wurde ursprünglich als Zellproliferationsfaktor identifiziert, welcher sowohl in einer Zelllinie von Rattenfibroblasten (Ohno et al., 1984), als auch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Richter, 2006) essentiell für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ist. Weitere Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* brachten Cdc123 mit der Initiation der Translation in Verbindung (Richter, 2006). Insbesondere wurde eine Interaktion von Cdc123 mit der γ-Untereinheit des heterotrimeren Initiationsfaktors eIF2 nachgewiesen (Bieganowski et al., 2004). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die essentielle Funktion von Cdc123 in der Assemblierung des eIF2-Komplexes aus seinen drei Untereinheiten besteht. In *cdc123*-Mutanten ist die Assoziation der eIF2-Untereinheiten verringert (Richter, 2006). Außerdem kann die gemeinsame Überexpression von *SUI2* und *GCD11*, welche die α- und γ-Untereinheiten von eIF2 codieren, die Letalität der *CDC123*-Deletion supprimieren (Richter, 2006). Die Rolle von eIF2 bei der Translationsinitiation besteht in der Rekrutierung der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA (Jackson et al., 2010; Schmitt et al., 2010). Darüber hinaus ist eIF2 ein wichtiger Ansatzpunkt für die Regulation der Translationsinitiation. Verschiedene Stresssituationen, z.B. Aminosäuremangel, führen zur Phosphorylierung von eIF2 an der α-Untereinheit, was eine Reduktion der Translationsinitiationsrate zur Folge hat (Hinnebusch, 2005; Proud, 2005).

In dieser Arbeit konnte zum einen die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 genauer charakterisiert und die essentielle Rolle von Cdc123 für die Assemblierung und Funktionalität von eIF2 bestätigt werden. Zum anderen konnte die Phosphorylierung von Cdc123 nachgewiesen und Verknüpfungen von Cdc123 mit der Regulation von eIF2 hergestellt werden.

Mittels Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass Cdc123 bevorzugt mit monomerem Gcd11 (eIF2γ) und nicht mit dem heterotrimeren eIF2-Komplex interagiert. Durch heterologe Expression in *E. coli* und Interaktionsstudien konnte außerdem die direkte Wechselwirkung von Cdc123 und Gcd11 bestätigt werden. Zur Identifizierung der für die Interaktion wichtigen Regionen wurden Verkürzungen von Cdc123 und Gcd11 im Hefe-Zwei-Hybrid-System analysiert. Im Fall von Cdc123 ist möglicherweise der N-terminale Bereich an der Interaktion mit Gcd11 beteiligt, es scheint aber keine eigenständige Domäne zur Interaktion zu geben. Im Gegensatz dazu ist bei Gcd11 die C-terminale Domäne (Domäne III) hinreichend und notwendig für die Interaktion: Ein C-terminales Fragment von Gcd11 (Aminosäuren 410-527) zeigte im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine ähnlich starke Interaktion mit Cdc123 wie Wildtyp-Gcd11 (1-527), wohingegen eine C-terminale Verkürzung von Gcd11 um nur 13 Aminosäuren (1-514) zu einem Verlust der Interaktion mit Cdc123 führte. Eine entsprechende Verkürzung der endogenen *GCD11*-Kopie (*gcd11Δ514-ha*) ist im haploiden Zustand letal. Durch Immunpräzipitation aus heterozygot diploiden Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion

von Gcd11Δ514-ha mit Cdc123 deutlich reduziert ist, ebenso die Interaktion mit Sui2 (eIF2 $\alpha$ ) und Sui3 (eIF2 $\beta$ ). Angesichts der Tatsache, dass weder Sui2 noch Sui3 direkt an Domäne III von Gcd11 binden (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007), bestätigt dies die Bedeutung der Cdc123-Gcd11-Interaktion für die Assemblierung des eIF2-Komplexes.

Die Rolle von Cdc123 für den eIF2-Komplex zeigte sich auch in Depletionsexperimenten: Nach Repression der *CDC123*-Expression (mit Hilfe des regulierbaren *GALL*-Promotors) nahm die Assoziation der drei eIF2-Untereinheiten ab. Dies hatte auch eine verringerte Interaktion mit dem Nukleotidaustauschfaktor eIF2B zur Folge. Der beobachtete Zerfall von eIF2 ist kein allgemeiner, sekundärer Effekt einer beeinträchtigten Translationsinitiation, da er bei Depletion anderer Initiationsfaktoren, wie z.B. eIF4E (Cdc33) oder eIF5 (Tif5), nicht auftrat.

Cdc123 liegt unter Standard-Wachstumsbedingungen in phosphorylierter Form vor, wofür der C-terminale Bereich (AS 341-360) entscheidend ist. Außerdem führt die Überexpression bestimmter Kinasen zu einer Hyperphosphorylierung von Cdc123. Bei den Kinasen handelt es sich um Cdc15 (eine Komponente des mitotic exit network), Mps1 (beteiligt an der Duplikation des Spindelpolkörpers und am Spindelassemblierungskontrollpunkt) und den funktionell redundanten Typ I-Caseinkinasen Yck1 und Yck2. Die Relevanz der Cdc123-Hyperphosphorylierung ist jedoch unklar, da keine Auswirkungen auf Integrität oder Funktionalität des eIF2-Komplexes eintraten. Eine Hyperphosphorylierung von Cdc123 trat auch bei bestimmten Deletionsmutanten (*sgs1Δ*, *slx5Δ*, *slx8Δ*), welche die Genomstabilität beeinträchtigen, und bei Behandlung der Zellen mit dem mutagenen Agens MMS auf. Die Behandlung mit MMS führte außerdem zu einem Anstieg der *GCN4*-Expression, welcher auf eine eingeschränkte Funktionalität von eIF2 hinweist. Dieser Anstieg war jedoch unabhängig von Cdc123. Vielmehr scheint MMS den bekannten eIF2-Regulationsweg zur Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  zu aktivieren.

Des Weiteren ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise, dass Cdc123 als eIF2-Assemblierungsfaktor eine Rolle für die Adaptation an das Nährstoffangebot spielt. Bei Aminosäuremangel führt die Aktivierung der Kinase Gcn2 zur Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ , was eine unproduktive Bindung von eIF2 an eIF2B und damit die Inhibition der Translationsinitiation zur Folge hat (Hinnebusch, 2000; Hinnebusch, 2005). Dies geht einher mit der verstärkten Lokalisation von eIF2 und eIF2B in cytoplasmatischen Foci (Campbell et al., 2005). Die Lokalisation von eIF2 in den Foci ist bei *cdc123*-Mutanten beeinträchtigt, vermutlich auf Grund der verringerten Assoziation der eIF2-Untereinheiten. Andererseits scheint eine zu hohe Menge an eIF2-Komplexen bei einer ungünstigen Kohlenstoffquelle schädlich zu sein: In Raffinose/Galaktosemedium hat die gemeinsame Überexpression der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten oder aller drei Untereinheiten von eIF2 einen Anstieg der *GCN4*-Expression, welcher eine eingeschränkte Funktionalität von eIF2 anzeigen, zur Folge – allerdings nur, wenn Cdc123 zur Assemblierung der eIF2-Untereinheiten vorhanden ist.

## 2. ABSTRACT

Cdc123 was originally identified as a cell proliferation factor, which is involved in the G1/S transition of the cell cycle in a rat fibroblast cell line (Ohno et al., 1984) and in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Richter, 2006). Studies in *Saccharomyces cerevisiae* then linked Cdc123 to the translation initiation (Richter, 2006). In particular, Cdc123 was reported to interact with the  $\gamma$ -subunit of the heterotrimeric translation initiation factor eIF2 (Bieganowski et al., 2004). Indeed the essential function of Cdc123 was shown to consist in the assembly of the eIF2 complex from its three subunits. The association of eIF2 subunits is reduced in *cdc123* mutants (Richter, 2006). Moreover, the combined overexpression of *SUI2* and *GCD11*, encoding the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits of eIF2, rescues otherwise lethal *cdc123* deletion mutants (Richter, 2006). During the translation initiation process eIF2 recruits the methionyl-initiator-tRNA (Jackson et al., 2010; Schmitt et al., 2010). Furthermore, eIF2 is a key target for the regulation of translation initiation. Different stresses, for example amino acid scarcity, lead to the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , resulting in the reduction of the translation initiation rate (Hinnebusch, 2005; Proud, 2005).

This thesis provides a more detailed characterization of the interaction of Cdc123 and Gcd11 and it corroborates the importance of Cdc123 for eIF2 assembly and function. In addition, the phosphorylation of Cdc123 was demonstrated and links between Cdc123 and the regulation of eIF2 were established.

As determined by immune-precipitation, Cdc123 preferentially binds to monomeric Gcd11 (eIF2 $\gamma$ ), not to the heterotrimeric eIF2 complex. Direct interaction of Cdc123 and Gcd11 was confirmed by heterologous expression in *E. coli* and subsequent interaction studies. To identify regions that are important for the interaction of Cdc123 and Gcd11, truncations of both proteins were analysed by the yeast-two-hybrid method. The N-terminal region of Cdc123 might be involved in the interaction with Gcd11, but there appears to be no discrete interaction domain. In contrast, the C-terminal domain (domain III) of Gcd11 is necessary and sufficient for the interaction with Cdc123: In the yeast-two-hybrid system, a C-terminal Gcd11 fragment (amino acids 410-527) interacted with Cdc123 as strongly as wildtype-Gcd11 (1-527), while a C-terminal Gcd11 truncation by only 13 amino acids (1-514) abolished the interaction with Cdc123. A corresponding truncation of the endogenous copy of *GCD11* (*gcd11* $\Delta$ 514-ha) does not support viability of haploid yeast cells. By immune-precipitation from heterozygous diploid strains, the interaction of Gcd11 $\Delta$ 514-ha with Cdc123 was found to be severely reduced, as was the interaction with Sui2 (eIF2 $\alpha$ ) and Sui3 (eIF2 $\beta$ ). Since neither Sui2 nor Sui3 bind to domain III of Gcd11 directly (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007), this result corroborates the importance of the Cdc123 – Gcd11 interaction for the assembly of the eIF2 complex.

## Abstract

---

Depletion studies provided further evidence for the relevance of Cdc123 for the eIF2 complex: Upon repression of *CDC123* expression (by means of the regulable *GALL* promoter), the association of the three eIF2 subunits decreased, resulting also in reduced interaction of eIF2 with its nucleotide exchange factor eIF2B. The observed eIF2 disassembly is not a general, secondary consequence of impaired translation initiation, as it did not occur upon depletion of other initiation factors, such as eIF4E (Cdc33) or eIF5 (Tif5).

Cdc123 is phosphorylated under standard growth conditions and the phosphorylation sites lie in its C-terminal region (amino acids 341-360). In addition, the overexpression of certain kinases causes Cdc123 hyperphosphorylation. The identified kinases are Cdc15 (a component of the mitotic exit network), Mps1 (involved in spindle pole body duplication and the spindle assembly checkpoint) and the functionally redundant type I casein kinases Yck1 and Yck2. However, the relevance of the Cdc123 hyperphosphorylation remains obscure, since no effects on integrity or functionality of the eIF2 complex were observed. Hyperphosphorylation of Cdc123 was also observed in some deletion mutants (*sgs1Δ*, *sly5Δ*, *sly8Δ*) which affect genome stability and upon exposure of cells to the mutagenic substance MMS. Besides, MMS treatment caused an elevated expression of *GCN4*, which indicates impaired eIF2 function. However, the increase of *GCN4* expression was independent of Cdc123. Rather MMS appears to activate the well-known pathway for eIF2 regulation operating through eIF2 $\alpha$  phosphorylation.

Furthermore, evidence was obtained for a possible role of the eIF2 assembly factor Cdc123 in the adaptation to nutrient availability. Upon amino acid deprivation, the kinase Gcn2 is activated and phosphorylates eIF2 $\alpha$ , resulting in an unproductive interaction of eIF2 with eIF2B and therefore in the inhibition of translation initiation (Hinnebusch, 2000; Hinnebusch, 2005). This is accompanied by increased localization of eIF2 and eIF2B to cytoplasmic foci (Campbell et al., 2005). The foci localization of eIF2 is compromised in *cdc123* mutants, probably because of the reduced association of eIF2 subunits. On the other hand, excessive amounts of eIF2 complex seem to be harmful in the absence of glucose, the preferred carbon source of budding yeast: In raffinose/galactose medium the combined overexpression of the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits or all three subunits of eIF2 causes increased *GCN4* expression, indicating impaired eIF2 function – but only, if Cdc123 is present to assemble the eIF2 complex.

### 3. EINLEITUNG

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung der Funktion von Cdc123 in *Saccharomyces cerevisiae*. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein beliebter Modellorganismus, da sie als einzelliger Ascomycet zu den einfachsten Eukaryoten zählt. Viele Gene der Bäckerhefe, wie auch *CDC123*, sind bei höheren Eukaryoten bis hin zum Menschen konserviert. Zu den Vorteilen von *Saccharomyces cerevisiae* als Studienobjekt zählt, dass sie leicht zu kultivieren ist und eine kurze Generationszeit besitzt. Außerdem ist das Hefegenom vollständig sequenziert und genetische Methoden sind gut etabliert. Die Bäckerhefe ist im haploiden Zustand kultivierbar, wodurch sich die Auswirkungen von genetischen Veränderungen einfach untersuchen lassen (Morgan, 2007).

In früheren Studien wurde Cdc123 mit zwei grundlegenden Prozessen in Verbindung gebracht: dem Zellteilungszyklus und der Translationsinitiation. Die folgenden Kapitel (3.1 und 3.2) bieten einen allgemeinen Überblick über diese Prozesse, bevor das bisherige Wissen zur Rolle von Cdc123 erläutert wird (Kapitel 3.3).

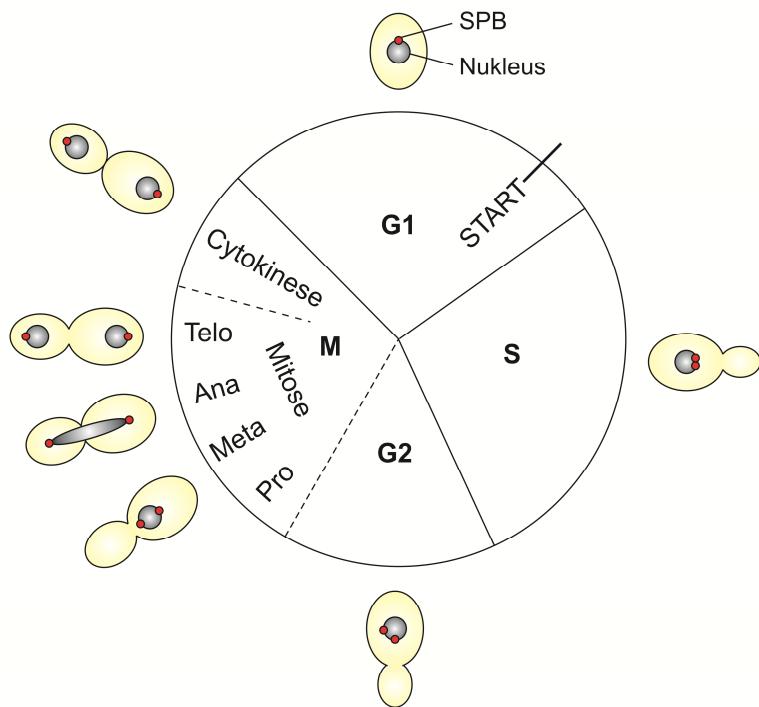
#### 3.1 Der Zellteilungszyklus in *Saccharomyces cerevisiae*

##### 3.1.1 Der Ablauf des Zellteilungszyklus

Der Zellteilungszyklus der Hefe lässt sich wie bei anderen Eukaryoten in vier Phasen unterteilen (Abb. 3.1): In der S-Phase findet die Verdopplung der DNA statt und in der M-Phase wird das genetische Material auf die Tochterzellen verteilt und die Zellen getrennt. Zwischen den S- und M-Phasen liegen jeweils sogenannte Gap-Phasen (G1 und G2), wobei im Gegensatz zu höheren Eukaryoten die G2-Phase in *Saccharomyces cerevisiae* nicht deutlich ausgeprägt ist (Morgan, 2007).

Die G1-Phase dient hauptsächlich zum Wachstum der Zellen. Allerdings finden bereits erste Vorbereitungen für die Replikation der DNA statt: So werden im Rahmen des origin licensing Prä-Replikationskomplexe an den Replikationsursprüngen assembliert. In der späten G1-Phase wird die Entscheidung für den irreversiblen Eintritt in den Zellzyklus getroffen. Dieser Kontrollpunkt wird als START oder bei höheren Eukaryoten als „restriction point“ bezeichnet. Neben der Zellgröße beeinflussen auch äußere Faktoren, wie die Anwesenheit von Nährstoffen oder Pheromonen (vgl. 3.1.3), den Eintritt in den Zellteilungszyklus. Nach dem Überschreiten von START ist die Zelle darauf festgelegt, den ganzen Zellzyklus zu durchlaufen, auch wenn sich die anfangs günstigen Bedingungen ändern.

In der S-Phase werden die DNA repliziert und Histone synthetisiert, außerdem wird der Spindelpolkörper (spindle pole body, SPB) dupliziert. Der Spindelpolkörper in *Saccharomyces cerevisiae* stellt das Äquivalent zum Centrosom höherer Eukaryoten dar und dient als Mikrotubuli-Organisationszentrum für die mitotische Spindel.



**Abbildung 3.1: Der eukaryotische Zellteilungszyklus am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae***

Der Zellzyklus lässt sich in die G1-, S-, G2- und M-Phase unterteilen. Das Überschreiten von START in der späten G1-Phase stellt den irreversiblen Eintritt in den Zellzyklus dar und zieht die Ausbildung der Knospe, die Replikation der DNA und die Verdopplung des Spindelpolkörpers (SPB) nach sich. Die G2-Phase ist in Hefe nicht deutlich ausgeprägt. Die M-Phase lässt sich in die Mitose (Kernteilung) und Cytokinese (Zellteilung) untergliedern, wobei sich die Mitose in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilen lässt. [Abbildung nach (D'Amours und Amon, 2004; Humphrey und Pearce, 2005)]

Die M-Phase umfasst die Verteilung des genetischen Materials in der Mitose und die Trennung der Tochterzellen in der Cytokinese. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten löst sich bei *Saccharomyces cerevisiae* die Kernhülle während der Mitose nicht auf, weshalb man von einer geschlossenen Mitose oder Endomitose spricht. Die Mitose lässt sich in vier Phasen unterteilen: In der Prophase werden die Chromosomen durch Kondensation kompaktiert und die Assemblierung des Spindelapparats beginnt, welche in der Metaphase vervollständigt wird. Am Ende der Metaphase sind alle Kinetochore an die Spindel gebunden, wobei Schwesterchromatiden von Mikrotubuli verschiedener Spindelpolkörper kontaktiert werden. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten findet in *Saccharomyces cerevisiae* keine Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene statt. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden getrennt: Die Kohäsion der Schwesterchromatiden wird aufgelöst und der Spindelapparat zieht die Schwesterchromatiden zu entgegengesetzten Polen der Zelle. Nach Abschluss der Separation der Schwesterchromatiden wird der Spindelapparat in der Telophase aufgelöst. In der anschließenden Cytokinese werden die Tochterzellen getrennt, was im Fall von *Saccharomyces cerevisiae* durch die Kontraktion des Akto-Myosin-Rings, Membransynthese und die Synthese des chitinhaltigen Septums erfolgt (Morgan, 2007).

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* vermehrt sich durch Knospung, was sich auch in der englischen Bezeichnung budding yeast widerspiegelt. Die Knospungsstelle wird in der G1-Phase festgelegt. Nach Überschreiten von START wächst die Knospe zunächst apikal auf Grund der Polarisation des Aktinzytoskeletts zur Knospenspitze hin, in der G2/M-Phase erfolgt der Übergang zum isotropen Wachstum. Bei der Cytokinese ist die Knospe etwas kleiner als die Mutterzelle, was in einer asymmetrischen Teilung resultiert (Morgan, 2007).

### 3.1.2 Die Regulation des Zellteilungszyklus

Der Zellteilungszyklus ist ein komplexer Prozess, der streng reguliert werden muss, um die korrekte Weitergabe der Erbinformation zu gewährleisten. Zahlreiche Regulatoren sorgen dafür, dass die einzelnen Schritte richtig und in festgelegter Reihenfolge ablaufen. Dabei spielt die Begrenzung der Aktivität von Regulatoren auf bestimmte Zellzyklusphasen eine wichtige Rolle, welche über phasen-spezifische Expression, Modifikation (insbesondere Phosphorylierung) und Degradation erreicht wird. Anfang der 1970er Jahre isolierten Hartwell und Kollegen temperatursensitive Hefemutanten, welche bei restriktiver Temperatur an einem bestimmten Punkt im Zellzyklus arretierten. Dadurch konnten zahlreiche *CDC* (*cell division cycle*)-Gene identifiziert werden, deren Produkte für die Zellzyklusprogression benötigt werden (Hartwell et al., 1970; Hartwell et al., 1973).

Ein zentraler Regulator des Zellzyklus ist die zyklinabhängige Kinase (*cyclin dependent kinase*, CDK) Cdc28. Ihre Aktivität und Substratspezifität wird durch die Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten, den sogenannten Zyklinen, reguliert. Außerdem ist die Phosphorylierung durch eine CDK-aktivierende Kinase (*CDK activating kinase*, CAK) notwendig für die Aktivität der CDK. Weiterhin kann die CDK-Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung von Cdc28 und durch Assoziation mit Inhibitoren, den sogenannten CKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*), reguliert werden. Die CDK steuert den Zellzyklus durch phasen-spezifische Phosphorylierung von über 70 Zielproteinen, wobei die Phosphorylierung bevorzugt an Serin- oder Threoninresten in der Konsensussequenz S/T P X K/R stattfindet (Enserink und Kolodner, 2010).

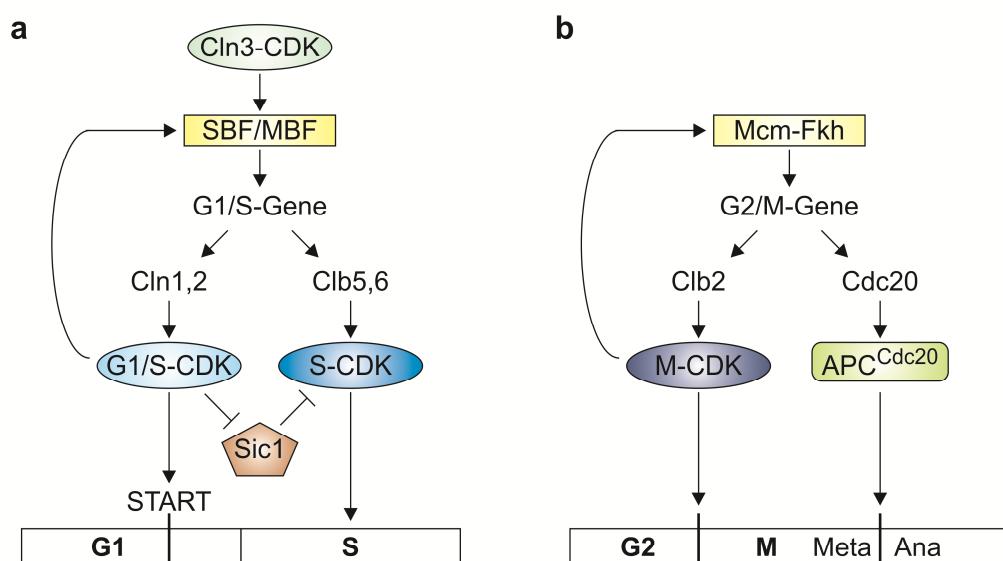
Die Zykline erhielten ihren Namen auf Grund ihres periodischen Auftretens im Zellzyklus. Ihre Bindung an Cdc28 bewirkt eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Kinase, wodurch die Kinaseaktivität stimuliert wird. Außerdem spielen die Zykline eine Rolle für die Substratspezifität der CDK. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es neun Zykline: Die drei G1-Zykline (Cln1-3) steuern den G1/S-Übergang, während die sechs B-Typ-Zykline (Clb1-6) die S- und M-Phase regulieren.

Wichtig für das periodische Auftreten von Regulatoren wie den Zyklinen oder CKIs ist neben der phasenspezifischen Expression auch die Regulation der Proteindegradation. Dabei spielen zwei RING-Ubiquitin-Ligasen eine wichtige Rolle: der SCF und der APC. Der SCF-Komplex ist nach drei seiner Untereinheiten benannt (Skp1, Cullin und F-Box-Proteinen) und seine Substratspezifität wird durch

Assoziation mit verschiedenen F-Box-Proteinen bestimmt. Der  $\text{SCF}^{\text{Cdc}4}$  ubiquitinisiert die CKIs Sic1 und Far1 und der  $\text{SCF}^{\text{Grr}1}$  die Zykline Cln1 und Cln2. Somit kontrolliert der SCF wichtige Regulatoren des G1/S-Übergangs, dagegen wird der APC (anaphase promoting complex) später im Zellzyklus aktiv. Nach Assoziation mit dem Aktivator Cdc20 leitet der APC in der Anaphase den Abbau von Securin und damit die Aufhebung der Schwesterchromatid-Kohäsion ein. Weitere Substrate des  $\text{APC}^{\text{Cdc}20}$  sind die B-Typ-Zykline, deren Ubiquitinierung in der G1-Phase vom  $\text{APC}^{\text{Cdh}1}$  fortgesetzt wird. Die Ubiquitinierung durch SCF und APC wird durch die CDK gesteuert. Im Fall des SCF ist die Phosphorylierung der Substrate die Voraussetzung für die Assoziation der Substrate mit den F-Box-Proteinen. Beim APC reguliert die CDK die Assoziation des APC mit seinen Aktivatoren: Die Bindung von Cdc20 an den APC wird durch Phosphorylierung von APC-Untereinheiten stimuliert, wohingegen die Bindung von Cdh1 an den APC durch Phosphorylierung von Cdh1 inhibiert wird (Morgan, 2007).

Im Folgenden wird das Zusammenspiel der beschriebenen Zellzyklusregulatoren näher erläutert (Abb. 3.2). In der G1-Phase ist die CDK-Aktivität gering, da einerseits der  $\text{APC}^{\text{Cdh}1}$  den Abbau der B-Typ-Zykline fördert und andererseits die Zyklin-Expression niedrig ist. Eine Ausnahme bildet Cln3, welches in der G1-Phase exprimiert wird und dadurch akkumuliert. Zunächst werden die Cln3-CDK-Komplexe durch den Inhibitor Far1 inaktiv gehalten. Überschreitet jedoch die Cln3-Menge eine bestimmte Schwelle, so reicht die Far1-Menge nicht mehr aus (Alberghina et al., 2004). Die aktiven Cln3-CDK-Komplexe phosphorylieren Far1, woraufhin dieses über den  $\text{SCF}^{\text{Cdc}4}$  zum Abbau bestimmt wird. Durch diese positive Rückkopplung kommt es zu einem raschen Anstieg der Cln3-CDK-Aktivität. Die Cln3-CDK aktiviert daraufhin die Transkriptionsfaktoren SBF (SBF binding factor) und MBF (MBF binding factor), unter anderem durch Phosphorylierung von deren Inhibitor Whi5. Der SBF, bestehend aus Swi4 und Swi6, steuert die Expression von Genen für den G1/S-Übergang, insbesondere der Zykline Cln1 und Cln2. Der MBF aus Mbp1 und Swi6 stimuliert die Expression von Genen für die DNA-Replikation, einschließlich der S-Phasen-Zykline Clb5 und Clb6. Die Clb5/6-CDK-Komplexe werden zunächst durch Sic1 inhibiert. Die Cln1/2-CDK-Komplexe sind hingegen aktiv und fördern den G1/S-Übergang. Die Phosphorylierung von Sic1 durch die Cln1/2-CDKs führt über den  $\text{SCF}^{\text{Cdc}4}$  zum Abbau von Sic1 und somit zur Aktivierung der Clb5/6-CDKs, welche die S-Phase steuern. Der Anstieg der CDK-Aktivität in der späten G1-Phase und der S-Phase führt zur Inhibition von  $\text{APC}^{\text{Cdh}1}$ . Daraufhin führt die basale Expression der M-Phasen-Zykline Clb1-4 zu einer geringen Menge an aktiven M-CDKs, welche den Transkriptionsfaktor Mcm1-Fkh stimulieren, welcher die Expression von M-Phase-Regulatoren, u.a. von M-Phasen-Zyklinen und Cdc20, steuert. Die M-CDKs fördern den Eintritt in die Mitose und die Ausbildung der Spindel. Die Aktivierung des  $\text{APC}^{\text{Cdc}20}$  stimuliert den Metaphase-Anaphase-Übergang. Zum einen sorgt der  $\text{APC}^{\text{Cdc}20}$  für den Abbau von Securin (Pds1 in Hefe), welches die Separase (Esp1) inhibiert. Daraufhin spaltet die Separase die Scc1-Untereinheit

der Kohäsin-Komplexe und ermöglicht so die Trennung der Schwesterchromatiden. Außerdem leitet der APC<sup>Cdc20</sup> die Degradation der S- und M-Phasen-Zykline ein, wodurch die CDK-Aktivität sinkt. Parallel dazu wird in der Anaphase über die Signalwege FEAR (Cdc fourteen early anaphase release) und MEN (mitotic exit network) die Phosphatase Cdc14 aus dem Nukleolus freigesetzt, welche CDK-Substrate dephosphoryliert. Die Abnahme der CDK-abhängigen Phosphorylierung führt einerseits zur Aktivierung des APC<sup>Cdh1</sup>, welcher für den weiteren Abbau der B-Typ-Zykline sorgt, und andererseits zur Stimulation der Transkriptionsfaktoren Swi5 und Ace2, welche unter anderem die Expression des CKI Sic1 stimulieren. Dies führt zur niedrigen CDK-Aktivität in der G1-Phase (Morgan, 2007; Enserink und Kolodner, 2010).



**Abbildung 3.2: Die Regulation der Zellzyklusprogression in G1- und S-Phase (a) bzw. G2- und M-Phase (b)**

- a,** Während der G1-Phase akkumuliert das Zyklin Cln3, wodurch die Cln3-CDK in der späten G1-Phase aktiv wird. Diese aktiviert über die Transkriptionsfaktoren SBF und MBF die Expression von G1/S-Genen, darunter die Zyklingene *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* und *CLB6*. Der Anstieg an Cln1 und Cln2 führt zur Stimulation der G1/S-CDK, welche den Eintritt in den Zellteilungszyklus auslöst. Außerdem führt die Aktivität der G1/S-CDK zur Degradation des CKI Sic1 und dadurch zur Aktivierung der S-CDKs.
- b,** Die basale Expression der M-Zykline *CLB1-4* führt in Abwesenheit von APC-Aktivität zur Aktivierung von M-CDKs, welche in Form einer positiven Rückkopplung die Expression von M-Zyklinen und damit den Eintritt in die M-Phase stimulieren. Die Expression von *CDC20* führt schließlich zur Aktivierung des APC<sup>Cdc20</sup>, welcher den Metaphase-Anaphase-Übergang einleitet. [Abbildung nach (Morgan, 2007)]

### 3.1.3 Der Arrest des Zellteilungszyklus durch Paarungsfaktoren

Bei der Bäckerhefe gibt es in haploidem Zustand zwei verschiedene Paarungstypen, welche als a und  $\alpha$  bezeichnet werden. Treffen zwei Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp aufeinander, so fusionieren sie zu einer diploiden Zygote. Dies ist nur möglich, wenn sich die haploiden Zellen in der G1-Phase befinden und somit ihre DNA noch nicht repliziert haben. Um den Zellzyklus in der G1-Phase zu arretieren und die Paarung einzuleiten, geben die Zellen paarungstyp-spezifische Pheromone (sogenannte Mating-Faktoren) ab. Diese binden an Rezeptoren in der Plasmamembran von Zellen des anderen Paarungstyps und lösen eine Signalkaskade aus: Auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors ist ein heterotrimeres G-Protein gebunden. Wird der Rezeptor durch Bindung des Pheromons an der extrazellulären Seite aktiviert, so stimuliert er die Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Daraufhin löst sich das Dimer aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Ste4 und Ste18) von den  $\alpha$ -Untereinheit (Gpa1) und interagiert mit Ste5 und Ste20. Ste5 ist ein Gerüstprotein für die Kinasen Ste11, Ste7 und Fus3, welche eine MAP-Kinase-Kaskade bilden. Die Rekrutierung von Ste20 führt zur Aktivierung von Ste11, welches Ste7 phosphoryliert, welches wiederum Fus3 phosphoryliert. Dieses wandert daraufhin in den Nukleus, wo es zum einen die Paarung durch Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren stimuliert und zum anderen Far1 phosphoryliert. Die Inhibition der Cln1/2/3-CDKs durch Far1 führt daraufhin zum Arrest in der G1-Phase (Morgan, 2007; Enserink und Kolodner, 2010).

## 3.2 Die Initiation der Translation

Der letzte Schritt der Genexpression ist die Translation, bei welcher anhand der Sequenz der mRNA ein Protein synthetisiert wird. Die Translation wird von den Ribosomen katalysiert. Eukaryoten haben 80S Ribosomen, welche aus einer 40S und einer 60S Untereinheit bestehen. Die Translation gliedert sich in drei Schritte: Initiation, Elongation und Termination. Bei der Initiation werden die ribosomalen Untereinheiten und die mit Methionin beladene Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) zur mRNA rekrutiert und am Startcodon positioniert. Während der Elongationsphase findet die Proteinsynthese statt: Nach Etablierung der Wechselwirkung zwischen dem Codon der mRNA und dem Anticodon einer tRNA katalysiert die 60S Untereinheit des Ribosoms die Bildung der Peptidbindung. Bei Erreichen des Stopcodons kommt es zur Termination, wobei das synthetisierte Polypeptid freigesetzt wird und die Ribosomen von der mRNA dissoziieren. Für alle drei Phasen der Translation werden spezifische weitere Faktoren benötigt: die eukaryotischen Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren (eIF: eukaryotic initiation factor, eEF: eukaryotic elongation factor, eRF: eukaryotic release factor).

### 3.2.1 Der Mechanismus der Translationsinitiation

Bei den meisten eukaryotischen mRNAs wird das 40S Ribosom zur Cap-Struktur am 5'Ende der mRNA rekrutiert, danach bewegt es sich in 3'Richtung (Scanning) und identifiziert das erste AUG-Codon als Startcodon. Dieser Prozess, an welchem zahlreiche Translationsinitiationsfaktoren beteiligt sind (vgl. Tabelle 9.1 im Anhang), wird auch als kanonischer Mechanismus der Translationsinitiation bezeichnet und lässt sich in mehrere Schritte unterteilen (Abb. 3.3): Die Bildung des 43S Präinitiationskomplexes, die Bindung dieses Komplexes an die mRNA, das Scanning, die Startcodonerkennung und die Anlagerung des 60S Ribosoms (Jackson et al., 2010).

#### 3.2.1.1 Der kanonische Mechanismus der Translationsinitiation

Für die Initiation der Translation werden freie 40S und 60S Ribosomen benötigt. Im Gegensatz zu Prokaryoten gibt es in Eukaryoten keinen spezifischen Faktor, der zur Freisetzung und Dissoziation der Ribosomen nach der Termination führt (Pestova et al., 2007). Allerdings fördern mehrere Initiationsfaktoren die Dissoziation bzw. verhindern die Assoziation von 40S und 60S Untereinheiten. Dazu zählen die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und möglicherweise auch eIF6, wobei die Rolle von eIF6 bei der Translationsinitiation unklar ist (Jackson et al., 2010).

Die 40S Ribosomen bilden mit den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 und eIF5 und der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) den 43S Präinitiationskomplex (43S PIC). Zunächst wird die Met-tRNA<sub>i</sub> von dem G-Protein eIF2 gebunden, wodurch der ternäre Komplex (ternary complex, TC) aus eIF2, GTP und Met-tRNA<sub>i</sub> entsteht (vgl. Abschnitt 3.2.2). In Hefe bildet der ternäre Komplex zusammen mit eIF1, eIF3 und eIF5 den Multifaktorkomplex (multifactor complex, MFC), welcher durch zahlreiche Interaktionen der beteiligten Initiationsfaktoren stabilisiert wird: Die C-terminale Domäne (CTD) von eIF5 interagiert mit eIF1, eIF2β und eIF3c. eIF1 interagiert außerdem mit eIF2β und eIF3c und zusätzlich bindet eIF2β an eIF3a (Hinnebusch et al., 2007). Der MFC bindet mit Unterstützung von eIF1A an das 40S Ribosom: Die Bindung von eIF1 und eIF1A führt zu einer Konformationsänderung des 40S Ribosoms, welche die Öffnung des mRNA-Kanals bewirkt (Mitchell und Lorsch, 2008; Jackson et al., 2010; Hinnebusch, 2011).

Eine weitere Gruppe von Initiationsfaktoren bindet an die 5'Cap-Struktur der mRNA: Der eIF4F-Komplex besteht aus dem Cap-bindenden Protein eIF4E, dem Gerüstprotein eIF4G und der DEAD-Box-Helikase eIF4A, welche Sekundärstrukturen der mRNA auflöst. eIF4B (und in Vertebraten eIF4H) stimulieren die Aktivität von eIF4A, möglicherweise indem sie von eIF4A entwundene mRNA binden und so die Wiederausbildung von Sekundärstrukturen verhindern (Jackson et al., 2010). Nachdem Sekundärstrukturen in der Nachbarschaft der 5'Cap-Struktur aufgelöst wurden, kann der 43S PIC rekrutiert werden. In Vertebraten ist dabei die Interaktion von eIF4G mit eIF3 wichtig, in Hefe jedoch ist keine Interaktion dieser Initiationsfaktoren nachweisbar, allerdings interagiert eIF4G mit eIF5

(Hinnebusch et al., 2007). Neben der 5'Cap-Struktur spielt auch der PolyA-Schwanz am 3'Ende der mRNA eine Rolle bei der Translationsinitiation: Durch die Interaktion des PolyA-bindenden Proteins (PABP, in Hefe: Pab1) mit eIF4G kommt es zur Zirkularisierung der mRNA. Für diese Interaktion von 5'- und 3'Ende der mRNA werden mehrere Funktionen diskutiert: die Inhibition des mRNA-Abbaus, die Kontrolle, dass nur vollständige mRNAs translatiert werden, die Unterstützung der Interaktion des eIF4F-Komplexes mit der 5'Cap-Struktur und die erleichterte Rekrutierung von Ribosomen, welche sich nach der Termination in der Nähe der 5'Cap-Struktur befinden (Hentze et al., 2007).

Nach der Bindung des 43S PIC an das 5'Ende der mRNA erfolgt das Scanning: Die Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A sind wichtig für die „offene“ Konformation des Ribosoms, welche das Scanning erlaubt (Mitchell und Lorsch, 2008). Die Bewegung des Ribosoms in 3'Richtung erfolgt unter ATP-Hydrolyse, wobei jedoch noch unklar ist, ob die Energie für die Bewegung selbst oder für die Auflösung von mRNA-Sekundärstrukturen benötigt wird. Für die Auflösung der Sekundärstrukturen könnte eIF4A oder eine andere DEAD-Box-Helikase, z.B. Ded1, verantwortlich sein. Ebenfalls unklar ist, ob eIF4G während des Scannings an eIF4E, an das scannende Ribosom oder an beide gebunden bleibt (Jackson et al., 2010). Das Startcodon wird primär durch Basenpaarung des AUG-Codons mit dem Anticodon der tRNA erkannt. Allerdings beeinflussen die umgebenden Sequenzen auf der mRNA die Erkennung des Startcodons. In Vertebraten gilt die Kozak-Sequenz CC(A/G)CCAUGG als optimaler Kontext, wobei die Purinbase an Position -3 und das G an +4 besonders wichtig sind (Kozak, 2002). In Hefe ist die Kontext-Abhängigkeit weniger stark ausgeprägt (Donahue, 2000), allerdings gibt es eine Präferenz für A an Position -3 (Chen et al., 2008; Hinnebusch, 2011). eIF1 spielt eine zentrale Rolle bei der Inhibition der Translationsinitiation an nicht-AUG-Codons. Nach korrekter Basenpaarung von AUG-Codon und tRNA<sub>i</sub>-Anticodon bewegt sich eIF1 von der P-Stelle des Ribosoms weg und eIF1A bindet stärker an die 40S Untereinheit, wodurch das Ribosom in die „geschlossene“ Konformation übergeht. Daraufhin stimuliert eIF5 die GTPase-Aktivität von eIF2, es kommt zur GTP-Hydrolyse und Freisetzung von P<sub>i</sub> (detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 3.2.2.2). In GDP-gebundenem Zustand hat eIF2 eine geringere Affinität für Met-tRNA<sub>i</sub>, deshalb dissoziiert eIF2-GDP zum Teil vom Ribosom (Jackson et al., 2010).

Der Initiationsfaktor eIF5B bindet nun an das 40S Ribosom und stimuliert die Anlagerung der 60S Untereinheit. In diesem Zusammenhang werden auch die meisten Initiationsfaktoren freigesetzt, wobei der genaue Zeitpunkt für die Freisetzung der einzelnen Faktoren noch unklar ist. Nach Hydrolyse des von eIF5B gebundenen GTP dissoziieren eIF5B-GDP und eIF1A und die Elongationsphase der Translation kann beginnen (Jackson et al., 2010).

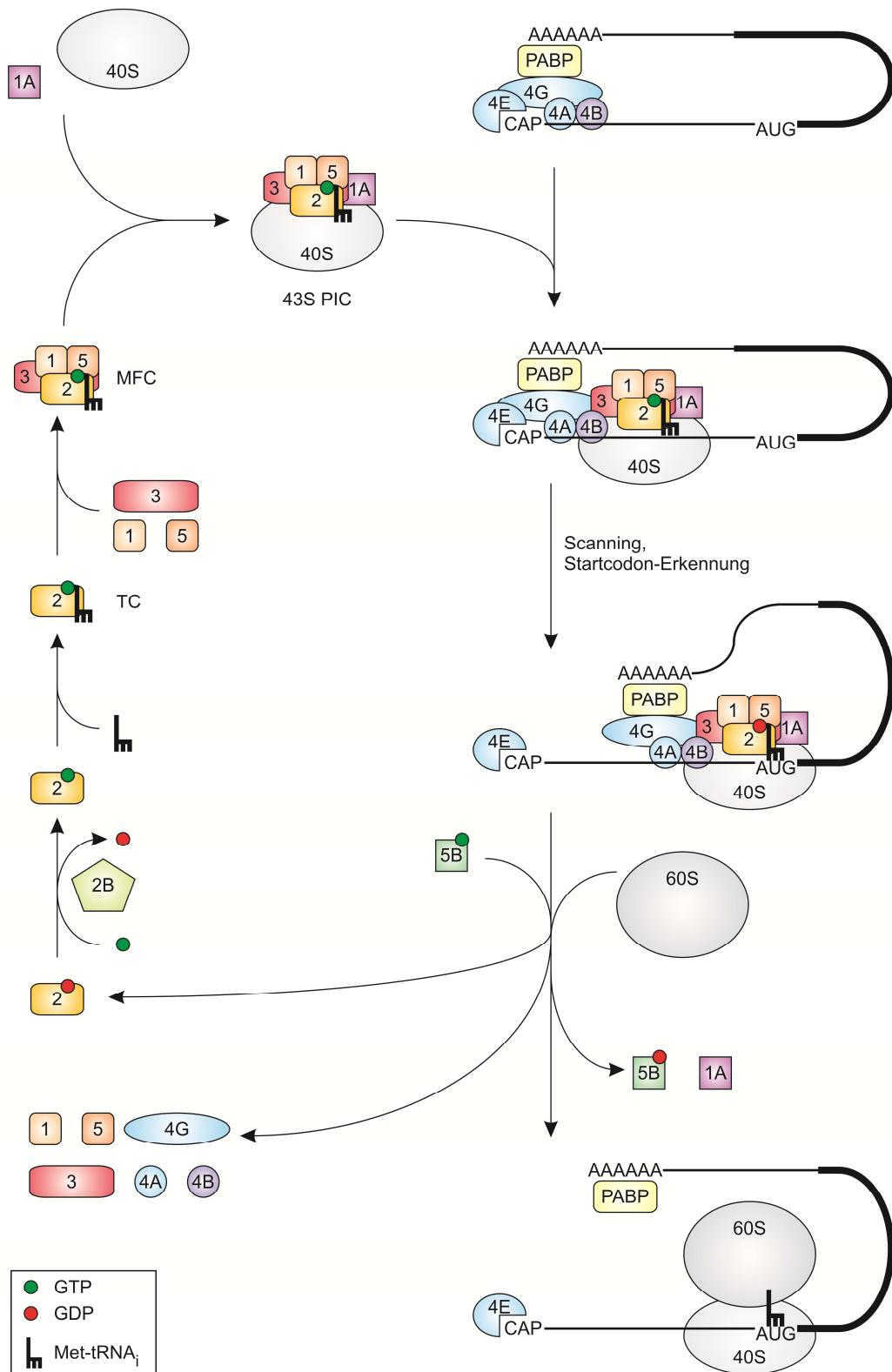


Abbildung 3.3: Der kanonische Mechanismus der Translationsinitiation (Beschreibung siehe nächste Seite)

**Abbildung 3.3: Der kanonische Mechanismus der Translationsinitiation** (Abbildung siehe vorige Seite)

Der eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF2) bildet mit GTP und der Met-tRNA<sub>i</sub> den ternären Komplex (TC), welcher in Hefe mit eIF1, eIF3 und eIF5 zum Multifaktorkomplex (MFC) assembliert. Dieser bindet zusammen mit eIF1A an das 40S-Ribosom, wodurch der 43S Präinitialisationskomplex (43S PIC) entsteht. Der eIF4F-Komplex (eIF4A, eIF4E und eIF4G), eIF4B und das PolyA-Bindeprotein (PABP) zirkularisieren die mRNA und ermöglichen durch die Auflösung von mRNA-Sekundärstrukturen die Anlagerung des 43S PIC. Der 43S PIC bewegt sich auf der mRNA in 5'→3'-Richtung und sucht nach dem Startcodon. Es ist unklar, welche Interaktionen zwischen eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, PABP und dem 43S PIC während des Scanning erhalten bleiben. Scanning und Startcodon-Erkennung führen zur Hydrolyse des von eIF2 gebundenen GTP-Moleküls. Nach der Erkennung des Startcodons vermittelt eIF5B die Anlagerung des 60S-Ribosoms. Die Initiationsfaktoren verlassen das Ribosom, wobei die genaue Abfolge der einzelnen Schritte noch nicht geklärt ist. Die Dissoziation von eIF5B vom Ribosom erfordert die Hydrolyse des gebundenen GTPs. [Abbildung nach (Jackson et al., 2010)]

### 3.2.1.2 Varianten der Translationsinitiation

Neben dem beschriebenen kanonischen Mechanismus der Translationsinitiation durch Rekrutierung des 40S Ribosoms an die Cap-Struktur, Scanning und Translationsinitiation am ersten AUG-Codon gibt es noch weitere Möglichkeiten der Translationsinitiation in Eukaryoten. Für diese Prozesse spielen Sekundärstrukturen der mRNA und vor dem Startcodon liegende AUG-Codons (upstream AUG, uAUG) eine wesentliche Rolle.

#### IRES

Das 40S Ribosom kann nicht nur über die 5'Cap-Struktur, sondern auch über interne mRNA-Sequenzen (sogenannte IRES: internal ribosome entry sites) zur mRNA rekrutiert werden. Dieser Mechanismus wurde zum ersten Mal bei Picornaviren beschrieben. Mittlerweile sind vier Subklassen an IRES bekannt, welche sich hinsichtlich der benötigten Initiationsfaktoren unterscheiden. Gemeinsam ist allen IRES, dass sie Sekundärstrukturen ausbilden und dass der Cap-bindende Initiationsfaktor eIF4E nicht notwendig für die Translationsinitiation ist (Jackson et al., 2010). Nicht nur virale, sondern auch einige zelluläre mRNAs weisen IRES auf. In vielen Fällen spielen die codierten Proteine eine Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Elroy-Stein und Merrick, 2007). So führt die Aktivierung von Caspasen zur Spaltung von eIF4G, was die Cap-abhängige Translationsinitiation inhibiert. Durch IRES-vermittelte Initiation kann der pro-apoptotische Faktor APAF1 auch unter diesen Bedingungen synthetisiert werden (Holcik und Sonenberg, 2005).

#### Ribosome Shunting

Auch für das Ribosome Shunting, welches bei einigen viralen mRNAs auftritt, sind Sekundärstrukturen der mRNA verantwortlich. In diesem Fall wird das 40S Ribosom zunächst wie bei der kanonischen Translationsinitiation an das 5'Ende der mRNA rekrutiert und beginnt mit dem Scanning. Wenn das scannende Ribosom auf die mRNA-Sekundärstruktur trifft, wird es auf eine noch

unverstandene Weise an eine weiter 3'-gelegene Landesequenz versetzt, wo es mit dem Scanning fortfährt (Meijer und Thomas, 2002).

#### Leaky Scanning

Liegt ein AUG-Codon in einem schlechten Kontext vor (vgl. 3.2.1.1), so wird es von scannenden Ribosomen häufig nicht erkannt. Diese Ribosomen fahren mit dem Scanning fort und die Translationsinitiation findet am nächsten AUG-Codon statt. Wenn beide AUG-Codons im gleichen Leserahmen liegen, so führt die Initiation am zweiten AUG zu einem N-terminal verkürzten Protein (Meijer und Thomas, 2002). Liegen die beiden AUG-Codons nicht im gleichen Leserahmen, so werden zwei verschiedene Proteine exprimiert (Kozak, 2002). Eine weitere Möglichkeit ist, dass auf das erste Start-Codon bald ein Stop-Codon folgt und es sich somit um einen uORF (upstream open reading frame) handelt, welcher nicht mit dem zweiten ORF überlappt. Solche uORFs haben meist eine regulatorische Funktion, wie auch bei der Expression des G1-Zyklins *CLN3* in Hefe: Die meisten Ribosomen translatieren den uORF und dissoziieren dann von der mRNA. Nur Ribosomen, welche den uORF durch leaky scanning überlesen, führen zur Translation des *CLN3*-ORFs. Dadurch wird nur bei einer hohen Translationsinitiationsrate ausreichend Cln3 synthetisiert, um den G1/S-Übergang einzuleiten (Polymenis und Schmidt, 1997).

#### Reinitiation

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Translationsinitiation über uORFs stellt die Reinitiation dar: Nach Translation eines kurzen uORFs dissoziert teilweise die 40S Untereinheit des Ribosoms nicht von der mRNA, sondern bewegt sich in 3' Richtung weiter. Wenn ein ternärer Komplex an das Ribosom bindet, kann am nächsten AUG-Codon die Translation initiiert werden (Jackson et al., 2010). Ein Beispiel für die Reinitiation ist die Translation der *GCN4*-mRNA, welche in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben ist.

### **3.2.2 Der Translationsinitiationsfaktor eIF2**

Der Initiationsfaktor eIF2 besteht aus drei Untereinheiten, welche in Hefe von den essentiellen Genen *SUI2* ( $\alpha$ ), *SUI3* ( $\beta$ ) und *GCD11*( $\gamma$ ) codiert werden (Hinnebusch, 2000). eIF2 bildet zusammen mit GTP und der Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) den ternären Komplex (vgl. 3.2.1.1). Wie bei anderen G-Proteinen ist die Aktivität, d.h. im Fall von eIF2 die Affinität für Met-tRNA<sub>i</sub>, davon abhängig, ob GTP oder GDP gebunden ist, und der Wechsel zwischen GTP- und GDP-gebundener Form wird durch Interaktion mit anderen Proteinen reguliert (Abb. 3.4): Während der Translationsinitiation fungiert eIF5 als GAP (GTPase activating protein) und stimuliert die GTP-Hydrolyse. Anschließend muss GDP gegen GTP ausgetauscht werden, damit eIF2 wieder für die nächste Runde der Translationsinitiation zur Verfügung steht. Dies wird von dem GEF (guanine nucleotide exchange factor) eIF2B katalysiert.

### 3.2.2.1 Aufbau von eIF2 und Bildung des ternären Komplexes

Studien von eIF2-Mutanten, v.a. in Hefe, und Strukturuntersuchungen der eukaryotischen Untereinheiten und ihrer Homologen in Archäen trugen zum Verständnis der eIF2-Funktion bei.

Die  $\gamma$ -Untereinheit bildet den Kern des eIF2-Heterotrimers und bindet das Guaninnukleotid und die Initiator-tRNA (Hinnebusch et al., 2007; Schmitt et al., 2010). eIF2 $\gamma$  besteht wie der homologe Elongationsfaktor eEF1A (in Prokaryoten: EF-1A oder EF-Tu) aus drei Domänen: der N-terminalen G-Domäne (in Hefe: Aminosäuren 1-309) und den kleineren Domänen II (310-422) und III (423-527) (Schmitt et al., 2010; vgl. auch Anhang 9.1.2). Die G-Domäne enthält die Bindestelle für das Guaninnukleotid mit den typischen Motiven eines G-Proteins. Dies sind die SALH und QNKIE Sequenzen, welche die Guaninbase binden, die GKT-Schleife, welche die Phosphatgruppen kontaktiert, und die Regionen Switch I und II, deren Konformation sich im GTP-gebundenen und GDP-gebundenen Zustand unterscheidet (Yatime et al., 2007). Die G-Domäne von a/eIF2 $\gamma$  besteht aus einem  $\beta$ -Faltblatt, welches von  $\alpha$ -Helices umgeben ist, und ist damit homolog zur Struktur anderer GTPasen. Eine Besonderheit von a/eIF2 $\gamma$  ist ein Zink-bindendes Motiv an der Oberfläche der G-Domäne, dessen Funktion noch unklar ist (Roll-Mecak et al., 2004). Die Domäne II ist ein  $\beta$ -Fass aus 10 antiparallelen Strängen und enthält unterschiedliche, aber nah beieinander liegende Bindestellen für eIF2 $\alpha$  und die Initiator-tRNA (Roll-Mecak et al., 2004). Die Funktion der Domäne III, welche ebenfalls eine  $\beta$ -Fass-Struktur bildet (Roll-Mecak et al., 2004), ist noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt diese Domäne eine Rolle bei der tRNA-Bindung, da die Aminosäuresubstitution R510H in eIF2 $\gamma$  aus Hefe die tRNA-Bindung beeinträchtigt (Dorris et al., 1995).

Die  $\beta$ -Untereinheit von eIF2 besitzt eine N-terminale Domäne, welche in Eukaryoten, aber nicht in Archäen konserviert ist. Diese enthält drei Lysin-reiche Motive, die sogenannten K-Boxen, welche die Interaktion mit eIF5 und eIF2B vermitteln. Der konservierte Bereich von a/eIF2 $\beta$  beginnt mit einer kurzen  $\alpha$ -Helix, gefolgt von einer  $\alpha$ - $\beta$ -Domäne und der C-terminalen Zink-bindenden Domäne, welche aus einem  $\beta$ -Faltblatt besteht (Schmitt et al., 2010). Die zentrale  $\alpha$ - $\beta$ -Domäne von eIF2 $\beta$  ist wichtig für die Interaktion mit der  $\gamma$ -Untereinheit, während die C-terminale Domäne möglicherweise die GTPase-Aktivität der  $\gamma$ -Untereinheit inhibiert (Thompson et al., 2000).

Die  $\alpha$ -Untereinheit von a/eIF2 besteht aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne 1 weist eine  $\beta$ -Fass-Struktur mit der sogenannten Rossmann- oder OB-Faltung auf, welche häufig bei RNA-bindenden Proteinen beobachtet wird. In der Tat kann aIF2 $\alpha$  RNA binden, was eine Interaktion mit mRNA oder rRNA ermöglichen könnte (Yatime et al., 2004; Yatime et al., 2005). Die Domäne 1 und die  $\alpha$ -helikale Domäne 2 sind starr miteinander verbunden, wohingegen die Domäne 3, welche eine  $\alpha$ - $\beta$ -Struktur aufweist, ihre Position relativ zu den anderen Domänen ändern kann (Schmitt et al., 2010). In Eukaryoten spielt die  $\alpha$ -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Regulation der

Translationsinitiation (siehe Abschnitt 3.2.3.1): Unter Stressbedingungen wird ein Serin in einer Schleife der Domäne 1 (S51 in Hefe) phosphoryliert, wodurch der Austausch von GDP zu GTP durch eIF2B inhibiert wird. Für die Interaktion von eIF2 $\alpha$  sowohl mit Kinasen als auch mit eIF2B sind zwei Bereiche der Domäne 1 wichtig: Die Umgebung von Serin51 und die konservierte Region bei Lysin79 am anderen Ende des  $\beta$ -Fasses (Dhaliwal und Hoffman, 2003). In Hefe kann die Deletion von *SUI2* (eIF2 $\alpha$ ) durch Überexpression von eIF2 $\beta\gamma$  und tRNA $i$  gerettet werden. Dies zeigt, dass die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 nicht absolut notwendig für die Bildung des ternären Komplexes und die Translationsinitiation ist, sondern für die Interaktion mit eIF2B und damit den effizienten und regulierbaren Nukleotidaustausch (Erickson et al., 2001).

Strukturuntersuchungen von heterodimeren und -trimeren Komplexen von eIF2-Untereinheiten aus *Pyrococcus furiosus* (Sokabe et al., 2006) und *Sulfolobus solfataricus* (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007; Stolboushkina et al., 2008) zeigten, dass die  $\gamma$ -Untereinheit den Kern des Heterotrimers bildet. Die G-Domäne von eIF2 $\gamma$  interagiert mit eIF2 $\beta$ , wobei die Interaktion in den verschiedenen Strukturen teils mit der  $\alpha$ - $\beta$ -Domäne und teils mit der Zink-bindenden Domäne von eIF2 $\beta$  erfolgte. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass die Strukturen unterschiedliche Stellen des Nukleotidzyklus von eIF2 widerspiegeln (Schmitt et al., 2010). Die Interaktion von eIF2 $\alpha$  und  $\gamma$  erfolgt über die Domäne 3 von eIF2 $\alpha$  und die Domäne II von eIF2 $\gamma$ . In den eIF2-Heterotrimeren wurde keine direkte Interaktion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei humanem eIF2 eine Interaktion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nachgewiesen (Suragani et al., 2005). Möglicherweise sind dafür die C-terminale saure Region von eIF2 $\alpha$  und die N-terminale basische Domäne von eIF2 $\beta$  verantwortlich, welche den homologen Untereinheiten in Archäen fehlen (Ito et al., 2004). Im Gegensatz zu anderen G-Proteinen, wie z.B. dem homologen Elongationsfaktor EF-Tu (Polekhina et al., 1996), erfährt eIF2 $\gamma$  zwischen GDP- und GTP-gebundener Form keine großen Konformationsänderungen (Schmitt et al., 2002). Allerdings könnten die lokalen Konformationsänderungen in den Switch-Regionen der eIF2 $\gamma$ -G-Domäne größere Änderungen in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nach sich ziehen (Stolboushkina et al., 2008). Die Position der Initiator-tRNA am eIF2-Heterotrimer ist nicht bekannt und Modelle auf Basis der Struktur des homologen EF-Tu/tRNA-Komplexes (Yatime et al., 2006) oder anhand eines Pyrophosphats, welches in einem eIF2-Heterotrimer nachgewiesen wurde (Nikonov et al., 2007), führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen.

Die Affinität von eIF2 für Met-tRNA $i$  ist vom gebundenen Guaninnukleotid abhängig: Die Affinität von eIF2-GTP ist etwa 20mal höher als von eIF2-GDP (Kapp und Lorsch, 2004). Dieser Unterschied ist wesentlich geringer als bei dem homologen Elongationsfaktor EF-Tu, dessen Affinität für tRNA in GTP-gebundener Form 10000mal höher ist als in GDP-gebundener Form. Möglicherweise liegt dies daran, dass eIF2 zwischen der GTP-gebundenen und der GDP-gebundenen Form nur geringe Konformationsänderungen erfährt (Kapp und Lorsch, 2004). Um seine Funktion bei der

Translationsinitiation erfüllen zu können, muss eIF2 die mit Methionin beladene Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) sowohl von unbeladener tRNA als auch von Elongations-tRNAs unterscheiden. Affinitätsstudien mit eIF2- und tRNA-Varianten führten zu einem Modell, nach dem die Spezifität durch mehrere Kontakte zwischen eIF2 und Met-tRNA<sub>i</sub> gewährleistet wird: eIF2 besitzt eine Bindetasche für Methionin und die korrekte Positionierung von Methionin in dieser Tasche ist von dem A1:U72-Basenpaar abhängig, welches spezifisch für die Initiator-tRNA ist. eIF2-GTP bildet darüber hinaus einen Kontakt zur Aminogruppe des Methionins aus, was die höhere Affinität von eIF2-GTP im Vergleich zu eIF2-GDP erklärt (Kapp und Lorsch, 2004).

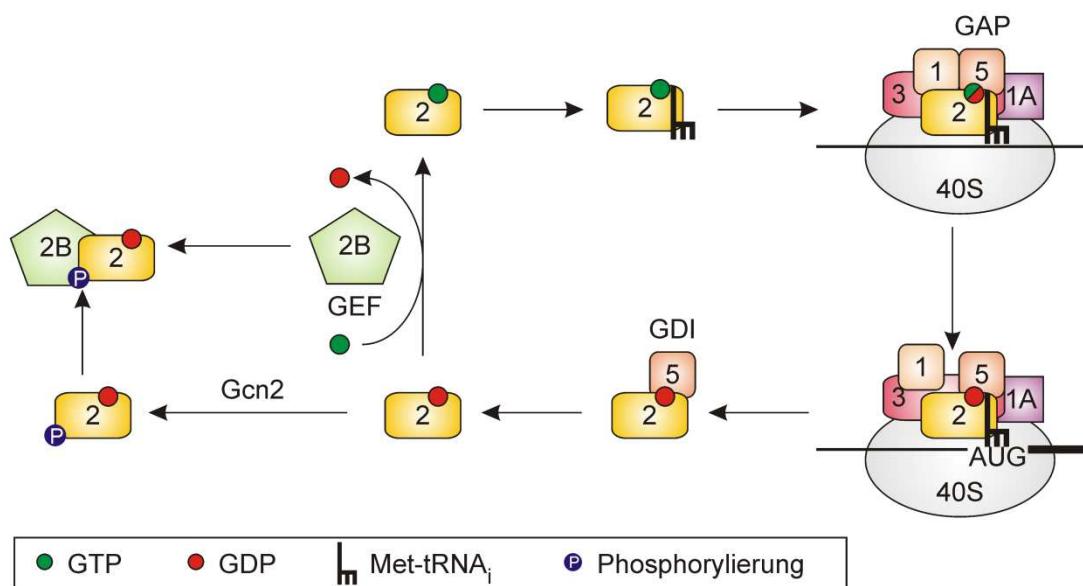
### 3.2.2.2 Der GTP/GDP-Zyklus von eIF2

eIF2 wird in GDP-gebundener Form vom Ribosom freigesetzt. Damit es wieder Met-tRNA<sub>i</sub> für den nächsten Translationsinitiationszyklus binden kann, muss zunächst GDP gegen GTP ausgetauscht werden (Abb. 3.4). Dieser Schritt wird von dem heteropentameren GEF (guanine nucleotide exchange factor) eIF2B katalysiert und ist das Ziel verschiedener Wege zur Regulation der Translationsinitiation, wovon die Phosphorylierung von eIF2 am besten untersucht ist (Pavitt, 2005): Unter verschiedenen Stressbedingungen kommt es zur Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 (Sui2 in Hefe) und die phosphorylierte Form von eIF2 bindet als kompetitiver Inhibitor an eIF2B. Dadurch steht weniger eIF2-GTP zur Bildung von ternären Komplexen zur Verfügung und die Translationsinitiationsrate sinkt (vgl. Abschnitt 3.2.3.1).

eIF2B besteht aus fünf Untereinheiten, welche in Hefe von den Genen *GCN3* ( $\alpha$ ), *GCD7* ( $\beta$ ), *GCD1* ( $\gamma$ ), *GCD2* ( $\delta$ ) und *GCD6* ( $\epsilon$ ) codiert werden. Im Gegensatz zu den anderen vier Genen ist *GCN3* nicht essentiell, allerdings ist es notwendig für die Regulation der eIF2B-Aktivität durch phosphoryliertes eIF2 (Hinnebusch et al., 2007). Der C-Terminus der  $\epsilon$ -Untereinheit enthält das katalytische Zentrum und interagiert sowohl mit der G-Domäne von eIF2 $\gamma$  als auch mit den K-Boxen in der N-terminalen Domäne von eIF2 $\beta$ . Für die Interaktion mit eIF2 $\beta$  sind zwei Motive mit aromatischen und sauren Aminosäuren, die sogenannten AA-Boxen, verantwortlich (Alone und Dever, 2006; Mohammad-Qureshi et al., 2007). Die eIF2B $\epsilon$ -Untereinheit alleine kann *in vitro* die Dissoziation von eIF2-GDP-Komplexen katalysieren, allerdings ist die Geschwindigkeit gering. Die  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten von eIF2B bilden den sogenannten katalytischen Subkomplex, welcher eine ähnlich hohe GEF-Aktivität wie pentameres eIF2B hat und durch phosphoryliertes eIF2 nicht inhibiert wird. Im Gegensatz dazu hat der regulatorische Subkomplex aus den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Untereinheiten von eIF2B keine GEF-Aktivität, bindet aber phosphoryliertes eIF2 mit höherer Affinität als nicht-phosphoryliertes eIF2 (Pavitt et al., 1998; Krishnamoorthy et al., 2001). Nach einem gängigen Modell interagiert zunächst eIF2 $\alpha$  mit dem regulatorischen Subkomplex. Durch eine Konformationsänderung kommt es im nächsten Schritt zur Interaktion der katalytischen  $\epsilon$ -Untereinheit mit eIF2 $\beta\gamma$  und zum

Nukleotidaustausch. Phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  inhibiert eIF2B, weil es mit höherer Affinität an den regulatorischen Subkomplex bindet und so die Umlagerung zur katalytisch aktiven Form des Komplexes verhindert wird (Hinnebusch, 2000).

Da die  $\beta$ - und  $\delta$ -Untereinheiten von eIF2B *in vitro* nicht notwendig für die GEF-Aktivität sind, aber von essentiellen Genen codiert werden, hat eIF2B möglicherweise neben dem Nukleotidaustausch noch eine weitere Funktion. Die Assoziation von eIF2B mit Ribosomen führte zu der Vermutung, dass eIF2B eine Rolle bei der Freisetzung von eIF2-GDP vom Ribosom spielt (Pavitt et al., 1998). Andere Studien legten eine Rolle von eIF2B, insbesondere der  $\delta$ -Untereinheit, bei der Bindung der Initiator-tRNA an eIF2 nahe (Erickson et al., 2001; Dev et al., 2010).



**Abbildung 3.4: Der GTP/GDP-Zyklus von eIF2**

In GTP-gebundener Form rekrutiert eIF2 die Initiator-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) für die Translationsinitiation. Während des Scanning stimuliert eIF5 als GAP die GTP-Hydrolyse. Da eIF1 aber die Freisetzung des Phosphats ( $P_i$ ) verhindert, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen GTP und GDP +  $P_i$  ein. Die Erkennung des Startcodons führt zur  $P_i$ -Freisetzung, wodurch die GTP-Hydrolyse irreversibel wird. eIF2-GDP dissoziiert vermutlich zusammen mit eIF5 vom 40S Ribosom. eIF5 wirkt als GDI dem Nukleotid-Austausch entgegen und ist damit der Gegenspieler von eIF2B, welches als GEF den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert. Die Phosphorylierung von eIF2 durch die Kinase Gcn2 stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Translationsinitiation dar, da phosphoryliertes eIF2 als kompetitiver Inhibitor von eIF2B wirkt. [Abbildung nach (Jennings und Pavitt, 2010a)]

Der Gegenspieler von eIF2B im Nukleotidzyklus von eIF2 ist das GAP eIF5, welches die intrinsische GTPase-Aktivität von eIF2 stimuliert. Die N-terminale Domäne von eIF5 enthält ein Arginin, welches notwendig für die GAP-Aktivität ist. Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Arginin ähnlich wie bei anderen GAPS als Arginin-Finger agiert, welcher den Übergangszustand bei der GTP-Hydrolyse stabilisiert (Das et al., 2001). Die GAP-Aktivität von eIF5 ist *in vitro* in Anwesenheit von 40S Ribosomen, eIF1, eIF1A und mRNA mehr als 2000mal höher als in Abwesenheit dieser Faktoren (Algire et al., 2005).

Während frühe Untersuchungen davon ausgingen, dass die Erkennung des Startcodons zur Aktivierung von eIF5 und damit zur GTP-Hydrolyse führt, konnte inzwischen gezeigt werden, dass die GTP-Hydrolyse schon während des Scanning stattfinden kann und die Freisetzung des Phosphats ( $P_i$ ) der entscheidende Schritt bei der Startcodon-Erkennung ist (Algire et al., 2005). Diese und andere Daten führten zu folgendem Modell (Algire et al., 2005): Im 43S Präinitiationskomplex ist die GAP-Aktivität von eIF5 inhibiert. Die Bindung an die mRNA führt zu einer Konformationsänderung des 43S PIC, welche sowohl das Scanning als auch die GAP-Aktivität von eIF5 erlaubt. eIF1 verhindert jedoch zunächst die Freisetzung des Phosphats ( $P_i$ ). Bei der Erkennung des Startcodons kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung, wodurch eIF1 die P-Stelle des Ribosoms verlässt und  $P_i$  freigesetzt werden kann.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass eIF5 neben seiner Rolle als GAP noch eine zweite Funktion erfüllt: Es verhindert die Dissoziation von eIF2-GDP und wirkt somit als GDI (GDP dissociation inhibitor) (Jennings und Pavitt, 2010b). Ein erster Hinweis auf eine mögliche GDI-Funktion war, dass die Überexpression von eIF5 die GEF-Aktivität von eIF2B beeinträchtigt (Singh et al., 2006). Außerdem wurde geschätzt, dass etwa 40% aller eIF2-Moleküle in einem Komplex mit eIF5 ohne Met-tRNA<sub>i</sub> (und dementsprechend vermutlich in GDP-gebundener Form) vorliegen (Singh et al., 2007). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass eIF5 tatsächlich GDI-Aktivität besitzt. Die GDI-Aktivität ist zwar im Gegensatz zur GAP-Aktivität nicht essentiell, sie spielt jedoch eine Rolle für die effiziente Inhibition von eIF2B durch phosphoryliertes eIF2 (Jennings und Pavitt, 2010b). Während die N-terminale Domäne von eIF5 wichtig für die GAP-Aktivität ist, sind die Linker-Region und die C-terminale Domäne verantwortlich für die GDI-Aktivität. Vermutlich verhindert die C-terminale Domäne die von eIF2B katalysierte GDP-Dissoziation, indem sie an eIF2 bindet und die Interaktion von eIF2 mit eIF2B blockiert, und die Linker-Region inhibiert die spontane Dissoziation von GDP (Jennings und Pavitt, 2010a).

### 3.2.3 Die Regulation der Translationsinitiation

Die Regulation der Genexpression auf Ebene der Translation ermöglicht die schnelle Anpassung der Proteinsynthese auf veränderte Bedingungen. Die Regulation der Translation findet meist in der Initiationsphase statt. Dies erlaubt einerseits die globale Kontrolle der Translationsinitiationsrate durch Beeinflussung der Aktivität von Translationsinitiationsfaktoren und andererseits die Transkript-spezifische Kontrolle durch regulatorische Elemente der mRNA (Gebauer und Hentze, 2004).

### 3.2.3.1 Die Regulation der Translationsinitiation durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$

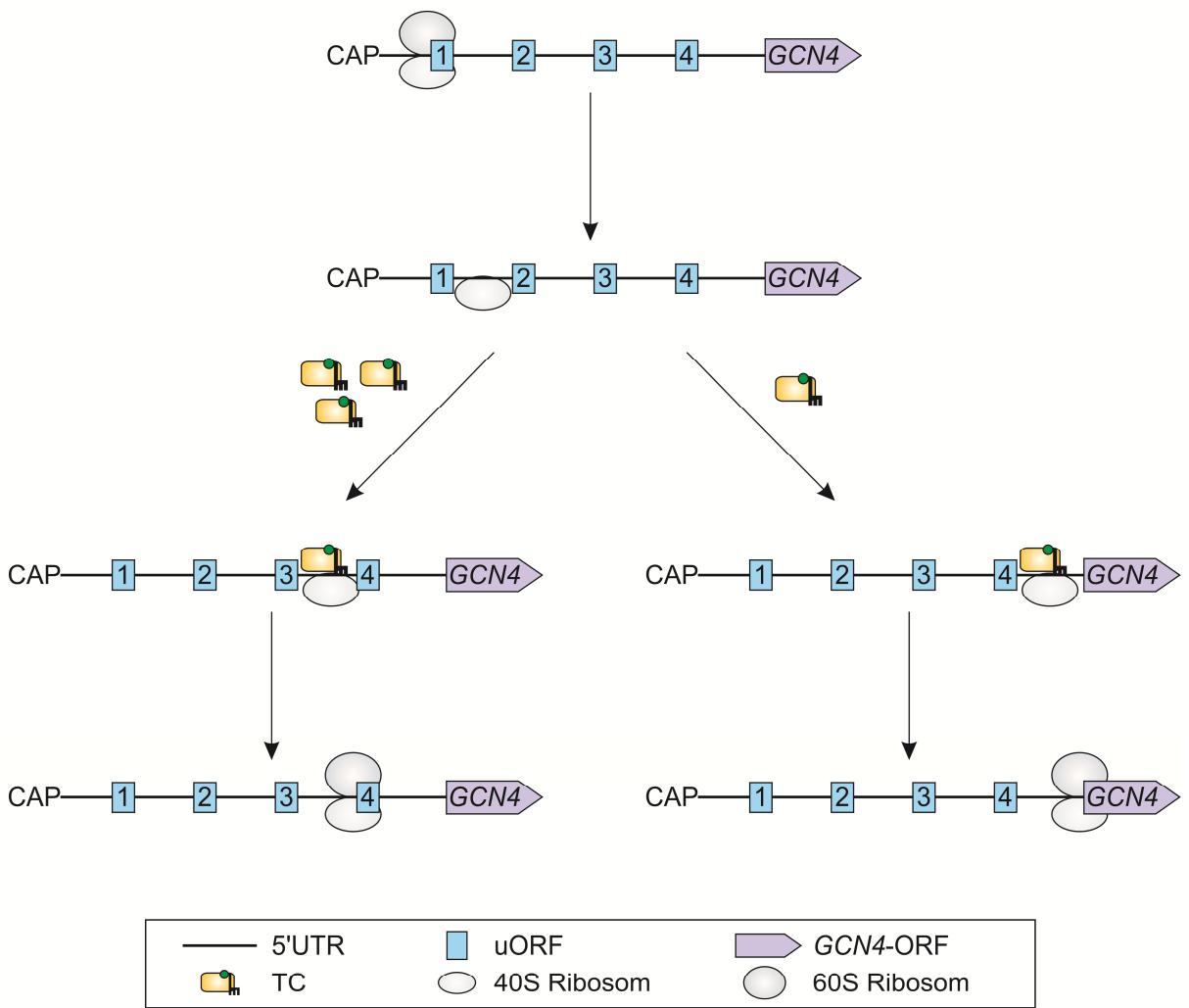
Einer der am besten untersuchten Regulationswege der Translation ist die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2, welche in verschiedenen Stresssituationen stattfindet und zur Reduktion der Translationsinitiationsrate führt. In Säugern gibt es vier eIF2 $\alpha$ -Kinasen, welche auf verschiedene Stimuli reagieren (Holcik und Sonenberg, 2005; Proud, 2005; Dever et al., 2007): HRI (auch als EIF2AK1 bezeichnet) wird durch Haem-Mangel, oxidativen Stress und Hitzeschock aktiviert und die Hauptfunktion dieser Kinase ist vermutlich die Koordination der Globin-Synthese mit der Haem-Verfügbarkeit in Erythrozyten-Vorläufern. PKR (EIF2AK2) wird durch doppelsträngige RNA aktiviert und vermittelt die Inhibition der Proteinsynthese in virus-infizierten Zellen. PERK (EIF2AK3) durchspannt die ER-Membran und wird bei der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER aktiv, woraufhin sie eine Reduktion der Proteinsynthese einleitet und somit eine weitere Akkumulation von Proteinen im ER verhindert. GCN2 (EIF2AK4) wird bei Aminosäuremangel durch unbeladene tRNA aktiviert.

In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es nur eine eIF2 $\alpha$ -Kinase, welche von *GCN2* codiert wird und die Proteinsynthese bei Aminosäuremangel moduliert (Hinnebusch, 2005). Gcn2 enthält eine Domäne, welche Ähnlichkeit zur Histidyl-tRNA Synthetase (HisRS) aufweist und als Sensor für unbeladene tRNA dient. Aminosäuremangel führt zur Akkumulation von unbeladener tRNA, welche an die HisRS-Domäne bindet. Dies bewirkt die Aktivierung der Kinase-Domäne und somit die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2. Am C-Terminus von Gcn2 liegt eine Domäne, welche die Dimerisierung von Gcn2 und die Bindung an Ribosomen vermittelt. Es wird vermutet, dass dadurch auch der Mangel einer einzelnen Aminosäure zur effektiven Aktivierung von Gcn2 führt, weil die entsprechende unbeladene tRNA von der A-Stelle des Ribosoms direkt auf die HisRS-Domäne von Gcn2 übertragen werden kann. Möglicherweise spielt dabei ein Komplex aus Gcn1 und Gcn20 eine Rolle (Hinnebusch, 2005).

Gcn2 aus Hefe und ebenso die vier Kinasen aus Säugern phosphorylieren eIF2 $\alpha$  an Serin51 (die Nummerierung bezieht sich auf das reife Protein nach Abspaltung des N-terminalen Methionins, (Dever et al., 2007)). Für die Erkennung von eIF2 $\alpha$  als Substrat sind zwei Bereiche der Domäne 1 von eIF2 $\alpha$  notwendig: Die räumliche Umgebung von Serin51 und ein konservierter Bereich am anderen Ende des  $\beta$ -Fasses (Dhaliwal und Hoffman, 2003; Dey et al., 2005). Diese beiden Motive spielen auch bei der Bindung von eIF2 $\alpha$  an eIF2B eine wichtige Rolle und die Phosphorylierung von Serin51 beeinflusst diese Interaktion: eIF2B bindet phosphoryliertes eIF2 mit höherer Affinität, aber es findet kein Nukleotidaustausch statt. Wie in Abschnitt 3.2.2 erläutert, verhindert die festere Bindung von phosphoryliertem eIF2 vermutlich die Umlagerung des eIF2-eIF2B-Komplexes in eine katalytisch aktive Form. Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt also zur Inhibition der GEF-Aktivität von eIF2, wodurch weniger eIF2-GTP und demzufolge auch weniger ternäre Komplexe (TC) aus eIF2, GTP und

Met-tRNA<sub>i</sub> gebildet werden. Dadurch führt die Aktivierung der eIF2α-Kinasen letztlich zur Reduktion der globalen Translationsinitiationsrate (Hinnebusch, 2000; Gebauer und Hentze, 2004).

Unter diesen Bedingungen ist die Synthese der meisten Proteine verringert, es gibt jedoch Ausnahmen: In Hefe führt die Phosphorylierung von eIF2α bei Aminosäuremangel zur Steigerung der Gcn4-Synthese (Abb. 3.5). Die verstärkte Translation des *GCN4*-ORFs beruht auf der regulatorischen 5'UTR der *GCN4*-mRNA, welche 4 kurze uORFs enthält. Zunächst findet die Translationsinitiation nach dem kanonischen Mechanismus (siehe 3.2.1.1) am Startcodon von uORF1 statt. Nachdem die Ribosomen diesen uORF translatiert haben, löst sich jedoch in etwa der Hälfte der Fälle die 40S Untereinheit nicht von der mRNA, sondern beginnt wieder zu scannen (Hinnebusch, 2005). Dies liegt vermutlich daran, dass während der Translation dieses kurzen uORFs ein oder mehrere Initiationsfaktoren an das Ribosom gebunden bleiben. Die wahrscheinlichsten Kandidaten sind eIF3 und eIF4G, da sie nicht an der Kontaktfläche von 40S und 60S Ribosom binden (Jackson et al., 2010). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eIF3 sowohl mit dem 40S Ribosom als auch mit speziellen Sequenzen in der 5'UTR des uORF1 interagiert und somit wesentlich zur Wiederaufnahme des Scanning beiträgt (Munzarova et al., 2011). Bevor jedoch eine Reinitiation am nächsten AUG-Codon stattfinden kann, muss das 40S Ribosom wieder einen ternären Komplex (und möglicherweise weitere Initiationsfaktoren) binden. Der Zeitpunkt der Bindung des TC entscheidet, ob die Reinitiation an uORF2, uORF3, uORF4 oder am *GCN4*-ORF stattfindet. In diesem Zusammenhang spielt die Konzentration an ternären Komplexen eine entscheidende Rolle: Unter guten Wachstumsbedingungen ist die Konzentration an ternären Komplexen hoch, wodurch das scannende 40S Ribosom bald einen TC akquirieren kann. Dementsprechend findet die Reinitiation bevorzugt an den uORFs und nicht am *GCN4*-ORF statt. Nach der Translation von uORF2, uORF3 oder uORF4 dissoziieren beide ribosomale Untereinheiten von der mRNA, so dass es nicht nochmals zur Reinitiation kommen kann. Unter guten Wachstumsbedingungen ist die Translation des *GCN4*-ORFs also gering. Wird dagegen bei Aminosäuremangel Gcn2 aktiviert, was letztlich eine Reduktion der TC-Konzentration bewirkt, so binden etwa 50% der scannenden Ribosomen erst nach dem letzten uORF einen TC und reinitiiieren am Startcodon des *GCN4*-ORFs. Durch diesen Mechanismus steigt die *GCN4*-Expression bei Aminosäuremangel, während die globale Translationsinitiation verringert ist. Der Transkriptionsfaktor Gcn4 induziert die Expression zahlreicher Gene, deren Produkte unter anderem in der Aminosäurebiosynthese eine Rolle spielen (Hinnebusch, 2005).



**Abbildung 3.5: Die Regulation der Translation der GCN4-mRNA**

Die *GCN4*-mRNA enthält vier uORFs vor dem *GCN4*-ORF. Ribosomen werden über die 5'CAP-Struktur rekrutiert und translatieren den ersten uORF. Danach löst sich in etwa 50% der Fälle die 40S Untereinheit nicht von der mRNA, sondern beginnt wieder mit dem Scanning. Ist die Konzentration an ternären Komplexen hoch (linke Seite), so bindet schnell ein TC an das 40S Ribosom und es kommt zur Translation eines der weiteren uORFs (dargestellt für uORF4). Ist die Konzentration an ternären Komplexen jedoch gering (rechte Seite), so bindet ein TC mit höherer Wahrscheinlichkeit erst nach dem letzten uORF, wodurch der *GCN4*-ORF translatiert wird. [Abbildung nach (Gebauer und Hentze, 2004; Hinnebusch, 2005), siehe Text für Details]

Eine erhöhte *GCN4*-Expression tritt bereits bei einer geringen Konzentration an phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  auf, bei welcher die globale Translationsinitiationsrate kaum beeinträchtigt ist. Da die *GCN4*-Translation sehr sensitiv auf eine verringerte TC-Menge reagiert, wurden viele Komponenten dieses Regulationsweges ursprünglich bei der Analyse von Mutanten mit veränderter *GCN4*-Expression identifiziert. Ist die *GCN4*-Expression bei Aminosäuremangel nicht induzierbar, spricht man von einem Gcn $^{-}$ -Phänotyp (general control non-derepressible). Dies ist zum Beispiel beim Fehlen der eIF2 $\alpha$ -Kinase Gcn2 oder der regulatorischen eIF2B-Untereinheit Gcn3 der Fall. Im Gegensatz dazu ist beim Gcd $^{-}$ -Phänotyp (general control derepressed) die *GCN4*-Expression konstitutiv erhöht. Dies tritt

bei Mutationen in den Genen für eIF2- und eIF2B-Untereinheiten auf, welche die Bildung des TC beeinträchtigen, und spiegelt sich auch in den Namen der entsprechenden Gene wider: *GCD1* (codiert eIF2By), *GCD2* (eIF2B $\delta$ ), *GCD6* (eIF2B $\epsilon$ ), *GCD7* (eIF2B $\beta$ ) und *GCD11* (eIF2y) (Hinnebusch, 2005).

In Säugern existiert ein ähnlicher Mechanismus zur verstärkten Expression von ATF4 und ATF5 bei eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung. Die entsprechenden mRNAs enthalten zwei uORFs, wobei der zweite uORF mit dem ATF4- bzw. ATF5-ORF überlappt. Wie bei der *GCN4*-mRNA in Hefe verbleibt ein Teil der 40S Ribosomen nach der Translation des uORF1 an der mRNA und beginnt wieder zu scannen. Ist die Konzentration an ternärem Komplex hoch, wird der uORF2 translatiert, was die Translation des ATF4/ATF5-ORFs verhindert. Ist die Konzentration an ternärem Komplex niedrig, findet die Reinitiation dagegen bevorzugt am ATF4/ATF5-ORF statt (Jackson et al., 2007; Jackson et al., 2010).

Die enorme Bedeutung der korrekten Regulation der Translationsinitiation über die Phosphorylierung von eIF2 und Inhibition von eIF2B zeigt sich auch in der Humanpathologie. So führen Mutationen in eIF2B-Untereinheiten zu einer neurodegenerativen Erkrankung, die als VWM (leukoencephalopathy with vanishing white matter) oder CACH (childhood ataxia with central nervous system hypomyelination) bezeichnet wird. Es wird vermutet, dass die besondere Sensitivität der Oligodendrozyten für eIF2B-Störungen darauf beruht, dass die Myelinsynthese hohe Anforderungen an die Proteinsynthesemaschinerie und das ER stellt (Fogli und Boespflug-Tanguy, 2006; Scheper et al., 2007). Mutationen der eIF2 $\alpha$ -Kinase PERK sind die Ursache für das Wolcott-Rallison-Syndrom (WRS), dessen Hauptmerkmal die frühe Entwicklung von Insulin-abhängigem Diabetes ist (Delepine et al., 2000). Studien mit homozygoten PERK $^{-}$ -Mäusen und mit heterozygoten Mäusen, die eine nicht-phosphorylierbare eIF2 $\alpha$ -Variante exprimieren, legen nahe, dass die Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas stark auf die Regulation der Proteinsynthese über PERK und eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung angewiesen sind: Die Insulinproduktion führt zu einer starken Beanspruchung des ERs, woraufhin in gesunden Zellen PERK aktiviert wird und über die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  die Synthese weiterer Proteine verringert wird. Ist dieser Regulationsweg gestört, so führt die Überlastung des ERs schließlich zur Schädigung der Zellen und zur Entstehung von Diabetes (Harding und Ron, 2002; Shi et al., 2003; Scheuner et al., 2005).

### 3.2.3.2 Weitere Mechanismen zur Regulation der Translationsinitiation

Neben eIF2 sind auch andere Initiationsfaktoren Ziel von Regulationswegen. So kann die eIF2B-Aktivität auch direkt reguliert werden: In Hefe führen Fuselalkohole, welche beim Katabolismus von Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten anfallen, zur Inhibition von eIF2B. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt, vermutlich wird die Inhibition über die eIF2By-Untereinheit Gcd1 vermittelt (Pavitt, 2005). In Säugern stimuliert Insulin die Proteinsynthese durch Aktivierung von

elf2B: Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor stimuliert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und somit die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, welches die Kinase PDK1 aktiviert, die wiederum die Kinase PKB/Akt aktiviert. Diese inhibiert die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) und verhindert so die inhibitorische Phosphorylierung von elf2B $\epsilon$  an Serin540 durch GSK3 (Cohen und Frame, 2001; Proud, 2007). Auch Aminosäuremangel wirkt in Säugern direkt auf elf2B, indem elf2B $\epsilon$  durch Phosphorylierung an Serin525 inhibiert wird (Wang und Proud, 2008).

Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt zur Regulation der Translationsinitiation ist der Cap-bindende elf4F-Komplex. Zum Beispiel kann die Interaktion von elf4E und elf4G durch elf4E-Bindeproteine (4E-BPs) inhibiert werden. In hypophosphoryliertem Zustand binden die 4E-BPs an elf4E, wodurch elf4E nicht mit elf4G assoziieren kann und die Translationsinitiationsrate sinkt. Unter guten Wachstumbedingungen vermittelt der TOR-Signalweg die Hyperphosphorylierung der 4E-BPs, was ihre Affinität für elf4E verringert. Dadurch kann elf4E mit elf4G interagieren und bei der Translationsinitiation fungieren (Van Der Kelen et al., 2009). Außerdem beeinflussen zahlreiche Signalwege, z.B. über die TOR-Kinasen und MAP-Kinase-Kaskaden, die Phosphorylierung von Initiationsfaktoren wie elf4E, elf4G, elf4B oder elf3, wobei die Bedeutung der Phosphorylierung für die Translationsinitiation teilweise noch unklar ist (Van Der Kelen et al., 2009).

Neben reversiblen Modifikationen dient auch die Proteolyse von Initiationsfaktoren zur Regulation der Translation. Die Aktivierung von Caspisen führt durch die Spaltung von elf4G zur Inhibition der Cap-abhängigen Translationsinitiation, während einige pro- und anti-apoptotische Faktoren über IRES-Elemente in ihren mRNAs verstärkt translatiert werden (Holcik und Sonenberg, 2005).

Die spezifische Regulation einzelner Transkripte wird durch regulatorische Elemente in den 5'- und 3'UTRs der mRNA vermittelt. Zum einen können uORFs in der 5'UTR die Translationsinitiationsrate beeinflussen. In der Regel senkt ein uORF die Translationsfrequenz des weiter 3' liegenden ORFs, es gibt jedoch auch komplexere Mechanismen, wie zum Beispiel in Abschnitt 3.2.3.1 für die GCN4-mRNA beschrieben. Zum anderen kann die Interaktion von mRNA-Sequenzen mit spezifischen Proteinen die Translationsinitiation regulieren. Zum Beispiel bildet eine Sequenz in der 5'UTR der mRNA für das Eisenspeicherprotein Ferritin bei niedriger Eisenkonzentration eine Sekundärstruktur aus, welche mit dem Protein IRP interagiert, wodurch die Anlagerung des 43S PIC an die mRNA blockiert wird (Gebauer und Hentze, 2004). Bei der Reifung von *Xenopus*-Oozyten und der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* spielen regulatorische Elemente in der 3'UTR eine wichtige Rolle. Diese werden von Proteinen gebunden, welche direkt oder indirekt mit elf4E interagieren und die Translationsinitiation inhibieren (Gebauer und Hentze, 2004; Hentze et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit der mRNA-spezifischen Regulation stellen micro-RNAs (miRNAs) dar. Dies sind RNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, die partiell komplementär zu ihrer Ziel-mRNA sind. Die Basenpaarung zwischen der miRNA und ihrer Ziel-mRNA, welche typischerweise

über Sequenzen in der 3'UTR der mRNA erfolgt, führt zur Inhibition der Translationsinitiation, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist (Gebauer und Hentze, 2004; Sonenberg und Hinnebusch, 2009).

### 3.3 Cdc123

Homologe Proteine zu Cdc123 aus *Saccharomyces cerevisiae* finden sich in den meisten Eukaryoten einschließlich des Menschen und ein Sequenzvergleich (Abb. 3.6) zeigt, dass einige Aminosäuren streng konserviert sind (Richter, 2006). Die ersten Studien wurden mit einer temperatursensitiven Mutante der Ratten-Fibroblastenzelllinie 3Y1 durchgeführt, die bei restriktiver Temperatur nicht in der Lage war, aus der Quieszenz wieder in den Zellzyklus einzutreten (Ohno et al., 1984). Durch Komplementationanalysen konnte die Mutation einem bis dato uncharakterisierten Gen zugeordnet werden, das auf Grund der Bezeichnung der ts-Mutante den Namen D123 erhielt (Okuda und Kimura, 1996). Das temperatursensitive Allel enthält einen einzelnen Nukleotidaustausch, der zur Substitution A109V im Protein führt (Okuda und Kimura, 1996). Dies bewirkt einen schnelleren Abbau des Proteins durch das Proteasom (Okuda et al., 1999; Okuda et al., 2001). Weitere Untersuchungen der ts-Mutante zeigten, dass ein Shift von proliferierenden Zellen von permissiver zu restriktiver Temperatur zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus führt (Ohno et al., 1984). Durch Transformation der Zellen mit Simian-Virus40 kann bei restriktiver Temperatur zwar der G1-Arrest aufgehoben werden, aber die Zellen sterben rasch. Deshalb wurde vermutet, dass D123 nicht direkt an der Zellzyklusprogression beteiligt ist, sondern an einem anderen Prozess, dessen Störung zur Aktivierung eines Zellzyklus-Kontrollpunkts führt (Ohno und Kimura, 1984). Der Nachweis von D123-mRNA und -Protein in zahlreichen Geweben und Zelllinien spricht für eine ubiquitäre Expression (Onisto et al., 1998). Die Visualisierung von D123 mit Hilfe von GFP-Fusionen zeigte eine Lokalisation in cytoplasmatischen Foci in PLC-Zellen (Hoja et al., 2000) und eine homogene cytoplasmatische Verteilung in HeLa-Zellen und *Saccharomyces cerevisiae* (Richter, 2006). Das D123-orthologe Gen in *Saccharomyces cerevisiae* trägt die Bezeichnung *CDC123* (cell division cycle 123) und ist ein essentielles Gen. Das humane D123-Gen kann die Deletion von *CDC123* in Hefe komplementieren (Bieganowski et al., 2004; Richter, 2006). Die Funktion von Cdc123 ist also von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Auch in Hefe führen temperatursensitive Allele von *CDC123* bei restriktiver Temperatur zu einem Arrest in der G1-Phase (Richter, 2006), ähnlich wie dies für das D123-ts-Allel in der Ratten-Zelllinie beobachtet wurde.

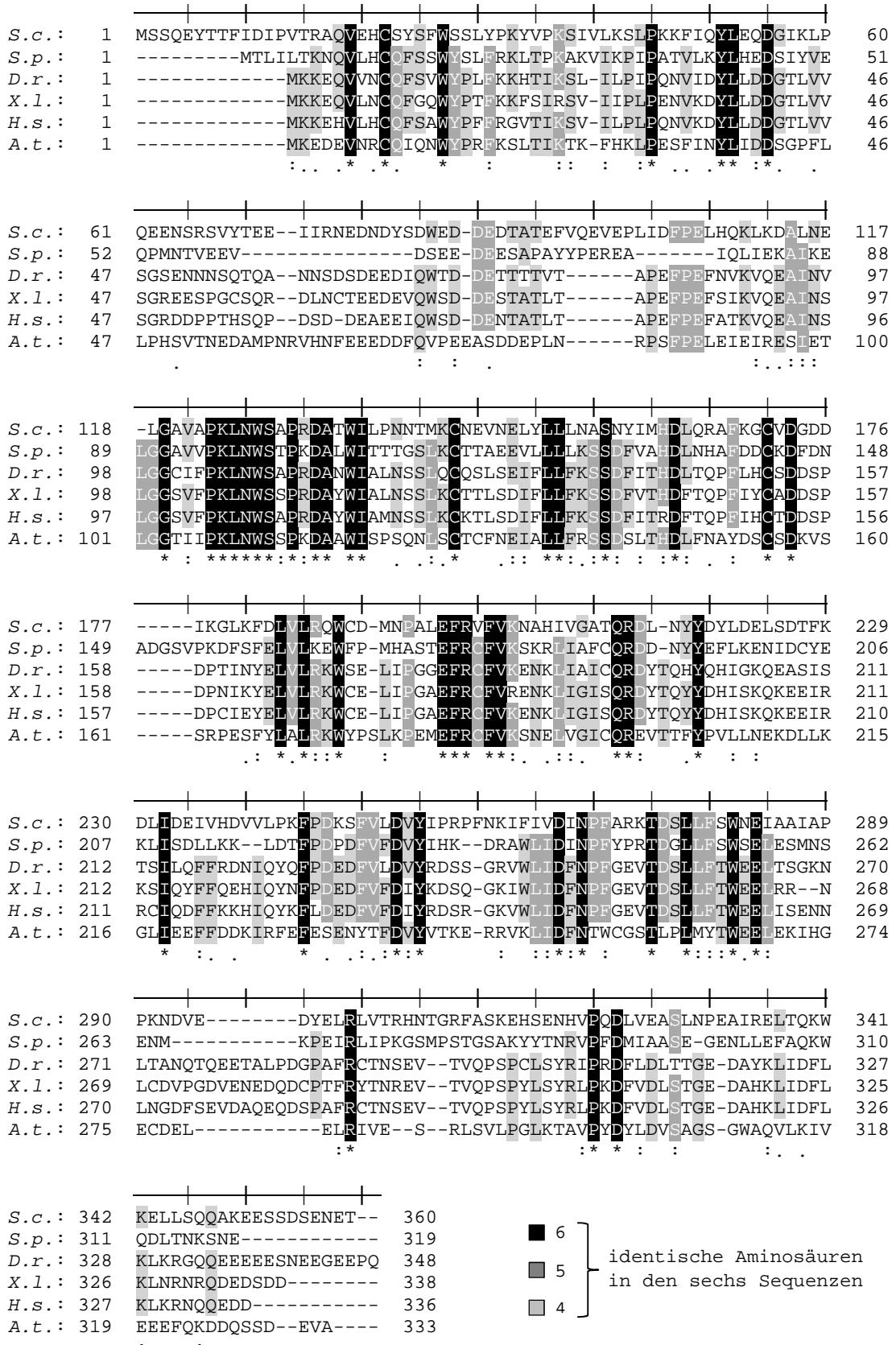


Abbildung 3.6: Sequenzvergleich von Cdc123-Orthologen aus verschiedenen Spezies

(Erläuterung siehe nächste Seite)

**Abbildung 3.6: Sequenzvergleich von Cdc123-Orthologen aus verschiedenen Spezies**

(Abbildung siehe vorige Seite)

Das Alignment von Cdc123-Orthologen aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S.p.*), *Danio rerio* (*D.r.*), *Xenopus laevis* (*X.l.*), *Homo sapiens* (*H.s.*) und *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*) wurde mit Clustal-Omega erstellt. Der Balken über den Sequenzen markiert jede fünfte Aminosäure des Alignments. Die Konservierung der Sequenz ist zum einen durch die Clustal-Bewertung unterhalb der Sequenzen, zum anderen durch die Hervorhebung identischer Aminosäuren in den Sequenzen in verschiedenen Graustufen dargestellt.

Erste Untersuchungen in Hefe zeigten, dass Cdc123 mit der  $\gamma$ -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2 (Gcd11) und den E3-Ubiquitin-Ligasen Chf1 und Chf2 interagiert, welche eine FHA- und eine RING-Domäne enthalten. Daraufhin wurde ein Modell vorgeschlagen, demzufolge Gcd11 ein Substrat von Chf1 und Chf2 ist und Cdc123 den Abbau von Gcd11 verhindert, indem es die Ubiquitin-Ligasen destabilisiert. Allerdings ist *CDC123* auch in einem *chf1Δ chf2Δ* Stamm essentiell, weshalb die Destabilisierung von Chf1 und Chf2 nicht die wesentliche Funktion von Cdc123 sein kann (Bieganowski et al., 2004).

Frank Richter konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit zeigen, dass Cdc123 wichtig für die Integrität des trimeren eIF2-Komplexes und somit für die Translationsinitiation ist. So weisen *cdc123*-Mutanten einen verringerten Anteil an Polysomen auf und die Kombination von *cdc123*-Allelen mit Deletionsmutanten zahlreicher nicht-essentieller Translationsinitiationsfaktoren verursacht starke Wachstumsdefekte. Cdc123 interagiert mit Gcd11 (eIF2 $\gamma$ ), aber nicht mit den Translationsinitiationsfaktoren eIF2B und eIF3 oder der Rps2-Untereinheit des 40S Ribosoms. Durch Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten (Sui2, Sui3 und Gcd11) in *cdc123*-Mutanten verringert ist. Außerdem supprimiert die gemeinsame Überexpression von *SUI2* (eIF2 $\alpha$ ) und *GCD11* (eIF2 $\gamma$ ) die Letalität der *CDC123*-Deletion. Diese Daten sprechen dafür, dass Cdc123 die Assemblierung des eIF2-Komplexes fördert und dass dies die essentielle Funktion von Cdc123 darstellt (Richter, 2006).

Nachdem die Zellzyklusprogression auf die Synthese von Proteinen und damit auf die Translationsinitiation angewiesen ist, sind die Auswirkungen von *cdc123*-Mutanten auf den Zellzyklus vermutlich eine Folge der reduzierten eIF2-Integrität (Richter, 2006). In der Tat ist besonders der G1/S-Übergang empfindlich für Störungen der eIF2-Funktion (Weinzierl, 2011), was im Einklang mit der Akkumulation von *cdc123*-Mutanten in der G1-Phase steht.

### 3.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von Cdc123 näher charakterisiert werden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse der Wechselwirkung von Cdc123 mit Gcd11. Zunächst sollte geklärt werden, ob weitere Proteine am Cdc123-Gcd11-Komplex beteiligt sind. Ein anderer Aspekt war die Identifizierung von Domänen oder Motiven, welche die Interaktion von Cdc123 und Gcd11 vermitteln. Außerdem sollten die Studien zur Bedeutung von Cdc123 für die Integrität und Funktionalität von eIF2 vertieft werden.

Da *in vitro* Studien mit Protein-Microarrays eine Phosphorylierung von Cdc123 nahe gelegt hatten (Ptacek et al., 2005), lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Analyse der Phosphorylierung von Cdc123. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine mögliche regulatorische Rolle von Cdc123 gerichtet: Die gut untersuchte Regulation der eIF2-Aktivität über die Phosphorylierung der eIF2 $\alpha$ -Untereinheit und Inhibition von eIF2B (vgl. 3.2.3.1) zeigt das große Potential der Regulation der Translationsinitiation über eIF2. Die essentielle Rolle von Cdc123 für die eIF2-Integrität eröffnet die attraktive Möglichkeit einer weiteren Regulation der eIF2-Aktivität: Durch Aktivierung oder Inhibition von Cdc123 (z.B. über Phosphorylierung) könnte die Menge an eIF2-Komplex moduliert werden. Die Untersuchung dieser Hypothese war ein weiterer wichtiger Aspekt der Arbeit.

## 4. ERGEBNISSE

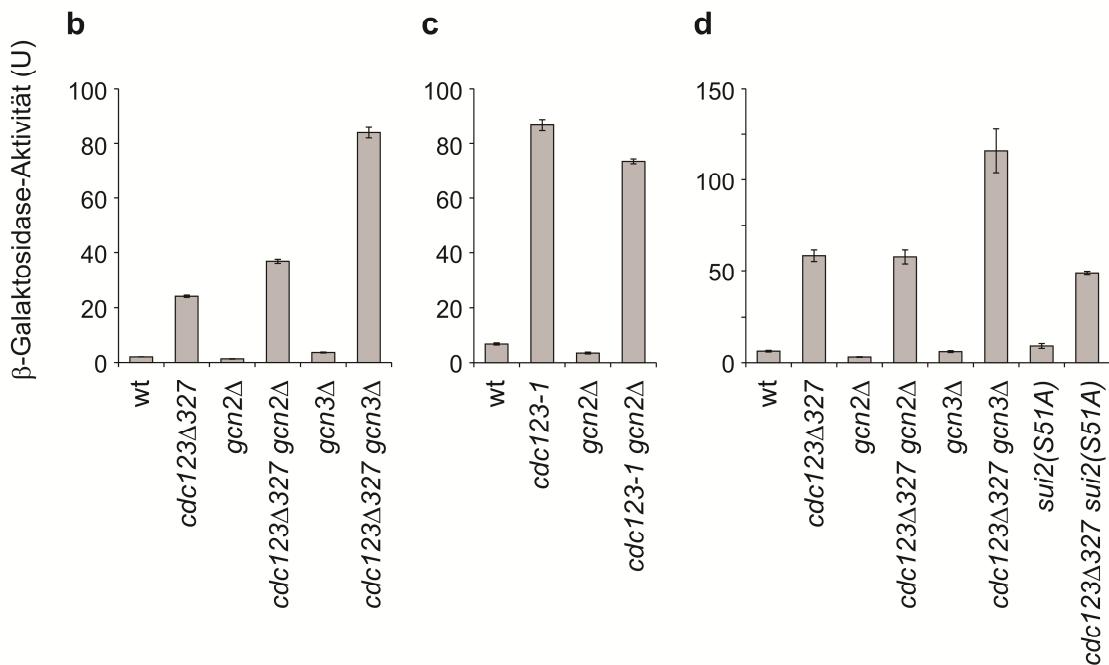
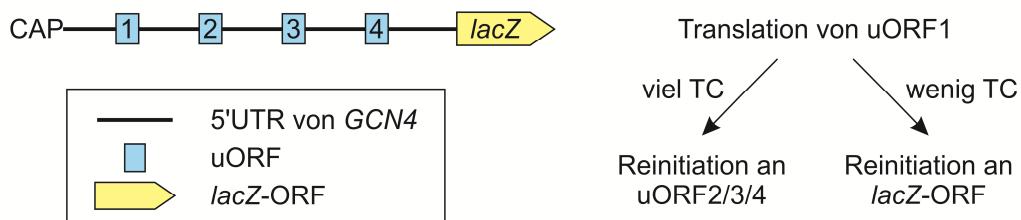
### 4.1 Cdc123-Defekte verursachen einen Gcd<sup>-</sup>-Phänotyp

In *cdc123*-Mutanten ist die Translationsinitiation beeinträchtigt, was sich in einem reduzierten Verhältnis von Polysomen zu Monosomen widerspiegelt (Richter, 2006). Auf Grund der Rolle von Cdc123 für die Integrität des heterotrimeren eIF2-Komplexes ist die Vermutung naheliegend, dass die beobachtete Beeinträchtigung der Translationsinitiation in *cdc123*-Mutanten auf eine verringerte Verfügbarkeit an ternären Komplexen aus eIF2, GTP und Met-tRNA<sub>i</sub> zurückzuführen ist (Richter, 2006). Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von *GCN4* untersucht, welche äußerst sensitiv auf die Konzentration an ternären Komplexen (TC) reagiert. Eine Anordnung von uORFs in der *GCN4*-mRNA sorgt dafür, dass die Expression von *GCN4* bei hohen Konzentrationen an TC gering ist und bei niedrigen TC-Konzentrationen ansteigt (für eine ausführliche Beschreibung vgl. 3.2.3.1). Dieser Mechanismus dient in der Zelle zur verstärkten *GCN4*-Expression bei Aminosäuremangel: Unter diesen Bedingungen wird die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 (Sui2) durch die Kinase Gcn2 phosphoryliert, wodurch der von eIF2B katalysierte Nukleotidaustausch inhibiert wird. Dadurch sinkt die Menge an eIF2-GTP und damit auch an TC und die Expression von *GCN4* steigt an.

Mutationen in den Untereinheiten von eIF2 oder eIF2B, welche zu einer Verringerung der TC-Menge führen, verursachen eine konstitutiv erhöhte *GCN4*-Expression. Ein wichtiges Merkmal dieses Gcd<sup>-</sup>-Phänotyps (*general control derepressed*) von eIF2- und eIF2B-Mutanten ist die Unabhängigkeit von der Kinase Gcn2. Mit Hilfe eines *GCN4-lacZ*-Reporters (Hinnebusch, 1985) wurde der Einfluss von *cdc123*-Mutationen auf die *GCN4*-Expression untersucht: Bei diesem Konstrukt wird die *lacZ*-Expression durch den Promotor und die 5'UTR von *GCN4* reguliert (Abb. 4.1a). Durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase( $\beta$ -Gal)-Aktivität kann somit die *GCN4*-Expression analysiert werden.

#### 4.1.1 Die rezessiven Allele *cdc123Δ327* und *cdc123-1* führen zu einem Gcn2-unabhängigen Anstieg der *GCN4*-Expression

Frank Richter konnte bereits eine Derepression der *GCN4*-Expression in *cdc123*-Mutanten nachweisen (Richter, 2006): Dies deutet darauf hin, dass durch die verringerte Assoziation der eIF2-Untereinheiten in diesen Stämmen die Menge des TC erniedrigt ist. Um einen Einfluss der eIF2-Phosphorylierung auszuschließen, wurde das hypomorphe *cdc123Δ327*-Allel mit der Deletionsmutante *gcn2Δ* kombiniert. Die Doppelmutante (*cdc123Δ327 gcn2Δ*) zeigte eine ähnlich hohe *GCN4*-Expression wie die *cdc123Δ327* Einzelmutante (Abb. 4.1b), d.h. die Derepression der *GCN4*-Expression durch *cdc123Δ327* ist unabhängig von Gcn2 und damit von der eIF2-Phosphorylierung.

**a GCN4-lacZ-mRNA:****Abbildung 4.1: *cdc123*-Mutanten haben einen Gcd<sup>-</sup>-Phänotyp.**

Heterozygot diploide Stämme wurden mit einem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid transformiert und sporuliert. Nach der Tetradenanalyse wurden haploide Nachkommen mit Reporterplasmid in Selektivmedium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde durch einen ONPG-Test bestimmt. Die Ergebnisse der Messung von drei unabhängigen Kulturen sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

**a**, Schematische Darstellung des *GCN4-lacZ*-Reporters: Aufbau der mRNA und Regulation der Translation (zum Mechanismus vgl. auch Abschnitt 3.2.3.1)

**b**, Haploide Nachkommen der S288c-Stämme W10839 pWS1429 (*CDC123/cdc123Δ327-ha3-natMX4 GCN2/gcn2Δ::kanMX6* pWS1429) und W4893 (*CDC123/cdc123Δ327-ha3-natMX4 GCN3/gcn3Δ::kanMX4* pWS1429) wurden in SD-U bei 25°C kultiviert. Wachsende Kulturen wurden auf OD<sub>600</sub>=0,1 in SD-U verdünnt, weitere 6 h bei 25°C kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen.

**c**, Haploide Nachkommen des S288c-Stammes W10840 pWS3396 (*CDC123/cdc123-1-ha3-URA3 GCN2/gcn2Δ::kanMX6* pWS3396) wurden in SD-L bei 25°C kultiviert, auf OD<sub>600</sub>=0,1 in SD-L verdünnt und für 4 h bei 30°C kultiviert.

**d**, Haploide Nachkommen von pWS1429-Transformanden der W303-Stämme W9857 (*CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6 GCN2/gcn2Δ::natNT2*), W10749 (*CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6 GCN3/gcn3Δ::natNT2*) und W10752 (*CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6 SUI2/sui2Δ::natNT2* pRS315-pSUI2-sui2(S51A)-tCYC1) wurden in SD-U bei 25°C kultiviert. Wachsende Kulturen wurden auf OD<sub>600</sub>=0,1 in SD-U verdünnt und weitere 6 h bei 25°C kultiviert.

Außerdem wurde die Kombination von *cdc123Δ327* mit der Deletion von *GCN3* untersucht. Gcn3, die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2B, ist notwendig für die Inhibition von eIF2B durch phosphoryliertes eIF2. Dementsprechend verhindert die Deletion von *GCN3* den Anstieg der *GCN4*-Expression bei eIF2-Phosphorylierung (Hinnebusch, 2000). Die Derepression der *GCN4*-Expression durch das *cdc123Δ327*-Allel konnte jedoch durch die Deletion von *GCN3* nicht verhindert werden, die Doppelmutante (*cdc123Δ327 gcn3Δ*) zeigte sogar eine höhere *GCN4*-Expression als die *cdc123Δ327* Einzelmutante (Abb. 4.1b). Die Kombination der *cdc123*- und *gcn3*-Mutationen führt also zu einer starken Beeinträchtigung der Bildung des TC. Dies steht im Einklang mit dem langsamen Wachstum der Doppelmutanten, welches bei einer Analyse von synthetischen genetischen Interaktionen beobachtet wurde (Richter, 2006).

Der Gcd<sup>-</sup>-Phänotyp konnte auch für das temperatursensitive *cdc123-1*-Allel bestätigt werden: Bei semipermissiver Temperatur (30°C) führte das *cdc123-1*-Allel zu einer Gcn2-unabhängigen Derepression der *GCN4*-Expression (Abb. 4.1c).

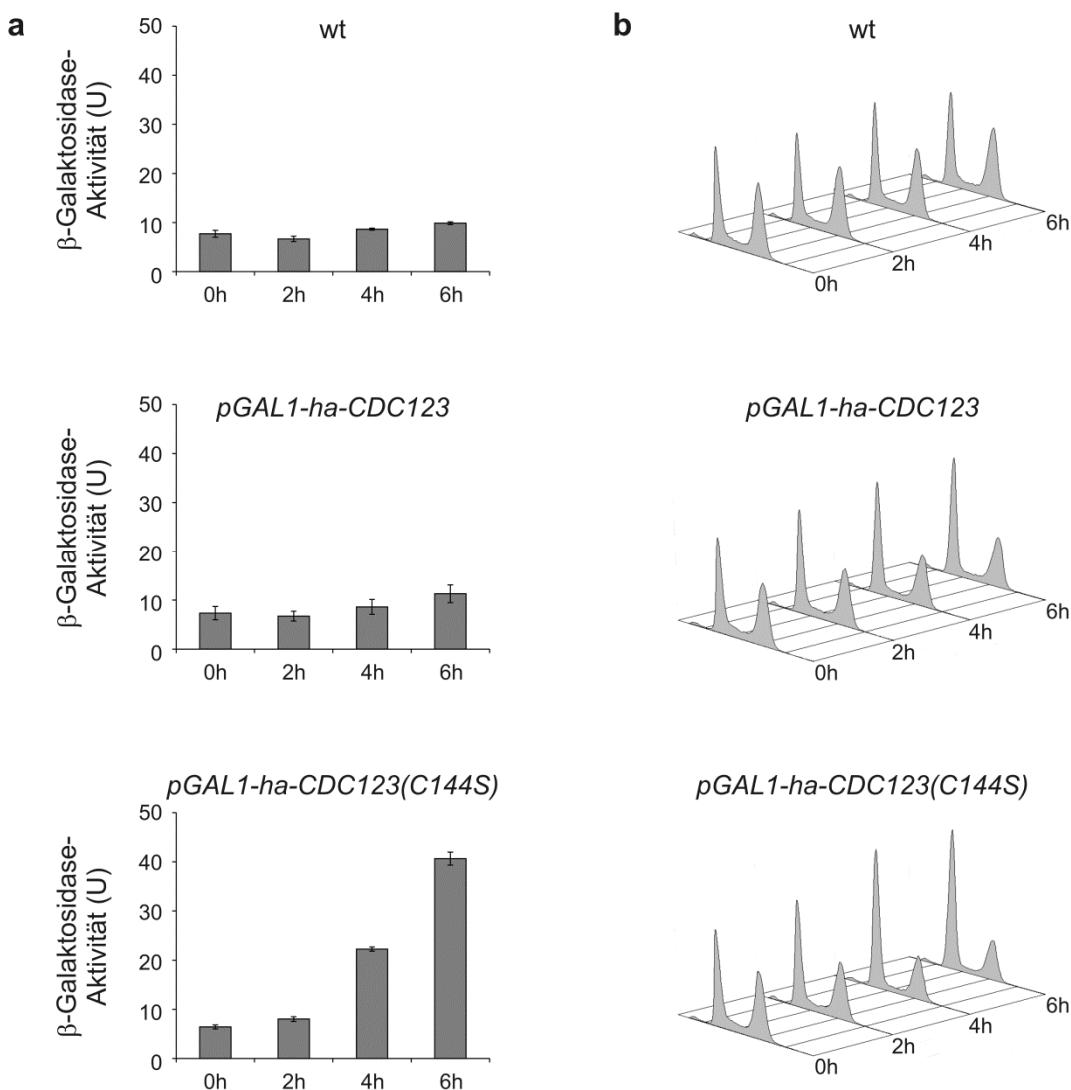
Auch in einem anderen Stammhintergrund (W303) verursachte das hypomorphe Allel *cdc123Δ327* einen Anstieg der *GCN4*-Expression (Abb. 4.1d), welcher weder durch die Deletion von *GCN2* oder *GCN3*, noch durch die Einführung einer nicht-phosphorylierbaren Sui2-Variante (*sui2-S51A*) verhindert wurde und dementsprechend unabhängig von der Sui2-Phosphorylierung ist. Wie auch im S288c-Hintergrund beobachtet, trat bei der Kombination von *cdc123Δ327* mit *gcn3Δ* ein synthetischer Effekt auf.

Der Gcd<sup>-</sup>-Phänotyp der *cdc123*-Allele bestätigt, dass Cdc123 wichtig für die Menge an ternären Komplexen ist, und legt somit eine Rolle von Cdc123 für die Funktionalität von eIF2 nahe. Während in diesem Abschnitt rezessive *cdc123*-Allele untersucht wurden, befasst sich der nächste Abschnitt mit den dominanten Effekten, welche bei der Überexpression von Cdc123(C144S) auftreten.

#### **4.1.2 Die Überexpression von Cdc123(C144S) verursacht eine erhöhte *GCN4*-Expression**

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden drei konservierte Cysteine von Cdc123 (C22, C144, C171) gegen Serin ausgetauscht (Heigl, 2007). Alle Varianten konnten bei Expression vom endogenen Promotor die Deletion von *CDC123* komplementieren und die resultierenden Stämme wuchsen ähnlich wie der Wildtyp. Bei der Überexpression durch den *GAL1*-Promotor zeigte sich jedoch für Cdc123(C144S) ein deutlich verlangsamtes Wachstum, selbst wenn zusätzlich das endogene *CDC123* vorhanden war. Der Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 wurde durch Co-Immunpräzipitationen von ha-Cdc123 und Gcd11-myc analysiert. Diese wurden sowohl bei Expression der ha-Cdc123-Varianten durch den endogenen Promotor als auch bei Überexpression durch den *GAL1*-Promotor durchgeführt und zeigten, dass die Interaktion von

Cdc123 mit Gcd11 durch den C144S-Austausch nicht beeinträchtigt wurde (Heigl, 2007). Mit Hilfe des *GCN4-lacZ*-Reporters wurde untersucht, ob die Überexpression von Cdc123(C144S) die Bildung des ternären Komplexes stört, was sich in einem Anstieg der *GCN4*-Expression widerspiegeln würde. Dazu wurden Stämme verwendet, welche ein Wildtyp-Gen am *CDC123*-Lokus und die Überexpressionskonstrukte *pGAL1-ha3-CDC123* bzw. *pGAL1-ha3-CDC123(C144S)* im *leu2*-Marker enthalten.



**Abbildung 4.2: Die Überexpression von Cdc123(C144S) führt zu einem Anstieg der *GCN4*-Expression und einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase.**

a, Die Stämme K699 (WT), W6388 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W6390 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123(C144S)-tCYC1-LEU2*) wurden mit dem Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Je drei Transformanden wurden in SR-U bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase wurde 2% Galaktose zur Induktion des *GAL1*-Promotors zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurde die β-Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

b, Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden die Stämme in XYL bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase 2% Galaktose zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 1 OD Zellen mit Ethanol fixiert. Die Proben wurden mit Sytox Green gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

In der Tat stieg die GCN4-Expression nach Induktion von *pGAL1-ha3-CDC123(C144S)* stark an, während sie bei Induktion von *pGAL1-ha3-CDC123* im Vergleich zum Wildtyp-Kontrollstamm nur geringfügig zunahm (Abb. 4.2a). Außerdem verursachte die Überexpression von *CDC123(C144S)* eine Akkumulation von Zellen in der G1-Phase (Abb. 4.2b), wie sie für eine beeinträchtigte Funktion von eIF2 typisch ist (Weinzierl, 2011). Selbst in Anwesenheit endogener Mengen von Wildtyp-Cdc123 führt die Überexpression von Cdc123(C144S) zu einer Reduktion der Menge an ternären Komplexen. In Kombination mit den Ergebnissen der Co-Immunpräzipitationen (Heigl, 2007) legen diese Daten den Schluss nahe, dass Cdc123(C144S) zwar an Gcd11 bindet, aber nicht voll funktionsfähig ist.

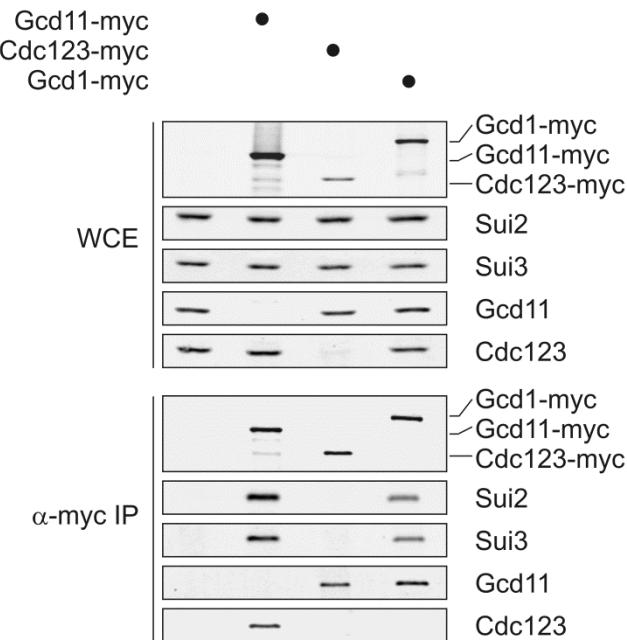
## 4.2 Cdc123 bindet an monomeres Gcd11

In mehreren Screens für Proteininteraktionen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System oder Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie wurde die Interaktion von Cdc123 mit der eIF2-Untereinheit Gcd11 nachgewiesen (Ho et al., 2002; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006; Yu et al., 2008). Gcd11 bildet mit Sui2 und Sui3 den trimeren eIF2-Komplex, welcher mit zahlreichen weiteren Translationsinitiationsfaktoren interagiert. Deshalb stellte sich die Frage, ob Cdc123 auch mit anderen Komponenten der Translationsinitiation interagiert und ob die beobachtete Interaktion mit Gcd11 möglicherweise indirekt ist. Frank Richter untersuchte die Interaktion von Cdc123 mit verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren durch Co-Immunpräzipitation von myc- und ha-epitopmarkierten Proteinen: Bei der Immunpräzipitation von Cdc123-myc war Gcd11-ha gut detektierbar, während eine Interaktion mit Sui2-ha kaum nachweisbar war und keine Interaktion mit anderen Initiatonsfaktoren (eIF2B, eIF3) beobachtet wurde (Richter, 2006). Die Analyse der Interaktion von Cdc123 mit den drei eIF2-Untereinheiten (Sui2, Sui3 und Gcd11) wurde durch Co-Immunpräzipitationen aus Hefe und Co-Expression und -Präzipitation aus *E. coli* vertieft.

### 4.2.1 Cdc123 interagiert mit monomerem Gcd11, nicht mit dem eIF2-Komplex

Um zu untersuchen, ob Cdc123 in Hefe mit dem eIF2-Heterotrimer interagiert, wurde Cdc123-myc immunpräzipitiert und die Co-Präzipitation der drei eIF2-Untereinheiten (Sui2, Sui3 und Gcd11) im Western Blot mit spezifischen Antiseren analysiert. Als Kontrollen dienten Gcd11 und die eIF2B-Untereinheit Gcd1 (eIF2B $\gamma$ ), welche ebenfalls über ein C-terminales myc-Epitop immunpräzipitiert und auf ihre Interaktion mit den eIF2-Untereinheiten sowie mit Cdc123 getestet wurden (Abb. 4.3). Wie erwartet, war bei Gcd11-myc die Interaktion sowohl mit Sui2 und Sui3, als auch mit Cdc123 deutlich erkennbar. Die Präzipitation von Gcd1-myc zeigte die Interaktion von eIF2B mit allen drei Untereinheiten von eIF2, aber nicht mit Cdc123. Bei der Präzipitation von Cdc123-myc war zwar eine vergleichbare Menge an Gcd11 nachweisbar wie bei der Präzipitation von Gcd1-myc, die anderen

eIF2-Untereinheiten Sui2 und Sui3 waren dagegen nicht nachweisbar. Dies zeigt, dass Cdc123 bevorzugt monomeres Gcd11 und nicht den trimeren eIF2-Komplex bindet. Dementsprechend interagiert Cdc123 auch nicht mit anderen Initiationsfaktoren, wie eIF2B, welche mit dem eIF2-Heterotrimer wechselwirken.



**Abbildung 4.3: Im Gegensatz zu eIF2B interagiert Cdc123 nur mit Gcd11, aber nicht mit Sui2 und Sui3.**

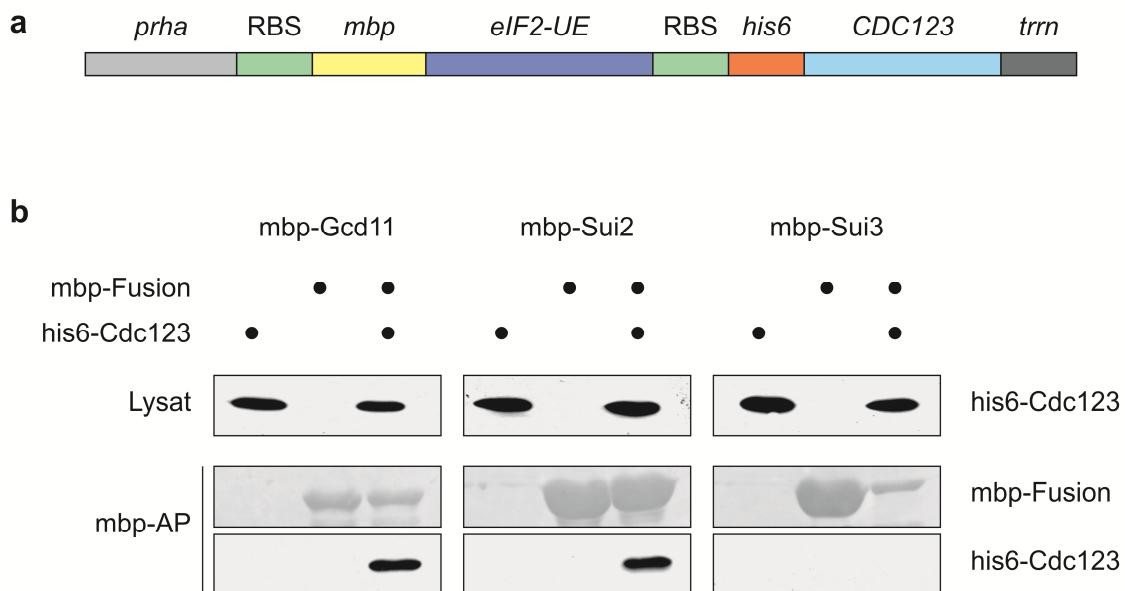
Die Stämme BY4741 (WT), W4177 (*GCD11-myc13-kanMX6*), W5294 (*CDC123-myc13-kanMX6*) und W4887 (*GCD1-myc13-HIS3MX6*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurden die myc-epitopmarkierten Proteine mit 9E10-Antikörper präzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP) wurden im Western Blot analysiert, wobei 9E10-Antikörper, spezifische Antiseren für Sui2 und Sui3 und affinitätsgereinigte Antiseren für Cdc123 und Gcd11 verwendet wurden.

#### 4.2.2 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist direkt

Bei der Immunpräzipitation lässt sich nicht unterscheiden, ob zwei Proteine direkt interagieren oder ob die Interaktion indirekt über ein drittes Protein vermittelt wird. Deshalb wurde die Interaktion von Gcd11 und Cdc123 durch heterologe Expression in *Escherichia coli* überprüft. Da es in Eubakterien keine Homologen zu eIF2 gibt (Rodnina und Wintermeyer, 2009), ist eine indirekte Interaktion über ein bakterielles Protein äußerst unwahrscheinlich. Zunächst wurden Maltose-Bindeprotein(mbp)- und his6-Fusionen getrennt exprimiert und gereinigt und anschließend *in vitro* auf Interaktion getestet. Dabei ließ sich jedoch weder eine Gcd11-Cdc123-Interaktion noch die bekannten Gcd11-Sui2- oder Gcd11-Sui3-Interaktionen nachweisen (Küpper, 2007). In der Tat kommt es bei der Expression von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* teilweise zur Fehlfaltung, Aggregation oder Assoziation mit bakteriellen Hitzeschockproteinen, was anschließende Studien zu Proteininteraktionen beeinträchtigt. In solchen Fällen kann eine Co-Expression der untersuchten Interaktionspartner in *E. coli* vorteilhaft sein (Fribourg et al., 2001; Tan, 2001). Deswegen wurden

bicistronische Expressionskonstrukte für mbp-Fusionen von eIF2-Untereinheiten und his6-Cdc123 erstellt (Abb. 4.4a). Nach Expression in *E. coli* wurde die mbp-Fusion über eine Amylose-Matrix präzipitiert und die Co-Präzipitation von his6-Cdc123 im Western Blot analysiert (Abb. 4.4b). Die Interaktion von his6-Cdc123 mit mbp-Gcd11 war deutlich nachweisbar, was die direkte Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 bestätigt. Auch bei mbp-Sui2 war eine Interaktion mit his6-Cdc123 detektierbar: Berücksichtigt man die in der Ponceau-Färbung sichtbaren Unterschiede zwischen den präzipitierten Mengen an mbp-Gcd11 und mbp-Sui2, ist die Interaktion von Cdc123 mit Sui2 deutlich schwächer als mit Gcd11. Bei mbp-Sui3 war keine Interaktion mit his6-Cdc123 nachweisbar, allerdings war die präzipitierte Menge an mbp-Sui3 auch eher gering.

Durch heterologe Expression in *E. coli* konnte also die direkte Interaktion von Gcd11 und Cdc123 bestätigt werden. Außerdem sprechen die Daten für eine (schwache, aber direkte) Interaktion von Sui2 und Cdc123.



**Abbildung 4.4: Cdc123 interagiert mit Gcd11 und Sui2 bei Co-Expression in *E. coli*.**

**a**, Schematische Darstellung der Co-Expressionskonstrukte (nicht maßstabsgetreu): Die verwendeten Plasmide enthalten einen Rhamnose-induzierbaren Promotor (*prha*). Auf diesen folgt eine Fusion der Gene für das Maltose-Bindegprotein (*mbp*) und einer Untereinheit (UE) von eIF2 (*SUI2*, *SUI3* oder *GCD11*). Danach kommt eine Fusion von his6-Motiv (*his6*) und *CDC123*. Den Abschluss bildet ein Transkriptionsterminator (*trrn*). Bei der Transkription wird eine bicistronische mRNA erstellt, welche zwei Ribosomenbindestellen (RBS) zur Translation der mbp- und his6-Fusionsproteine enthält.

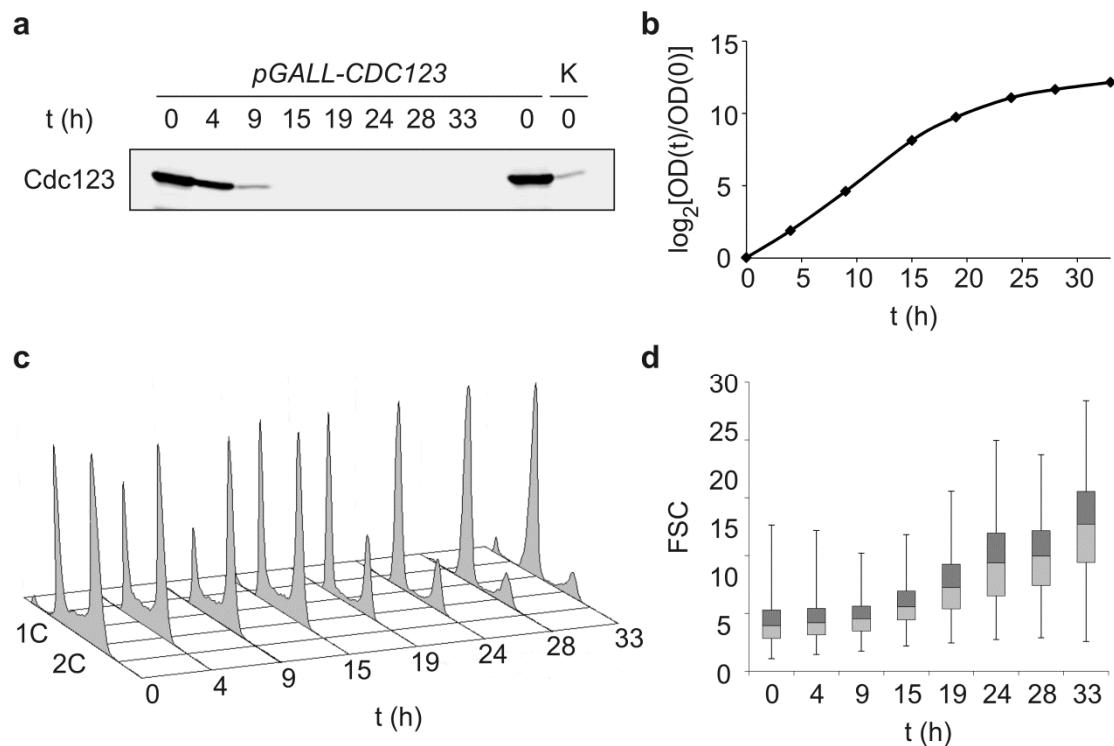
**b**, Der *E. coli*-Stamm BL21C+ wurde mit den Plasmiden pWS1389, pWS1483, pWS1696, pWS1697, pWS1957, pWS1995 und pWS2120 transformiert, in LB<sub>amp,chl</sub> bei 20°C kultiviert und der Promotor *prha* durch Zugabe von 0,2% Rhamnose für ca. 20 h induziert. Nach Aufschluss der Zellen in der French Press wurde das mbp-Fusionsprotein durch eine Amylosematrix präzipitiert. Lysate und Präzipitate (mbp-AP) wurden im Western Blot mittels α-his-Antikörper auf das Vorhandensein von his6-Cdc123 getestet. Die Präzipitation der mbp-Fusionen war in der Ponceau-Färbung der Western-Blot-Membran sichtbar.

## 4.3 Cdc123 fördert die Interaktion der eIF2-Untereinheiten

Die bisherigen Experimente haben zum einen die direkte Bindung von Cdc123 an Gcd11, zum anderen die Bedeutung von Cdc123 für die Bildung des ternären Komplexes gezeigt. Frank Richter hat die Funktion von Cdc123 genauer analysiert und konnte nachweisen, dass die Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten in *cdc123*-Mutanten verringert ist (Richter, 2006). Seine Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt und erweitert. Dabei wurde zur Analyse der Auswirkungen einer verringerten Cdc123-Funktion neben *cdc123*-Mutanten auch die Repression der *CDC123*-Expression und somit die Verringerung der Cdc123-Menge eingesetzt. Dadurch konnte Cdc123 mit anderen Translationsinitiationsfaktoren verglichen werden, welche zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht worden waren (Weinzierl, 2011). In jener Diplomarbeit wurden mehrere Gene, die essentielle Translationsinitiationsfaktoren codieren, unter Kontrolle des *GALL*-Promotors gestellt und ihre Expression durch Zugabe von Glukose reprimiert. Dabei zeigte sich, dass die Beeinträchtigung von eIF2 (entweder durch Depletion von eIF2-Untereinheiten oder durch Depletion von eIF2B-Untereinheiten, was die Regeneration von eIF2-GDP zu eIF2-GTP verhindert) zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt, während bei der Depletion anderer Translationsinitiationsfaktoren kein ausgeprägter G1-Arrest eintrat (Weinzierl, 2011).

### 4.3.1 Die Depletion von Cdc123 verringert die Assoziation der eIF2-Untereinheiten und verursacht einen Arrest in der G1-Phase

In einem haploiden Stamm wurde die einzige Kopie von *CDC123* unter die Kontrolle des regulierbaren *GALL*-Promotors gestellt. Nach dem Überführen von Raffinose/Galaktose- in Glukose-Medium wurde die Auswirkung der Repression der *CDC123*-Expression auf Wachstum und Zellzyklusprogression verfolgt (Abb. 4.5). Zunächst nahm der Anteil an Zellen mit 1C-DNA-Gehalt ab, wie es für Stämme aus dem W303-Hintergrund beim Wechsel von Raffinose/Galaktose zu Glukose typisch ist. Bei längerer Kultivierung in Glukosemedium wurden die Folgen der Cdc123-Depletion sichtbar: die Zellen akkumulierten in der G1-Phase (Abb. 4.5c) und nahmen an Größe zu, was sich in der Zunahme des Vorwärtsstreuolights (Forward Scatter, FSC) zeigte (Abb. 4.5d). Dieses Verhalten wurde auch bei der Depletion von eIF2 oder eIF2B beobachtet (Weinzierl, 2011). Bei Depletion von Cdc123 treten die Effekte auf Zellzyklus und Zellgröße allerdings später ein, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass *CDC123* durch den *GALL*-Promotor stark überexprimiert wird und die Cdc123-Menge erst 9 h nach der Repression des *GALL*-Promotors das endogene Cdc123-Niveau erreicht (Abb. 4.5a). Die Depletionsstudien unterstreichen also den funktionellen Zusammenhang von Cdc123 und eIF2.



**Abbildung 4.5: Die Depletion von Cdc123 führt zu einem Arrest der Zellen in G1.**

Der Stamm W9791, in welchem *CDC123* unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors steht, wurde in XYRG bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase in XYD umgesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben für Proteinlysate und Ethanol-Fixierung entnommen. Während der Zeitreihe wurde die Kultur fortwährend verdünnt, um eine Zelldichte von  $\text{OD}_{600} < 1$  zu gewährleisten.

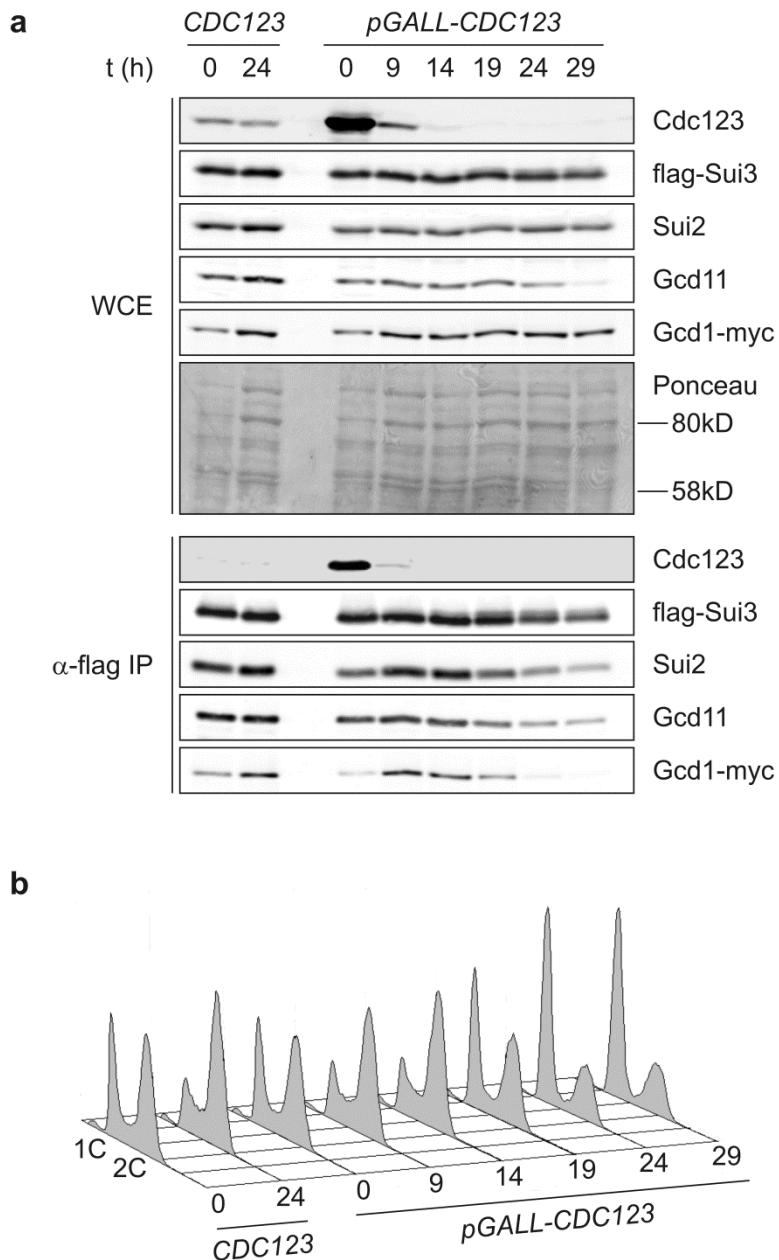
**a,** Die Menge an Cdc123 in den Proteinlysaten wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem affinitätsgereinigten Antiserum untersucht. Als Kontrolle (K) diente der Stamm W9796, welcher *CDC123* vom endogenen Promotor exprimiert und in XYRG kultiviert wurde.

**b,** Das Wachstum wurde durch Messung der  $\text{OD}_{600}$  der Kultur verfolgt. Auf der horizontalen Achse ist die Zeit in Stunden dargestellt und auf der vertikalen Achse die Anzahl der Teilungen seit dem Beginn der Zeitreihe. Zur Berechnung der Anzahl der Teilungen wurde die gemessene  $\text{OD}_{600}$  um die Verdünnung der Kultur seit Beginn der Zeitreihe korrigiert, der Quotient zur  $\text{OD}_{600}$  am Beginn der Zeitreihe gebildet und davon der Logarithmus zur Basis 2 genommen.

**c,** Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden Ethanol-fixierte Proben mit Sytox Green gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

**d,** Der Forward Scatter (FSC) der Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen und als Box-Plot dargestellt.

Um die Rolle von Cdc123 für die Integrität des heterotrimeren eIF2-Komplexes zu überprüfen, wurden die Auswirkungen der Depletion von Cdc123 auf die Interaktion der eIF2-Untereinheiten durch Immunpräzipitation von flag-Sui3 untersucht (Abb. 4.6). Zusätzlich wurde die Interaktion von eIF2 und eIF2B analysiert, wofür Gcd1 (eIF2By) mit einem myc13-Epitop markiert wurde.



**Abbildung 4.6: Die Depletion von Cdc123 beeinträchtigt die Assoziation der drei eIF2-Untereinheiten und die Interaktion von eIF2 mit eIF2B.**

Die Stämme W10451 (*kanMX4-pSUI3-flag3-SUI3 GCD1-myc13-HIS3MX6*) und W10452 (*natNT2-pGALL-CDC123 kanMX4-pSUI3-flag3-SUI3 GCD1-myc13-HIS3MX6*) wurden in XYRG bei 25°C angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase in XYD umgesetzt und zu den angegebenen Zeiten Proben genommen. Während der Zeitreihe wurde die Kultur fortwährend verdünnt, um eine Zelldichte von  $OD_{600} < 1$  zu gewährleisten.

**a,** Aus Proteinlysaten wurde flag-Sui3 mittels  $\alpha$ -Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -flag IP) wurden im Western Blot analysiert, wobei die Antikörper  $\alpha$ -Flag und 9E10, Antiseren für Sui2 und Sui3 und affinitätsgereinigte Antiseren für Cdc123 und Gcd11 verwendet wurden. Bei den Lysaten ist ein Ausschnitt der Ponceau-gefärbten Membran gezeigt und die Lage der Standardbanden angegeben.

**b,** Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden Ethanol-fixierte Proben mit Sytox Green gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

In den Proteinlysaten zeigte sich bei längerer Depletion von Cdc123 (24-29 h nach dem Shift in Glukosemedium) eine Abnahme von Gcd11 und möglicherweise auch von flag-Sui3. Außerdem ist in Raffinose/Galaktosemedium (0 h-Wert) weniger Gcd1-myc nachweisbar, was vermutlich auf eine verstärkte Degradation beim Zellaufschluss zurückzuführen ist: Gcd1-myc ist mit 86 kD das größte der hier untersuchten Proteine und die Ponceau-Färbung zeigte, dass bei den Lysaten aus Raffinose/Galaktosemedium im Bereich >80 kD deutlich weniger Protein vorhanden war als bei den Lysaten aus Glukosemedium (vgl. Abb. 4.6a). Die Immunpräzipitation von flag-Sui3 ergab, dass 19 h nach der Repression der *CDC123*-Expression die Interaktion von Sui3 mit den anderen eIF2-Untereinheiten (Sui2, Gcd11) und mit eIF2B (Gcd1-myc) abnimmt (Abb. 4.6a). Zu diesem Zeitpunkt trat auch die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase ein (Abb. 4.6b). Die Effekte wurden durch die Depletion von Cdc123 und nicht durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle verursacht, da sie bei einem Stamm, der *CDC123* vom endogenen Promotor exprimiert, nicht auftraten. Ähnlich wie *cdc123*-Mutanten (Richter, 2006) führt also auch die Depletion von Cdc123 zu einer leichten Abnahme der Gcd11-Menge und einer deutlich verringerten Assoziation der eIF2-Untereinheiten. Dies hatte eine reduzierte Interaktion von eIF2 mit eIF2B und die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase zur Folge. Im Gegensatz zu anderen Versuchen (vgl. 4.2.1) war bei der Immunpräzipitation von flag-Sui3 eine schwache Interaktion von Sui3 mit Cdc123 nachweisbar. Dabei handelt es sich vermutlich nicht um eine direkte Interaktion, sondern eine indirekte Interaktion über Gcd11. Dies deutet darauf hin, dass sich die Bindung von Sui3 und Cdc123 an Gcd11 nicht gegenseitig ausschließt. Möglicherweise gibt es bei der von Cdc123 unterstützten Assemblierung von eIF2 eine Zwischenstufe, bei der sowohl Cdc123 als auch Sui3 an Gcd11 gebunden sind. Da die Interaktion von Cdc123 und Sui3 bei Überexpression von Cdc123 stark zunahm, scheint die Cdc123-Menge *in vivo* limitierend zu sein.

### **4.3.2 Nur die Depletion von Cdc123, aber nicht die Depletion von Initiationsfaktoren verringert die Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten**

In einem weiteren Experiment wurde die Depletion von Cdc123 mit der Depletion von Translationsinitiationsfaktoren (Weinzierl, 2011) verglichen. Dabei stand die Integrität von eIF2 im Vordergrund, welche durch Immunpräzipitation von Gcd11-myc untersucht wurde. Zunächst wurden mit einzelnen Stämmen Zeitreihen zur Repression des *GALL*-Promotors und Immunpräzipitation von Gcd11-myc durchgeführt. Dabei traten jedoch technische Probleme auf, welche die Interpretation der Ergebnisse erschwerten (Anhang 9.2.1): Zum einen enthielten die Proteinlysate bei Kultur der Zellen in Raffinose/Galaktosemedium (0 h-Wert) weniger Proteine im Bereich >70kD, was auch die Menge an Gcd11-myc (78 kD) reduzierte. Zum anderen zeigten die Proteinlysate nach längerer Depletion von Initiationsfaktoren eine starke Degradation von Gcd11-myc. Beide Probleme sind

vermutlich darauf zurückzuführen, dass Zellen unter ungünstigen Bedingungen (Kultur in Raffinose/Galaktosemedium oder Defekte bei der Translationsinitiation) größere Vakuolen haben und durch die Freisetzung der vakuolären Proteasen beim Zellaufschluss deshalb mehr Protein degradation stattfindet.

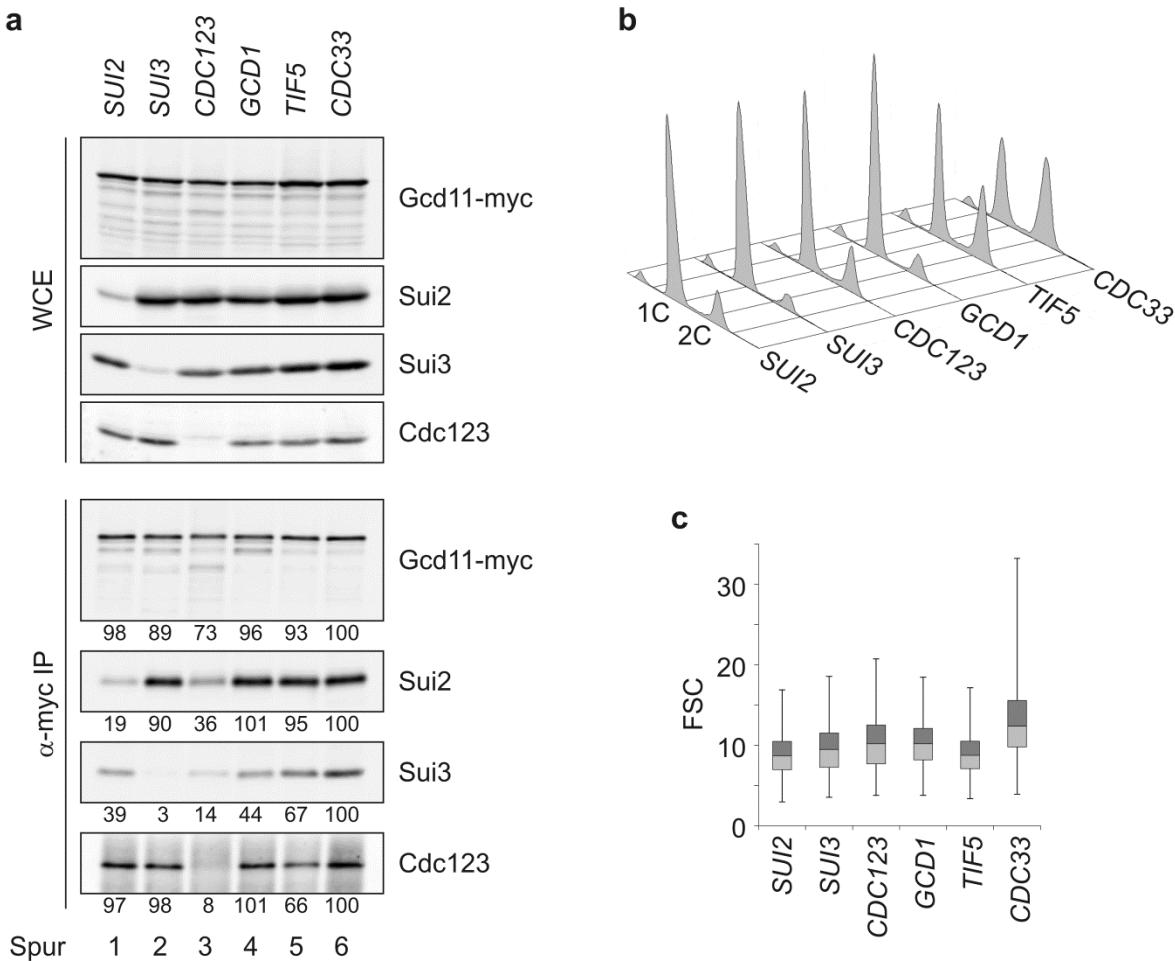
Da diese Versuche gezeigt hatten, dass Vergleiche von verschiedenen Zeitwerten nach Repression des *GALL*-Promotors oder von Depletions- und Wildtypstämmen auf Grund der unterschiedlichen Degradationsmuster von Gcd11-myc nur schlecht möglich sind, wurde ein direkter Vergleich der Depletion verschiedener Translationsinitiationsfaktoren angestrebt. Dafür wurden neben *pGALL-CDC123* folgende Depletionsstämme ausgewählt, welche im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt und charakterisiert worden waren (Weinzierl, 2011): *pGALL-SUI2* (Depletion von eIF2α), *pGALL-SUI3* (eIF2β), *pGALL-ha3-GCD1* (eIF2By), *pGALL-TIF5* (eIF5) und *pGALL-CDC33* (eIF4E). Die Depletion des Cap-Bindeproteins eIF4E (Cdc33) diente als Kontrolle, da der Vergleich mit einem Wildtypstamm aus den oben erläuterten Gründen nicht möglich war und kein Effekt der Cdc33-Depletion auf die eIF2-Integrität erwartet wurde.

Die Expression des *GALL*-Promotors wurde für 15 h reprimiert mit Ausnahme von *CDC123*: Da die Versuche in Abschnitt 4.3.1 gezeigt hatten, dass *CDC123* durch den *GALL*-Promotor stark überexprimiert wird und die Effekte der Depletion deutlich später eintreten als bei der Depletion von eIF2, wurde bei *pGALL-CDC123* neben dem 15 h-Wert auch ein 24 h-Wert untersucht. Wie erwartet waren die Auswirkungen der Cdc123-Depletion nach 15 h nur gering, weshalb in Abb. 4.7 nur der 24 h-Wert gezeigt ist.

Alle Depletions zeigen die erwarteten Auswirkungen auf den Zellzyklus (Abb. 4.7b): Die Depletion von eIF2 (Sui2 bzw. Sui3), eIF2B (Gcd1) oder Cdc123 führen zu einem deutlichen Arrest in der G1-Phase, die Depletion von Tif5 oder Cdc33 dagegen nicht (Weinzierl, 2011).

Nach Depletion des Cap-Bindeproteins Cdc33 (Spur 6 in Abb. 4.7a) ist die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui2, Sui3 und Cdc123 deutlich nachweisbar. Die co-präzipitierten Mengen wurden als Referenz für die Depletion der anderen Initiationsfaktoren verwendet.

Bei den Stämmen *pGALL-SUI2* (Spur 1) und *pGALL-SUI3* (Spur 2) ist die Depletion der entsprechenden eIF2-Untereinheiten in den Proteinlysaten sichtbar. Wie zu erwarten, verringert sich dadurch auch die Interaktion von Gcd11-myc mit dem entsprechenden Protein. Bei der Depletion von Sui3 ist die Interaktion der anderen beiden eIF2-Untereinheiten (Gcd11-myc und Sui2) unbeeinträchtigt, die Bindung von Sui2 an Gcd11 ist also unabhängig von Sui3. Dagegen ist bei der Depletion von Sui2 eine Abnahme der Interaktion von Gcd11-myc mit Sui3 erkennbar (im Vergleich zur Depletion von Cdc33); möglicherweise stabilisiert die Bindung von Sui2 also die Sui3-Gcd11-Interaktion. Die Interaktion von Gcd11-myc mit Cdc123 wird durch die Depletion von Sui2 oder Sui3 nicht beeinflusst.



**Abbildung 4.7: Die Depletion von Cdc123, aber nicht die Depletion von Translationsinitiationsfaktoren beeinträchtigt die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3.**

Die Stämme W9798 (*natNT2-pGALL-SUI2 GCD11-myc13-HIS3MX6*), W9802 (*natNT2-pGALL-SUI3 GCD11-myc13-HIS3MX6*), W9788 (*natNT2-pGALL-CDC123 GCD11-myc13-HIS3MX6*), W9822 (*natNT2-pGALL-ha3-GCD1 GCD11-myc13-HIS3MX6*), W9847 (*natNT2-pGALL-TIF5 GCD11-myc13-HIS3MX6*) und W9943 (*natNT2-pGALL-CDC33 GCD11-myc13-HIS3MX6*) wurden in XYRG bei 25°C angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase in XYD umgesetzt und nach 15 h bzw. 24 h im Fall von W9788 geerntet.

**a,** Aus den Proteinlysaten wurde Gcd11-myc mittels 9E10-Antikörper immunpräzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP) wurden im Western Blot mittels 9E10-Antikörper, Antiseren für Sui2 und Sui3 und affinitätsgereinigtem Antiserum für Cdc123 analysiert. Bei den Präzipitaten wurde die Signalstärke der Western-Blot-Banden mittels der Software des Odyssey Imagers quantifiziert und unter den entsprechenden Banden in % angegeben, wobei das Signal in Spur 6 (Depletion von Cdc33) als Referenz (Signalstärke = 100%) verwendet wurde.

**b,** Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden Ethanol-fixierte Proben mit Sytox Green gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

**c,** Der Forward Scatter (FSC) der Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen und als Box-Plot dargestellt.

Die Repression von *pGALL-CDC123* (Spur 3) führt zur Reduktion der Cdc123-Menge im Lysat und in der Immunpräzipitation von Gcd11-myc. Außerdem ist die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui2 und Sui3 verringert, wie nach den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.1 erwartet.

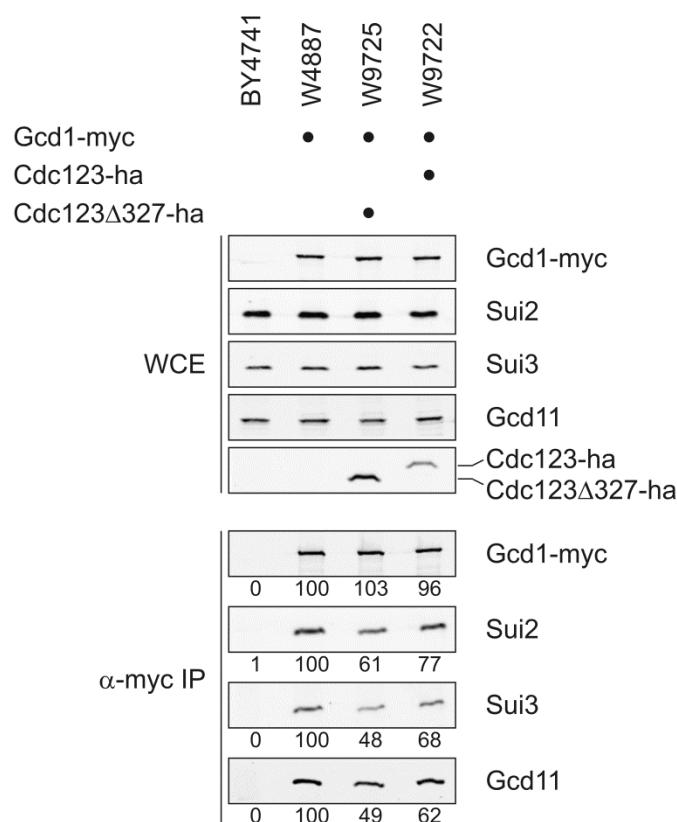
Bei der Depletion einer eIF2B-Untereinheit durch Repression von *pGALL-ha3-GCD1* (Spur 4) wird die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui2 und Cdc123 nicht beeinträchtigt, wohingegen die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui3 leicht abnimmt. Die Depletion der anderen essentiellen eIF2B-Untereinheiten (Gcd2 = eIF2B $\delta$ , Gcd6 = eIF2B $\epsilon$  und Gcd7 = eIF2B $\beta$ ) lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Bindung von Sui3 an Gcd11 schwächer ist, wenn dieses GDP und nicht GTP gebunden hat. eIF2B könnte die Sui3-Gcd11-Interaktion in diesem Fall sowohl durch die Bindung des eIF2-GDP-Komplexes als auch durch die Beschleunigung des GDP-GTP-Austausches stabilisieren.

Die Depletion von Tif5 (Spur 5), welches zusammen mit dem ternären Komplex und weiteren Initiationsfaktoren als Multifaktorkomplex (MFC) zum 40S-Ribosom rekrutiert wird und nach der Erkennung des Startcodons die GTPase-Aktivität von eIF2 stimuliert (vgl. 3.2), hat keine eindeutige Auswirkung auf untersuchten Interaktionen: Die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui2 ist nicht beeinträchtigt, die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui3 und Cdc123 könnte dagegen leicht reduziert zu sein. Da der Nachweis von Sui3 und Cdc123 auf dem gleichen Western Blot erfolgte, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein Beladungsfehler vorlag.

Insgesamt wird die Interpretation der Ergebnisse allerdings durch die Unterschiede hinsichtlich der Gcd11-myc-Degradation erschwert. Da die Präzipitation und die Detektion von Gcd11-myc über das C-terminale myc-Epitop erfolgten, handelt es sich bei den nachgewiesenen Degradationsformen wahrscheinlich um N-terminal verkürzte Proteine. Die N-terminale G-Domäne von Gcd11 ist jedoch wichtig für die Interaktion mit Sui3 (Yatime et al., 2007), während Sui2 an Domäne II bindet (Yatime et al., 2006) und Cdc123 an Domäne III (vgl. 4.5). Demnach könnte die N-terminal verkürzte Form von Gcd11-myc mit Sui2 und Cdc123 interagieren, aber hinsichtlich der Interaktion mit Sui3 beeinträchtigt sein, was zu einer verringerten Co-Präzipitation von Sui3 führen würde. Die verringerte Co-Präzipitation von Sui3 bei Depletion von Sui2, Cdc123 oder ha-Gcd11 im Vergleich zur Depletion von Cdc33 lässt sich jedoch nicht auf die verstärkte Degradation von Gcd11-myc zurückführen, da die präzipitierte Menge an vollständigem Gcd11-myc in allen Stämmen ähnlich ist. Auch bei weiteren Versuchen zur Immunpräzipitation von Sui2-myc oder flag-Sui3 aus Depletionsstämmen traten Unterschiede hinsichtlich der Proteinstabilität und der Entstehung von Degradationsformen auf und erschwerten eine eindeutige Aussage (Daten nicht gezeigt). Trotzdem lässt sich folgern, dass die bei der Depletion von Cdc123 beobachtete Abnahme der Interaktion aller drei eIF2-Untereinheiten keine generelle Konsequenz einer beeinträchtigten Translationsinitiation ist, sondern die spezifische Folge fehlender Cdc123-Funktion.

### 4.3.3 Die Interaktion von eIF2 mit eIF2B ist bei *cdc123Δ327* reduziert

Bei der Depletion von Cdc123 verringerte sich neben der Interaktion der eIF2-Untereinheiten auch die Interaktion von eIF2 mit eIF2B (vgl. 4.3.1). Auf Grund der erwähnten technischen Schwierigkeiten bei Depletionsexperimenten wurde die Auswirkung der verminderten Cdc123-Funktion auf die Interaktion von eIF2 mit eIF2B unter Verwendung des Allels *cdc123Δ327* überprüft. Dazu wurde die  $\gamma$ -Untereinheit von eIF2B (Gcd1) mit einem myc13-Epitop markiert und die Assoziation von eIF2B mit eIF2 durch Immunpräzipitation analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Interaktion von eIF2B mit allen drei eIF2-Untereinheiten (Sui2, Sui3, Gcd11) in einem Stamm mit dem hypomorphen *cdc123Δ327-ha3*-Allel im Vergleich zu einem *CDC123*-Wildtyp um knapp die Hälfte verringert war (Abb. 4.8). Auch die C-terminale Epitopmarkierung von Cdc123 (*CDC123-ha3*) führte zu einer reduzierten Wechselwirkung von eIF2 und eIF2B, allerdings weniger ausgeprägt als *cdc123Δ327-ha3*.



**Abbildung 4.8: *cdc123Δ327* beeinträchtigt die Interaktion von eIF2 mit eIF2B.**

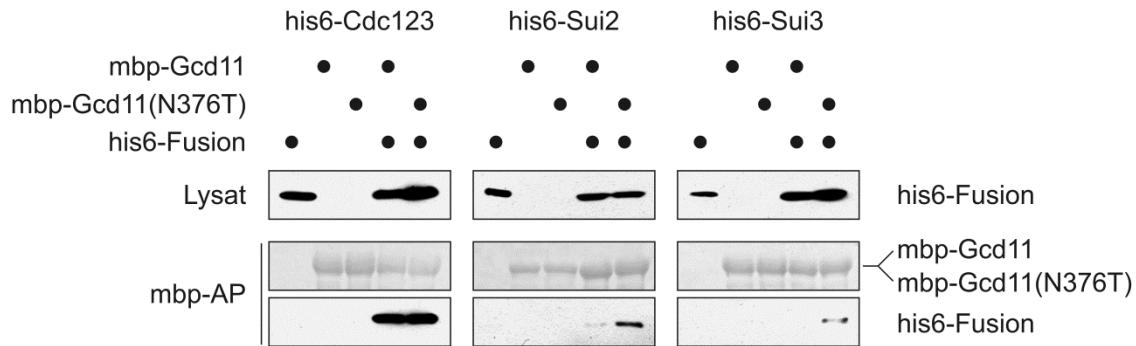
Die Stämme BY4741 (WT), W4887 (*GCD1-myc13-HIS3MX6*), W9722 (*GCD1-myc13-HIS3MX6 CDC123-ha3-URA3*) und W9725 (*GCD1-myc13-HIS3MX6 cdc123Δ327-ha3-natMX4*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde Gcd1-myc mittels 9E10-Antikörper präzipitiert. Die Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP) wurden mittels Western Blot analysiert, wobei Gcd1-myc mit 9E10-Antikörper, ha-markierte Cdc123-Varianten mit 12CA5-Antikörper und eIF2-Untereinheiten mit spezifischen Antiseren nachgewiesen wurden. Die Signale von Gcd1-myc und den drei eIF2-Untereinheiten in den Präzipitaten wurden mit Hilfe der Odyssey-Software quantifiziert und unterhalb der Banden in % des Signals bei W4887 angegeben.

Die Beeinträchtigung von Cdc123 hat also in der Tat eine verringerte Interaktion von eIF2 und eIF2B zur Folge, vermutlich weil die Assoziation der eIF2-Untereinheiten und somit die Menge des heterotrimeren eIF2-Komplexes reduziert ist (Richter, 2006).

#### 4.3.4 Eine gesteigerte Sui2-Gcd11-Interaktion supprimiert die Deletion von *CDC123*

Da die Assoziation der eIF2-Untereinheiten in *cdc123*-Mutanten verringert ist, wurde untersucht, ob die Überexpression von *SUI2*, *SUI3* und *GCD11* – einzeln oder in Kombination – Cdc123-Defekte kompensieren kann (Richter, 2006). In der Tat konnten *cdc123Δ*-Stämme durch erhöhte Mengen an Sui2 oder Gcd11 gerettet werden, sie wuchsen jedoch langsam (*GCD11*-Überexpression) bzw. sehr langsam (*SUI2*-Überexpression). Die Kombination von *GCD11*- und *SUI2*-Überexpression erlaubte es *cdc123Δ*-Stämmen, annähernd so schnell zu wachsen wie Wildtypstämme. Die Überexpression von *SUI3* hingegen hatte keinen Einfluss (vgl. auch Anhang 9.2.2). Dies deutet darauf hin, dass die verbesserte Interaktion von Sui2 und Gcd11 entscheidend für die Suppression von Cdc123-Defekten ist.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden anschließend *gcd11*-Allele isoliert, deren Überexpression zu einem besseren Wachstum von *cdc123Δ*-Stämmen führt als die Überexpression von wt-*GCD11*. Die Sequenzierung der Allele wies Punktmutationen nach, die zum Austausch einzelner Aminosäuren in Domäne II von Gcd11 führen (Meitinger, 2007). Da Sui2 an diese Gcd11-Domäne bindet, könnten die Aminosäuresubstitutionen die Sui2-Gcd11-Interaktion beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurde die Interaktion von Gcd11 und Sui2 durch Co-Expression in *E. coli* und Affinitätspräzipitation untersucht (vgl. 4.2.2). Aus den isolierten *gcd11*-Allelen wurde *gcd11-03* ausgewählt, welches zum Austausch N376T führt: Zum einen wurden im ursprünglichen Screen drei unabhängige Substitutionen von N376 (T, I, S) isoliert, was die Bedeutung dieser Aminosäure unterstreicht, zum anderen erlaubte *gcd11-03* von allen isolierten Allelen das beste Wachstum von *cdc123Δ*-Stämmen. Deshalb wurden mbp-Fusionen von wt-Gcd11 und Gcd11(N376T) zusammen mit his6-Sui2 in *E. coli* exprimiert und die Interaktion beider Gcd11-Varianten mit Sui2 durch Affinitätsreinigung der mbp-Fusionen und anschließenden Western Blot analysiert (Abb. 4.9). Tatsächlich band Sui2 besser an Gcd11(N376T) als an wt-Gcd11. Ein analoges Experiment mit his6-Cdc123 zeigte, dass die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 durch den N376T-Austausch nicht beeinflusst ist. Unerwarteterweise war bei his6-Sui3 eine bessere Interaktion mit Gcd11(N376T) erkennbar (wenn auch die Interaktion insgesamt sehr schwach war). Da Sui3 nicht an Domäne II, sondern an die G-Domäne (Domäne I) von Gcd11 bindet (Yatime et al., 2007), könnte dies darauf hinweisen, dass der Austausch N376T auch die Interaktion der Gcd11-Domänen I und II miteinander und somit die Interaktion von Sui3 mit Domäne I beeinflusst.



**Abbildung 4.9: Gcd11(N376T) zeigt eine verbesserte Interaktion mit Sui2.**

*E. coli* BL21C+ wurde mit den Plasmiden pWS1389, pWS1483, pWS1898, pWS1899, pWS1957, pWS2157, pWS2158, pWS2229, pWS2237, pWS2249 und pWS2250 transformiert, in LB<sub>amp,chi</sub> bei 20°C kultiviert und der Promotor *prha* durch Zugabe von 0,2% Rhamnose für ca. 20 h induziert. Nach Aufschluss der Zellen in der French Press wurde mbp-Gcd11 bzw. mbp-Gcd11(N376T) mit Hilfe von Amylose-Matrix präzipitiert. Lysate und Präzipitate (mbp-AP) wurden im Western Blot mittels  $\alpha$ -his-Antikörper auf das Vorhandensein von his6-Cdc123, his6-Sui2 bzw. his6-Sui3 getestet. Die Präzipitation der mbp-Gcd11-Varianten war in der Ponceau-Färbung der Western-Blot-Membran sichtbar.

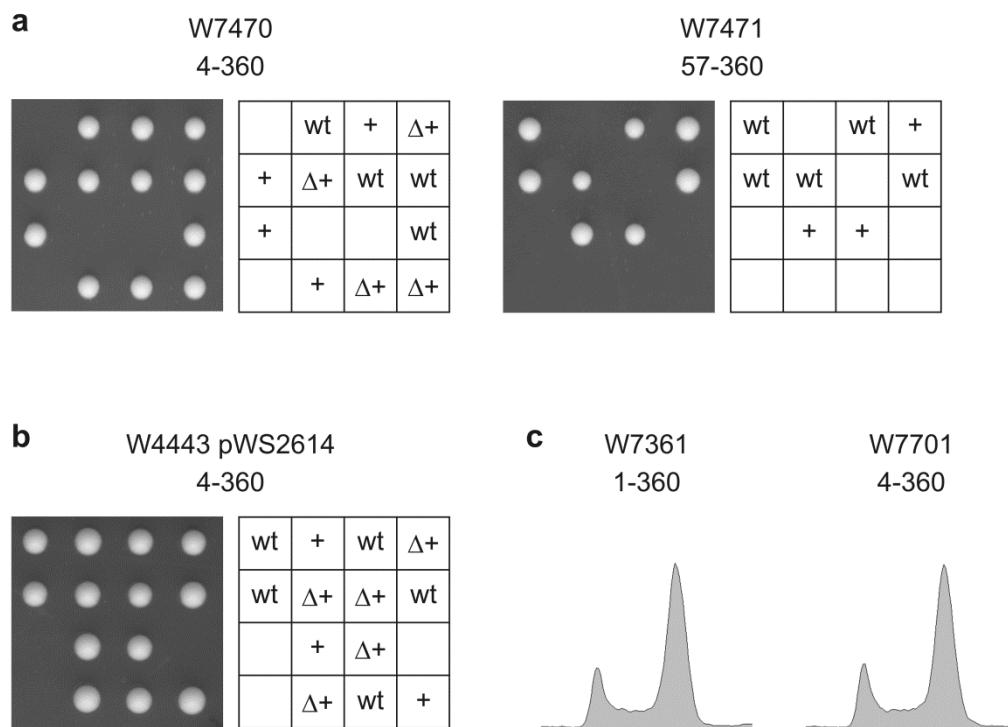
Die Ergebnisse unterstreichen also, dass eine verbesserte Interaktion der eIF2-Untereinheiten – vor allem von Gcd11 mit Sui2, möglicherweise auch mit Sui3 – die Grundlage dafür ist, dass Stämme mit dem *gcd11-03*-Allel das Fehlen von Cdc123 besser kompensieren können.

#### 4.4 Analyse der funktionellen Bedeutung von Regionen und einzelnen Aminosäuren von Cdc123

Da die Aminosäuresequenz von Cdc123 keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteindomänen aufweist, lassen sich keine Rückschlüsse auf die Funktion verschiedener Bereiche oder gar einzelner Aminosäuren ziehen. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die C-terminale Verkürzung von Cdc123 auf 291 bzw. 318 Aminosäuren letal ist, während Stämme mit Verkürzungen auf 327 bzw. 340 Aminosäuren lebensfähig sind, aber langsamer wachsen als Wildtypstämme (Nachtsheim, 2002). Die Substitution von konservierten Cysteinresten durch Serin (Heigl, 2007) und konservierten Serinresten durch Alanin (Morgenthaler, 2009) ergab, dass keine der untersuchten Aminosäuren (C22, S128, C144, S157, C171, S280) essentiell für die Funktion von Cdc123 ist. Um die Rolle von Bereichen und einzelnen Aminosäuren von Cdc123 für dessen Funktion weiter zu analysieren, wurden N-terminale Verkürzungen hergestellt und verschiedene Verkürzungen und Substitutionen kombiniert. Die Cdc123-Varianten wurden in Komplementationstests und Wachstumstests auf ihre Funktionalität (4.4.1-3) und im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf ihre Interaktion mit Gcd11 (4.4.4) getestet.

#### 4.4.1 Die N-terminale Verkürzung von Cdc123 um 56 Aminosäuren ist letal

Um die Bedeutung der N-terminalen Region von Cdc123 zu untersuchen, wurden zwei N-terminale Verkürzungen von Cdc123 hergestellt und daraufhin analysiert, ob sie die Deletion von *CDC123* komplementieren können: Zum einen wurden die ersten drei Aminosäuren entfernt, weil die Serine 2 und 3 als potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden (vgl. 4.7.1). Zum anderen wurden die ersten 56 Aminosäuren entfernt, um die Bedeutung des konservierten Bereichs von Position 18-56 zu analysieren. In beiden Fällen wurde am 5'Ende der *CDC123*-Verkürzung ein ATG angefügt, um Expressionskonstrukte ohne N-terminales Epitop herstellen zu können. Zunächst wurden jedoch Konstrukte mit N-terminalem ha3-Epitop untersucht, damit ein Vergleich der Proteinmengen möglich war.



**Abbildung 4.10: Die N-terminale Verkürzung von Cdc123 um 56 Aminosäuren ist letal, die Verkürzung um drei Aminosäuren nicht.**

**a**, Die Stämme W7470 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*) und W7471 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pCDC123-ha3-CDC123(57-360)-tCYC1-LEU2*) wurden sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen (Abkürzungen: wt = Wildtyp, + = *CDC123*-Verkürzung im *leu2*-Marker integriert, Δ = *cdc123Δ*).

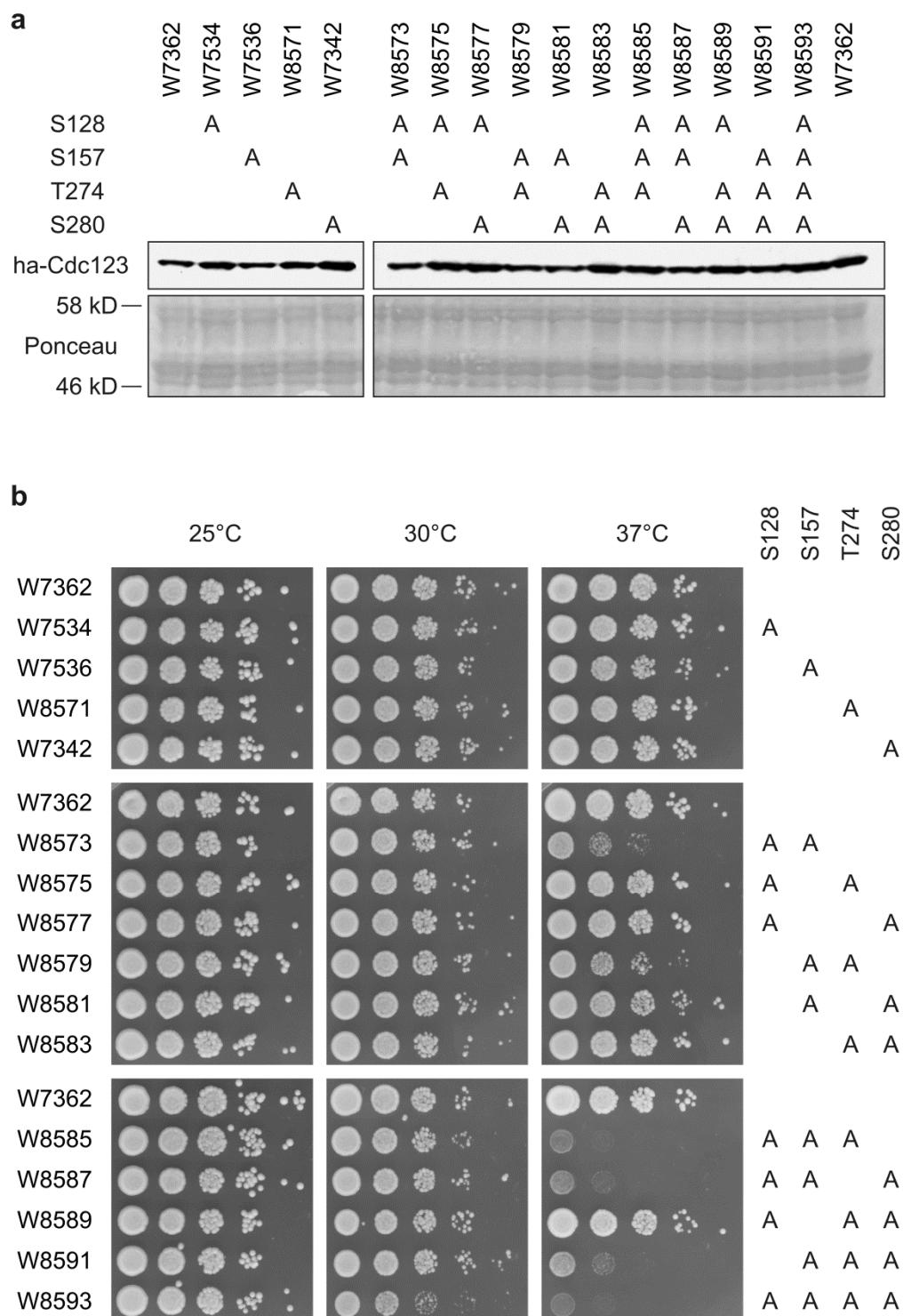
**b**, W4443 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4*) wurde mit dem ARS/CEN-Plasmid pWS2614 (pRS316-*pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1*) transformiert, sporuliert und eine Tetradenanalyse durchgeführt (Abkürzungen: wt = Wildtyp, + = pWS2614, Δ = *cdc123Δ*).

**c**, Die Stämme W7361 (*cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1*) und W7701 (*cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1*) wurden bei 30°C in XYD kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Proben wurden mit Sytox Green gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Plasmide mit den *ha3-CDC123*-Verkürzungen unter Kontrolle des *CDC123*-Promotors wurden in den *leu2*-Marker integriert. Obwohl bei beiden Verkürzungen gleiche Proteinmengen nachweisbar waren (Anhang 9.2.3), konnte bei der Tetradenanalyse nur die Verkürzung Cdc123(4-360) die Deletion von *CDC123* komplementieren (Abb. 4.10a). Der konservierte Bereich Aminosäure 18-56 ist also essentiell für die Funktionalität von Cdc123. Die Entfernung der potentiellen Phosphorylierungsstellen Serin 2 und 3 scheint Cdc123 dagegen nicht zu beeinträchtigen. Allerdings war nicht auszuschließen, dass bei den untersuchten Stämmen eine mehrfache Integration des Plasmides und damit eine erhöhte Expression der *CDC123*-Verkürzungen vorlag. Deshalb wurde der Versuch für die Verkürzung Cdc123(4-360) mit einem centromeren Plasmid wiederholt. Auch in diesem Fall konnte die Verkürzung die Deletion von *CDC123* komplementieren und die resultierenden Stämme unterschieden sich hinsichtlich ihres Wachstums in der Tetradenanalyse nicht von Wildtypstämmen (Abb. 4.10b). Außerdem wurde der Zellzyklus eines Stamms mit der Cdc123(4-360)-Verkürzung durch FACS-Analyse des DNA-Profiles untersucht. Als Kontrolle diente ein Stamm, der Wildtyp-*CDC123* von einem centromeren Plasmid exprimiert. Die beiden Stämme zeigten keine Unterschiede in ihrem DNA-Profil (Abb. 4.10c), was ebenfalls dafür spricht, dass die Entfernung der Serine 2 und 3 nicht zu einer Beeinträchtigung von Cdc123 führt.

#### **4.4.2 Die Kombination von S157A mit weiteren S/T-Austauschen führt zu temperatursensitivem Wachstum**

Eine Phosphorylierung von Cdc123 an Threonin 274 soll wichtig für die Interaktion zwischen Cdc123 mit der FHA-Domäne von Chf1 und Chf2 und damit für die Cdc123-Funktion sein (Bieganowski et al., 2004). Allerdings führte der Austausch von Threonin 274 zu Alanin (T274A) nicht zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der Zellen (M. Schwab, unpublizierte Ergebnisse, vgl. auch Abb. 4.11b), was gegen eine essentielle Rolle von (Phospho-)T274 für die Cdc123-Funktion spricht. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden weitere konservierte Serin/Threonin-Reste gegen Alanin ausgetauscht (Morgenthaler, 2009), doch auch die Serine 128, 157 und 280 waren nicht essentiell. Deshalb wurden nun alle Kombinationen der vier Substitutionen S128A, S157A, T274A und S280A hergestellt und auf Funktionalität getestet. Alle Cdc123-Varianten konnten die Deletion von *CDC123* komplementieren (Daten nicht gezeigt) und zeigten bei 25°C keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich Wachstum und Proteinmenge im Vergleich zu Wildtyp-Cdc123 (Abb. 4.11a). Einige Stämme waren jedoch temperatursensitiv (Abb. 4.11b), wobei dem Austausch S157A eine entscheidende Rolle zukommt.



**Abbildung 4.11: Die Kombination von S157A mit S128A, T274A und S280A führt zu Temperatursensitivität.**

Die untersuchten Stämme tragen eine *CDC123*-Deletion im Genom und ein ARS/CEN-Plasmid, von welchem Cdc123 mit den angegebenen Aminosäuresubstitutionen exprimiert wird (allgemeiner Genotyp *cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1*).

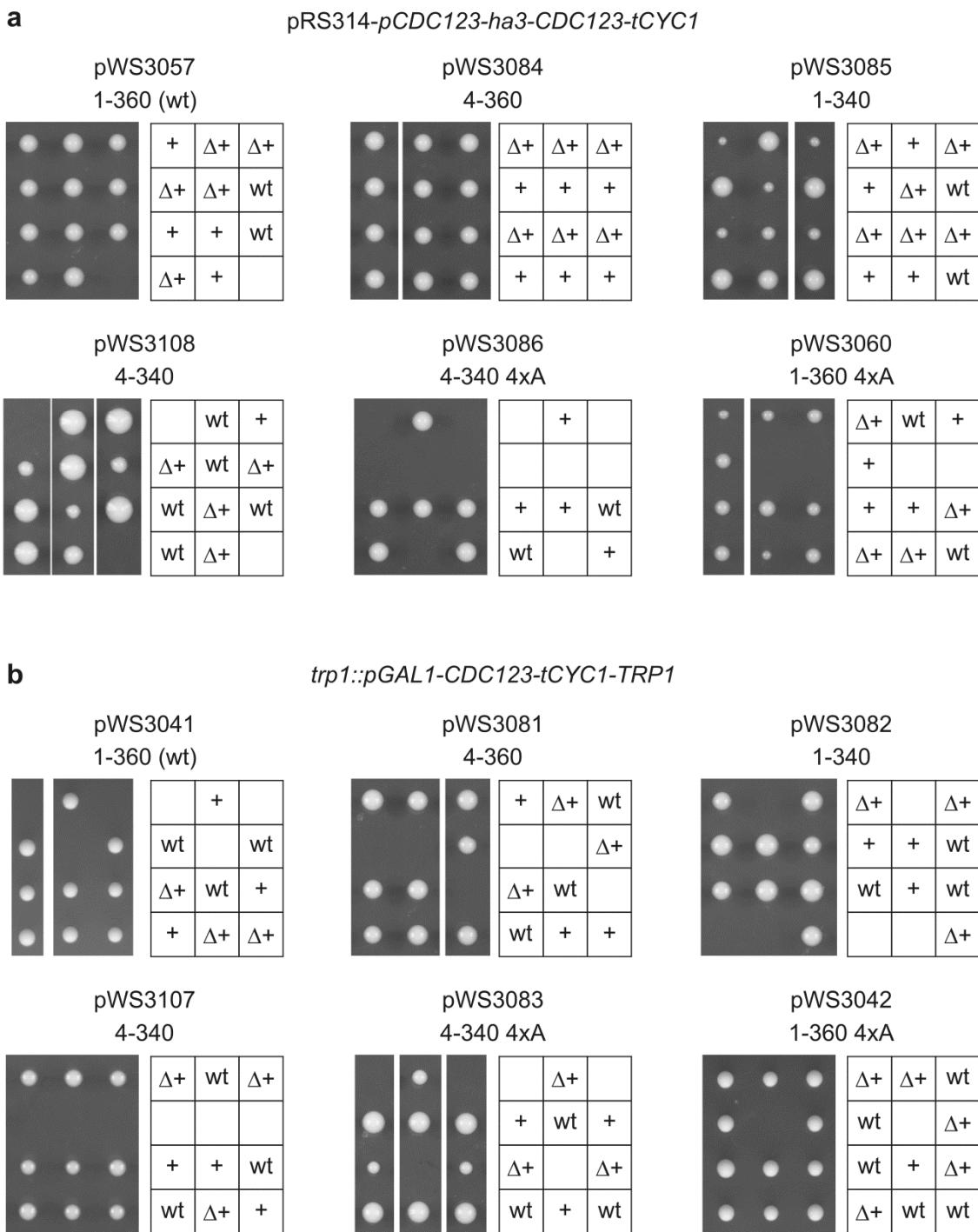
**a**, Die Stämme wurden in XYD bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In den Proteinlysaten wurden die ha-Cdc123-Varianten mit einem Cdc123-spezifischen Antiserum im Western Blot nachgewiesen. Bei der Ponceau-Färbung der Membran ist links die Lage der Standardbanden angegeben.

**b**, Die Stämme wurden in XYD bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und in Verdünnungsreihen auf je drei XYD-Platten gestempelt, welche für 2-3 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert wurden.

Bereits S157A alleine führt zu einer geringfügigen Beeinträchtigung des Wachstums bei 37°C. Die Kombination von S157A mit S128A oder T274A führt zu deutlich verringertem Wachstum bei 37°C und die Kombination von S157A mit zwei weiteren Substitutionen führt zu starken Wachstumsdefekten bei 37°C, wobei Cdc123(S128A, S157A, T274A) bereits bei 30°C leichte Wachstumsprobleme zeigt. Die Kombination (S128A, T274A, S280A) wächst hingegen bei allen Temperaturen ähnlich wie Wildtyp, was die Bedeutung des S157A-Austausches für Temperatur-Sensitivität unterstreicht. Die Kombination aller Substitutionen (S128A, S157A, T274A, S280A), welche in folgenden Kapiteln als 4xA bezeichnet wird, führt bereits bei 30°C zu deutlichen Wachstumsproblemen und sehr starken Problemen bei 37°C. Diese Analysen zeigen, dass alle vier konservierten Serin/Threonin-Reste zu Alanin ausgetauscht werden können, ohne dass die Funktionalität von Cdc123 bei 25°C beeinträchtigt wird. Allerdings führt die Kombination von Substitutionen in einigen Fällen zu Temperatur-Sensitivität, wobei dem Austausch S157A eine besondere Bedeutung zukommt. Möglicherweise wirken die S/T-A-Substitutionen also destabilisierend auf Cdc123.

#### **4.4.3 Die Kombination von N- und C-terminalen Verkürzungen und S/T-A-Austauschen führt zu dosisabhängigen Wachstumsproblemen**

Als nächster Schritt wurden die 4xA-Substitution (S128A, S157A, T274A, S280A, vgl. 4.4.2), die N-terminale Verkürzung um 3 Aminosäuren (vgl. 4.4.1) und die C-terminale Verkürzung um 20 Aminosäuren (Nachtsheim, 2002) kombiniert. Die Funktionalität der neuen Cdc123-Varianten wurde zunächst bei Expression auf endogenem Niveau (d.h. durch den *CDC123*-Promotor von einem centromeren Plasmid) mit N-terminalem ha3-Epitop untersucht (Abb. 4.12a). Wie erwartet wuchs die N-terminale Verkürzung (4-360) wie der Wildtyp, während die C-terminale Verkürzung (1-340) bei der Tetradenanalyse zu kleineren Kolonien führte. Eine Kombination von N- und C-terminaler Verkürzung (4-340) verhielt sich wie die C-terminale Verkürzung (1-340), d.h. die zusätzliche Verkürzung des N-Terminus hatte keinen Effekt. Die 4xA-Variante (1-360, 4xA) zeigte in der Tetradenanalyse eine leicht heterogene Koloniegröße, aber keinen deutlichen Wachstumsdefekt. Die Kombination von 4xA mit N- und C-terminaler Verkürzung (4-340, 4xA) war hingegen letal.



**Abbildung 4.12: Die Kombination von N- und C-terminalen Verkürzungen mit Aminosäuresubstitutionen beeinträchtigt das Wachstum.**

**a,** Der Stamm W4443 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4*) wurde mit den ARS/CEN-Plasmiden *pWS3057*, *pWS3060*, *pWS3084*-*pWS3086* und *pWS3108* transformiert, welche ein *pCDC123-ha3-CDC123*-Konstrukt zur Expression der angegebenen Cdc123-Varianten enthalten. Nach der Tetradenanalyse wurden die XYD-Platten bei 25°C inkubiert (Abkürzungen: wt = Wildtyp, + = ARS/CEN-Plasmid, Δ = *cdc123Δ*).

**b,** Der Stamm W4443 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4*) wurde mit den integrativen Plasmiden *pWS3041*, *pWS3042*, *pWS3081*-*pWS3083* und *pWS3107* transformiert, welche ein *pGAL1-CDC123*-Konstrukt zur Expression der angegebenen Cdc123-Varianten enthalten. Nach der Tetradenanalyse wurden die XYG-Platten bei 25°C inkubiert (Abkürzungen: wt = Wildtyp, + = *pGAL1-CDC123*-Konstrukt, Δ = *cdc123Δ*).

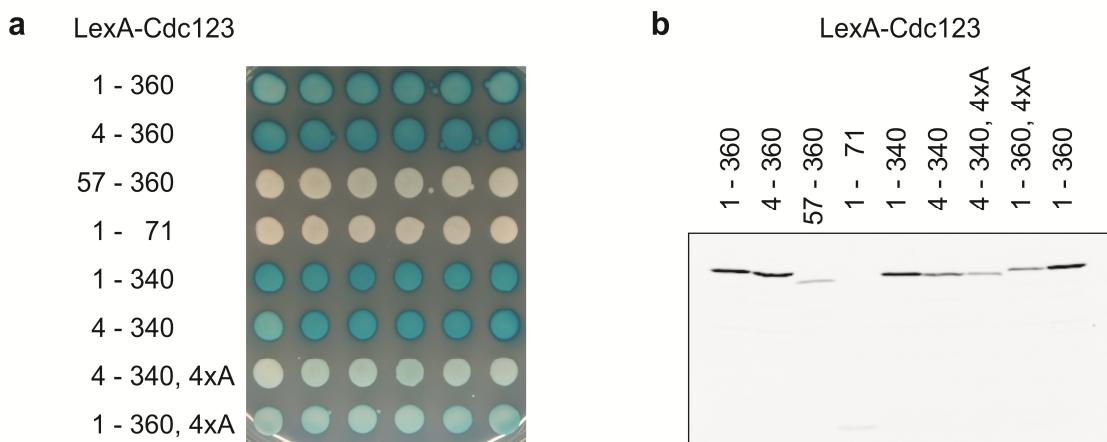
Zusätzlich wurden die Cdc123-Varianten bei Überexpression vom *GAL1*-Promotor untersucht. Diese Expressionskonstrukte wurden in den *trp1*-Marker integriert und enthielten kein *ha*-Epitop. Unter diesen Bedingungen konnten alle Varianten die Deletion von *CDC123* komplementieren (Abb. 4.12b). Die C-terminalen Verkürzungen (1-340) und (4-340) zeigten bei Überexpression – im Gegensatz zur Expression auf endogenem Niveau – kein verlangsamtes Wachstum. Dagegen erlaubte die Kombination (4-340, 4xA) auch bei Überexpression nur ein langsames Wachstum. Die Kombination von N- und C-terminalen Verkürzungen mit der 4xA-Substitution beeinträchtigt Cdc123 demnach sehr stark, so dass eine Expression vom endogenen Promotor nicht ausreicht für das Überleben der Zellen und selbst die Überexpression vom *GAL1*-Promotor kein Wachstum mit Wildtyprate ermöglicht.

#### 4.4.4 Der N-Terminus von Cdc123 ist wichtig für die Interaktion mit Gcd11

Um die hergestellten Cdc123-Varianten (vgl. 4.4.1-3) auf ihre Interaktion mit Gcd11 zu testen, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-two-hybrid, Y2H) verwendet (vgl. 7.6). Dazu wurden Cdc123-Varianten mit dem DNA-Bindeprotein LexA und Gcd11 mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Wenn Cdc123 mit Gcd11 interagiert, bilden die beiden Fusionsproteine einen aktiven Transkriptionsfaktor. Da der Stamm W276 ein *lacZ*-Reportergen unter Kontrolle des *lexA*-Operators enthält, lässt sich die Interaktion von Cdc123 und Gcd11 über die Aktivierung der *lacZ*-Expression nachweisen. Dafür wurde die β-Galaktosidase-Aktivität mit X-Gal als Substrat bestimmt (Abb. 4.13a). Neben Wildtyp-Cdc123 (entspricht Aminosäure 1-360) wurden die N-terminalen Verkürzungen 4-360 und 57-360 (vgl. 4.4.1), ein N-terminales Fragment (1-71), eine Cdc123-Variante mit Substitution von vier konservierten S/T-Resten zu Alanin (1-360, 4xA) (vgl. 4.4.2), eine C-terminale Verkürzung (1-340) sowie die Kombinationen 4-340 und 4-340, 4xA (vgl. 4.4.3) untersucht. Die N-terminale Verkürzung 4-360 interagiert mit Gcd11 genauso gut wie wt-Cdc123, die Verkürzung 57-360 zeigt jedoch kaum noch Interaktion. Der N-Terminus von Cdc123 scheint also notwendig für die Interaktion mit Gcd11 zu sein. Er ist jedoch nicht hinreichend, da das N-terminale Fragment 1-71 nicht mit Gcd11 interagiert. Die C-terminale Verkürzung 1-340 interagiert ähnlich gut wie Wildtyp-Cdc123, ebenso 4-340. Die 4xA-Substitution zeigt eine deutlich schwächere Interaktion mit Gcd11, sowohl bei voller Länge (1-360, 4xA) als auch in Kombination mit Verkürzungen (4-340, 4xA). In früheren Untersuchungen zeigten die Einzelsubstitutionen S128A und S157A eine leicht reduzierte Interaktion mit Gcd11 (Morgenthaler, 2009). Die Kombination verstärkt diesen Effekt vermutlich.

Bei der Interpretation der Daten sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Proteinmengen der LexA-Cdc123-Varianten unterschiedlich waren (Abb. 4.13b): Alle Varianten, die eine schlechtere Interaktion zeigten, waren auch in geringerer Menge vorhanden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verringerte Interaktion mit Gcd11 nicht auf das Fehlen von Interaktionsmotiven,

sondern auf die reduzierte Proteinmenge zurückzuführen ist. Allerdings stimmt die Beobachtung, dass sowohl die N-terminale Region als auch andere Bereiche von Cdc123 wichtig für die Interaktion mit Gcd11 sind, mit Ergebnissen einer Zufallsmutagenese von *CDC123* überein: Dabei wurden Mutanten isoliert, die zu einer Verringerung der Cdc123-Gcd11-Interaktion führten, ohne die Cdc123-Menge zu reduzieren. Eine Sequenzanalyse ergab, dass sowohl Aminosäuresubstitutionen im N-Terminus als auch in anderen Bereichen die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 beeinträchtigen können (Morgenthaler, 2009). Anscheinend hat Cdc123 nicht eine unabhängige Domäne, welche mit Gcd11 interagiert, vielmehr tragen mehrere Bereiche des Proteins zur Wechselwirkung bei.



**Abbildung 4.13: Der N-Terminus von Cdc123 ist wichtig für die Interaktion mit Gcd11.**

Der Y2H-Reporter-Stamm W276 wurde mit pWS1513 (*pGAL-AD-GCD11*) und den Plasmiden pWS1463, pWS2712, pWS2713, pWS3087-pWS3090 und pWS3109 transformiert, welche für LexA-Fusionen der angegebenen Cdc123-Varianten codieren.

**a,** Jeweils 6 Transformanden wurden in H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf eine SRG-HT-Platte gestempelt. Nach 3 Tagen bei 25°C wurden die Zellen mit X-Gal-Agar überschichtet und bei 30°C inkubiert, bis die Blaufärbung deutlich sichtbar war.

**b,** Jeweils ein Transformand wurde in XYRG bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Western-Blot-Analyse der Proteinlysate wurde mit α-LexA-Antikörper durchgeführt.

## 4.5 Cdc123 interagiert mit der C-terminalen Domäne von Gcd11

Durch Strukturuntersuchungen des zu eIF2 homologen Faktors aus Archäen ist bekannt, dass Gcd11 aus drei Domänen besteht und dass die N-terminale G-Domäne mit Sui3 interagiert und Domäne II mit Sui2 (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007). Folglich war es von Interesse zu klären, mit welcher Gcd11-Domäne Cdc123 interagiert.

#### 4.5.1 Die C-terminale Region von Gcd11 ist hinreichend und notwendig für die Bindung an Cdc123

Einen wichtigen Hinweis auf die Bindungsstelle von Cdc123 lieferte ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen für Cdc123-Interaktionspartner (vgl. Anhang 9.2.4): Dabei wurde ein Fragment von Gcd11 identifiziert, welches die C-terminalen Aminosäuren 410-527 enthält und sehr stark mit Cdc123 interagiert. In der Folge wurden weitere Gcd11-Fragmente kloniert und im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion mit Cdc123, Sui2 und Sui3 getestet (Abb. 4.14a).

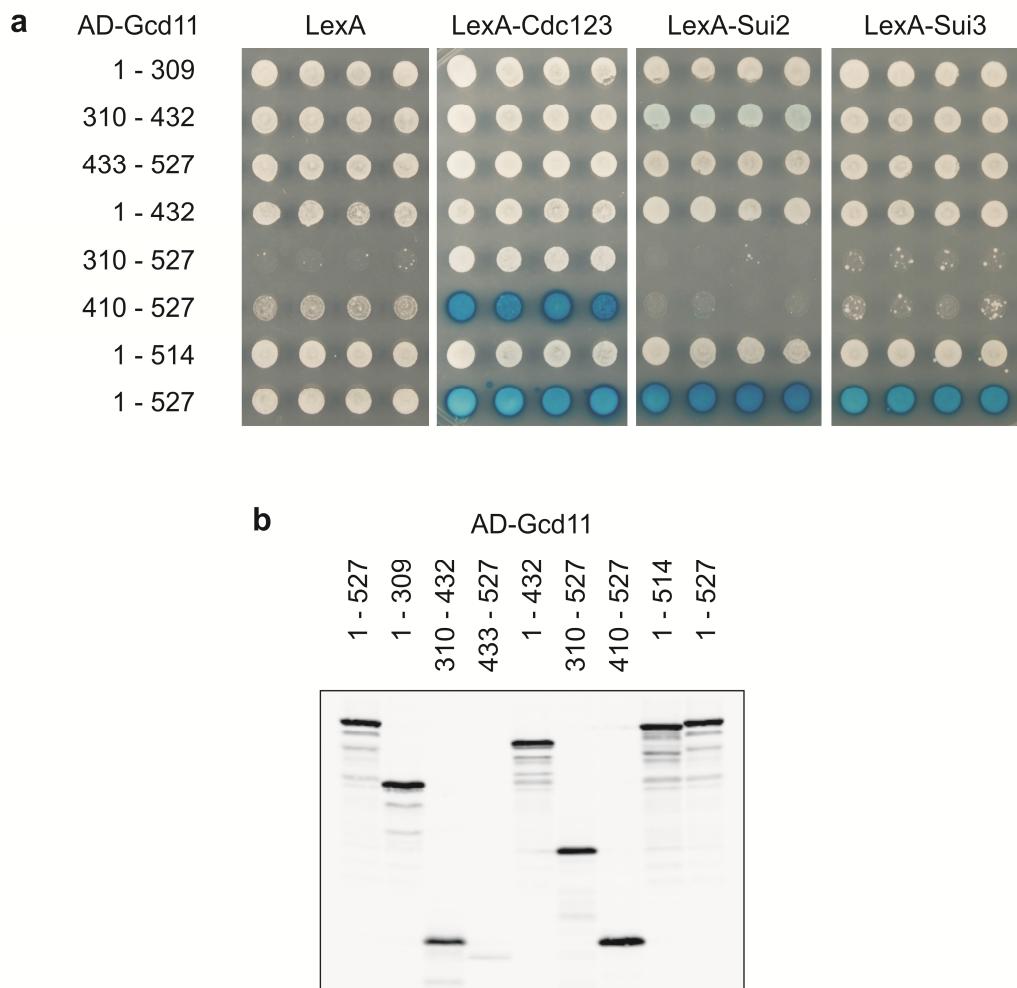
Das im Screen isolierte C-terminale Fragment 410-527 interagierte mit Cdc123 genauso gut wie wt-Gcd11 (1-527); der C-Terminus von Gcd11 ist also hinreichend für die Interaktion mit Cdc123. Ohne gleichzeitige Expression von LexA-Cdc123 war die Überexpression von AD-Gcd11(410-527) leicht toxisch und bei Co-Expression von LexA-Sui2 oder -Sui3 sogar letal. Ein noch kürzeres C-terminales Fragment (433-527) zeigte keine Interaktion mit Cdc123 (oder Sui2 und Sui3), dies könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass die Menge dieses Proteins stark reduziert war (Abb. 4.14b). Ein längeres Fragment, welches die Domänen II und III enthält (310-527), zeigte zwar keine Interaktion mit Cdc123, allerdings war die Überexpression dieses Gcd11-Fragments letal und die Zellen konnten durch die Expression von LexA-Cdc123 (nicht aber von LexA-Sui2 oder -Sui3) gerettet werden. Die Toxizität der Gcd11-Fragmente 310-527 und 410-527 lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sie cytoplasmatisches Cdc123 binden und dadurch dessen Funktion behindern. Die Expression von LexA-Cdc123 rettet die Zellen, weil nun mehr Cdc123 zur Verfügung steht. Warum nur das Fragment 410-527 im Reporterassay eine Interaktion mit LexA-Cdc123 zeigt, das längere Fragment 310-527 jedoch nicht, lässt sich nicht eindeutig klären. Es ist denkbar, dass die Gcd11-Domäne II, welche im Protein 310-527 enthalten ist, durch Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen (z.B. Sui2) den Kernimport behindert.

Die Bedeutung des C-Terminus von Gcd11 für die Interaktion mit Cdc123 wurde auch durch die C-terminale Verkürzung von Gcd11 unterstrichen: Selbst eine Verkürzung um nur 13 Aminosäuren (1-514) führt zu einem Verlust der Interaktion mit Cdc123. Außerdem verhindert diese Verkürzung auch die Interaktion mit Sui2 und Sui3. Dies war unerwartet, da Sui3 an die G-Domäne und Sui2 an die Domäne II bindet (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007), weshalb die Verkürzung 1-514 im folgenden Abschnitt (4.5.2) näher untersucht wurde.

Die anderen untersuchten Verkürzungen (1-309, 310-432 und 1-432) zeigten keine Interaktion mit Cdc123 oder Sui3. Nur 310-432 interagierte sehr schwach mit Sui2, was die Bedeutung von Gcd11-Domäne II für diese Interaktion bestätigt.

Die C-terminale Region von Gcd11 ist also notwendig und hinreichend für die Interaktion mit Cdc123. In Kombination mit Sui2 und Sui3 zeigte nur Wildtyp-Gcd11, aber keine der Verkürzungen eine starke Interaktion. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in Präzipitationsstudien mit GST-Gcd11 beobachtet

(Alone und Dever, 2006). Eine mögliche Erklärung ist, dass für eine effiziente Bindung von Sui2 und Sui3 zuvor die Interaktion von Gcd11 mit Cdc123 notwendig ist, weshalb C-terminale Verkürzungen, die nicht mit Cdc123 interagieren, auch keine (oder nur sehr schwache) Interaktion mit Sui2 und Sui3 zeigen können.



**Abbildung 4.14: Der C-Terminus von Gcd11 ist wichtig für die Interaktion mit Cdc123.**

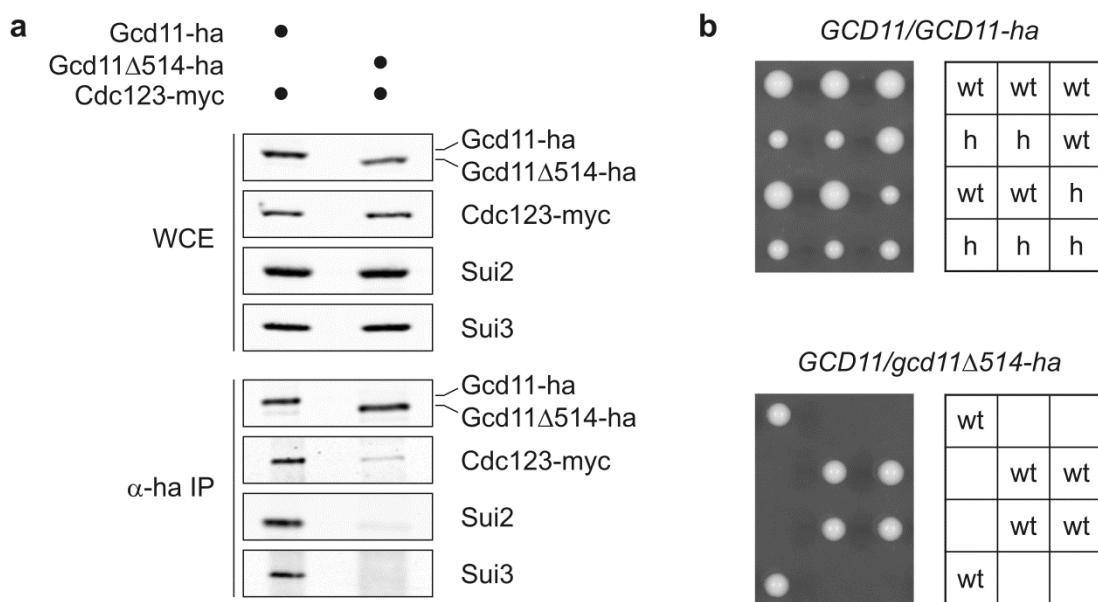
Der Y2H-Reporter-Stamm W276 wurde mit pJG4-5-Derivaten und den Plasmiden pEG202 (LexA), pWS1463 (LexA-Cdc123), pWS1537 (LexA-Sui2) und pWS1535 (LexA-Sui3) cotransformiert. Bei den pJG4-5-Derivaten handelte es sich um pWS1513, pWS2031, pWS2047, pWS2877, pWS2878, pWS3413, pWS3472 und pWS3473, welche für AD-Fusionen der angegebenen Gcd11-Varianten codieren.

**a**, Jeweils 4 Transformanden wurden in H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf eine SRG-HT-Platte gestempelt. Nach 3 Tagen bei 25°C wurden die Zellen mit X-Gal-Agar überschichtet und bei 30°C inkubiert, bis die Blaufärbung deutlich sichtbar war.

**b**, Je ein Transformand mit pWS1463 und den verschiedenen pJG4-5-Derivaten wurde in XYR bei 25°C kultiviert und der GAL-Promotor für 3 h durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Die AD-Gcd11-Fusionen wurden in den Proteinlysaten mittels Western-Blot-Analyse mit 12CA5-Antikörper nachgewiesen.

#### 4.5.2 Eine C-terminale Verkürzung von Gcd11 führt zu verringrigerter Interaktion mit Cdc123, reduzierter eIF2-Komplexbildung und Letalität

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System bewirkte eine C-terminale Gcd11-Verkürzung um nur 13 Aminosäuren (1-514) den vollständigen Verlust der Interaktion mit Cdc123, Sui2 und Sui3. Die Auswirkung auf die Interaktion mit Cdc123 lässt sich dadurch erklären, dass Cdc123 an die C-terminale Domäne von Gcd11 bindet. Die Reduktion der Interaktion mit Sui2 und Sui3 ist möglicherweise eine Folge der verringerten Interaktion mit Cdc123. Allerdings ist beim Hefe-Zwei-Hybrid-System eine gewisse Vorsicht geboten, da es einige Limitationen aufweist: Erstens kann die Fusion der Interaktionspartner mit DNA-Bindungs- und Transkriptionsaktivierungsdomänen deren Interaktion beeinflussen. Zweitens muss die Interaktion im Zellkern stattfinden: Wenn eines der beiden Fusionsproteine nicht im Zellkern lokalisiert, ist der Interaktionsnachweis nicht möglich. Drittens ist die Sensitivität des Reporterassays begrenzt, so dass schwache Interaktionen teilweise nicht nachweisbar sind oder keine Unterscheidung zwischen starken und sehr starken Interaktionen möglich ist.



**Abbildung 4.15: Die C-terminale Verkürzung von Gcd11 beeinträchtigt die Interaktion mit Cdc123, Sui2 und Sui3 und ist letal.**

**a**, Die heterozygot diploiden Stämme W10266 (*GCD11/GCD11-ha3-kanMX6 CDC123/CDC123-myc13-HIS3MX6*) und W10267 (*GCD11/gcd11 $\Delta$ 514-ha3-kanMX6 CDC123/CDC123-myc13-HIS3MX6*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Proteinlysaten wurde Gcd11-ha bzw. Gcd11 $\Delta$ 514-ha mit 12CA5-Antikörper immunpräzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -ha IP) wurden im Western Blot mit 12CA5- und 9E10-Antikörpern und spezifischen Antiseren für Sui2 und Sui3 analysiert.

**b**, Die heterozygot diploiden Stämme W10194 (*GCD11/GCD11-ha3-kanMX6*) und W10195 (*GCD11/gcd11 $\Delta$ 514-ha3-kanMX6*) wurden einer Tetradenanalyse auf XYD unterzogen und anschließend bei 25°C inkubiert (Abkürzungen: wt = Wildtyp, h = *GCD11-ha3-kanMX6*; Sporen mit dem Genotyp *gcd11 $\Delta$ 514-ha3-kanMX6* waren nicht lebensfähig).

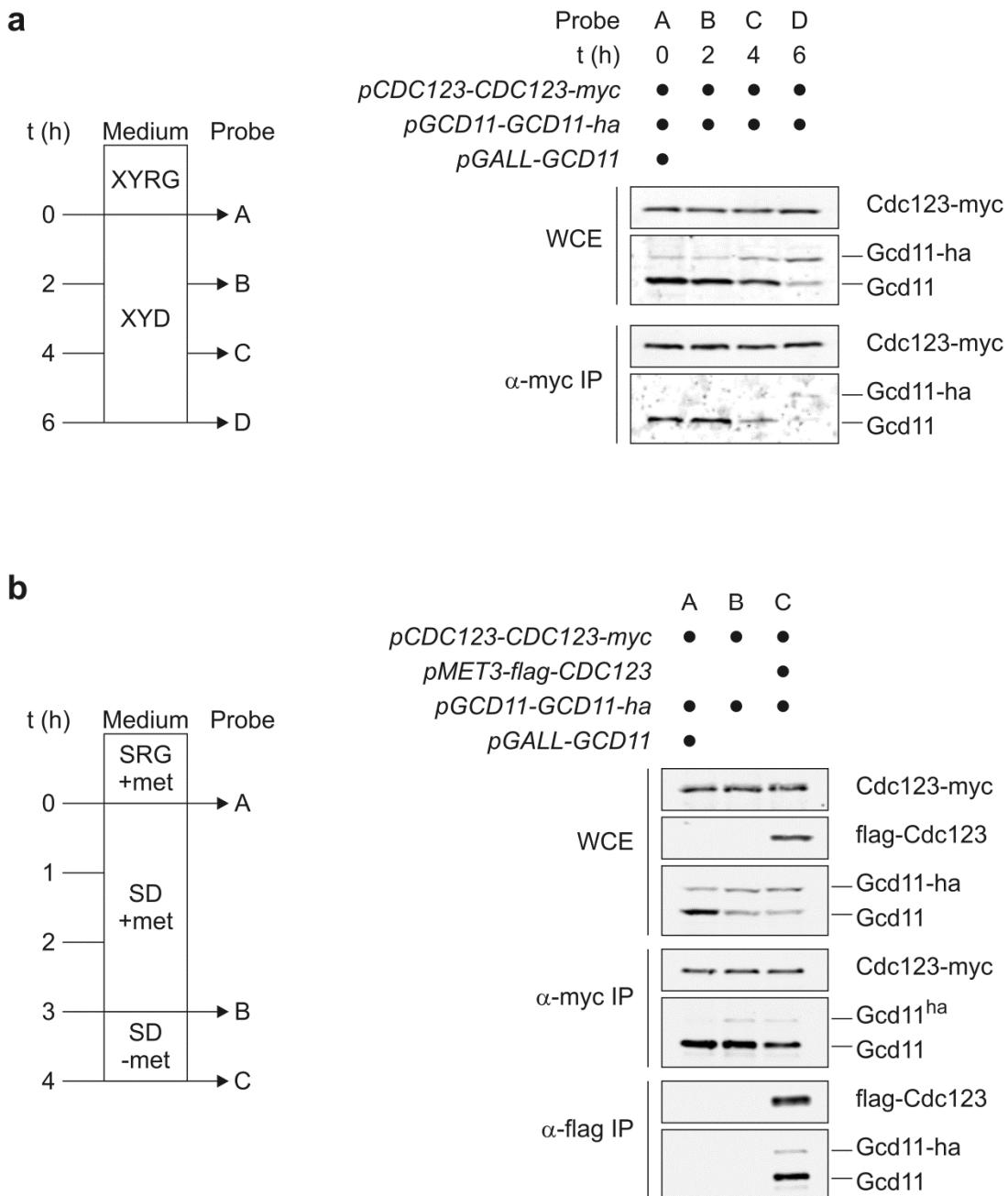
Um die Auswirkungen der Gcd11-Verkürzung auf die Interaktion mit Cdc123, Sui2 und Sui3 zu überprüfen, wurde in einem diploiden Stamm eine der beiden *GCD11*-Kopien am 3'Ende verkürzt, so dass die Codons für die letzten 13 Aminosäuren fehlen, und mit dem ha-Epitop fusioniert (*gcd11Δ514-ha3*). Als Kontrolle diente ein Stamm, in dem *GCD11* mit dem ha-Epitop fusioniert, aber dabei nicht verkürzt wurde (*GCD11-ha3*). Außerdem wurde in beiden Stämmen eine der beiden *CDC123*-Kopien mit einem myc-Epitop markiert. Eine Immunpräzipitation von Gcd11-ha und Gcd11Δ514-ha zeigte eine stark verringerte Interaktion der verkürzten Form mit Cdc123-myc, Sui2 und Sui3 (Abb. 4.15a) und bestätigt damit die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Experiments. In der Tetradenanalyse waren Sporen mit dem *gcd11Δ514-ha*-Allel nicht lebensfähig, während *GCD11-ha* zu etwas kleineren Kolonien führt als Wildtyp-*GCD11* (Abb. 4.15b). Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung des C-Terminus von Gcd11 für die Interaktion mit Cdc123 und für die Assemblierung eines funktionalen eIF2-Komplexes. Dies steht in Einklang mit dem Modell, dass Cdc123 die Assemblierung des eIF2-Komplexes bewirkt.

## 4.6 Die Funktion von Cdc123 ist nicht auf neu synthetisiertes Gcd11 beschränkt

Wenn Cdc123 die Assemblierung der drei eIF2-Untereinheiten fördert, so stellt sich die Frage, wann diese Assemblierung eine Rolle spielt: Werden neu synthetisierte eIF2-Untereinheiten durch Cdc123 zu einem stabilen eIF2-Komplex formiert? Oder ist der eIF2-Komplex instabil und muss ständig reassembliert werden? In der Tat wurde auf Grund der Homologie zwischen der C-terminalen Domäne von eIF2β (Sui3) und der N-terminalen Domäne von eIF5 (Tif5) die Hypothese aufgestellt, dass diese an den gleichen Bereich von eIF2γ (Gcd11) binden (Thompson et al., 2000; Conte et al., 2006); im Rahmen der Startcodon-Erkennung könnte eIF5 eIF2β verdrängen und somit nicht nur die GTPase-Aktivität von eIF2γ stimulieren, sondern auch den trimeren eIF2-Komplex destabilisieren. Eine Unterscheidung, ob Cdc123 nur zur einmaligen Assemblierung oder zur Reassemblierung des eIF2-Komplexes benötigt wird, ist durch Repression der *GCD11*-Expression möglich. Ist Cdc123 nur zur Assemblierung neu synthetizierter eIF2-Untereinheiten nötig, sollte die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 nach Abschalten der Gcd11-Neusynthese rasch verloren gehen. Ist Cdc123 jedoch auch in die Reassemblierung von dissoziiertem eIF2-Komplex involviert, sollte die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 auch nach Abschalten der Gcd11-Synthese nachweisbar sein (solange noch Gcd11 vorhanden ist). Zur Repression der *GCD11*-Expression wurde dieses unter die Kontrolle des *GALL*-Promotors gestellt. Um eine Beeinträchtigung der Translationsinitiation und damit verbundene sekundäre Effekte beim Abschalten der Gcd11-Synthese zu vermeiden, wurde das Experiment in einem diploiden Stamm durchgeführt: Die zweite *GCD11*-Kopie wurde vom endogenen Promotor konstitutiv

exprimiert; zur Unterscheidung der von den beiden *GCD11*-Allelen exprimierten Proteine wurde die konstitutiv exprimierte Form mit einem ha3-Epitop markiert. In einer Zeitreihe wurde die Auswirkung der Repression des *GALL*-Promotors auf die Menge von Gcd11 und dessen Interaktion mit Cdc123-myc verfolgt (Abb. 4.16a). Wie erwartet, nahm die Gcd11-Menge nach Abschalten der Neusynthese ab, während die Menge des vom endogenen Promotor exprimierten Gcd11-ha konstant blieb (oder sogar leicht zunahm). In der Immunpräzipitation von Cdc123-myc ist deutlich erkennbar, dass dieses auch mehrere Stunden nach Abschalten der Gcd11-Synthese noch mit dem vorhandenen Gcd11 interagiert. Außerdem fällt auf, dass Cdc123-myc anscheinend unmarkiertes Gcd11 gegenüber Gcd11-ha bevorzugt. Dies unterstreicht die Bedeutung der C-terminalen Domäne von Gcd11 für die Interaktion mit Cdc123 (vgl. 4.5) und erklärt die beobachteten synthetischen Effekte von C-terminal epitopmarkierten Gcd11-Varianten mit *cdc123*-Mutationen (Richter, 2006).

Die Interaktion von Cdc123-myc mit Gcd11 in Abwesenheit von Gcd11-Synthese unterstützte die Hypothese, dass Cdc123 auch zur Reassemblierung von eIF2 nach Dissoziation der Untereinheiten dient. Eine Einschränkung des Experiments ist jedoch, dass der *GALL*-Promotor zur Überexpression von *GCD11* führt und deshalb zu Beginn des Experiments eine erhöhte Gcd11-Menge vorliegt. Möglicherweise bindet dieses im Überschuss synthetisierte Gcd11 an Cdc123 und bleibt für die Dauer des Experiments gebunden. Um dies zu verhindern, wurde das Experiment durch eine induzierbare *CDC123*-Kopie erweitert: Neben dem vom endogenen Promotor exprimierten *CDC123-myc* wurde eine *flag-CDC123*-Kopie unter der Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors eingeführt. Wie in Abbildung 4.16b dargestellt, war zu Beginn des Experiments der *GALL*-Promotor induziert und der *MET3*-Promotor reprimiert (Kultur A). Zunächst wurde nun die Expression von *pGALL-GCD11* reprimiert (Kultur B) und knapp 3 Stunden später die Expression von *pMET3-flag-CDC123* induziert (Kultur C). Wenn flag-Cdc123 synthetisiert wird, findet also keine Neusynthese von Gcd11 mehr statt. Außerdem zeigt der Vergleich der Proteinmengen von Gcd11 und Gcd11-ha in Kultur B, dass zum Zeitpunkt der *flag-CDC123*-Induktion keine erhöhte Gcd11-Menge vorliegt (da es sich um einen heterozygot diploiden Stamm handelt und Gcd11-ha unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert wurde). Bei der zur Kontrolle durchgeführten Immunpräzipitation des konstitutiv exprimierten Cdc123-myc zeigte sich wie schon beim vorangegangenen Versuch eine Interaktion mit Gcd11 unabhängig von dessen Neusynthese (Abb. 4.16b). Auch flag-Cdc123 interagierte mit Gcd11, welches nicht mehr neu synthetisiert wurde. Da dieses flag-Cdc123 erst synthetisiert wurde, als die Gcd11-Synthese bereits eingestellt war und keine erhöhte Gcd11-Menge vorlag, kann es sich weder um eine Bindung von neu synthetisiertem noch von überschüssigem Gcd11 handeln.



**Abbildung 4.16: Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist nicht auf neu synthetisiertes Gcd11 beschränkt.**

**a,** Der Stamm W9471 (*CDC123-myc13-kanMX6/CDC123-myc13-kanMX6 natNT2-pGALL-GCD11/GCD11-ha3-HIS3MX6*) wurde in XYRG bei 25°C kultiviert und dann in XYD umgesetzt. Alle 2 h wurden gemäß dem Versuchsschema auf der linken Seite Proben genommen. Aus den Proteinlysaten wurde Cdc123-myc mit 9E10-Antikörper präzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP) wurden im Western-Blot mit 9E10-Antikörper und  $\alpha$ -Gcd11-Antiserum analysiert. Oberhalb der Western Blots ist angegeben, ob die Konstrukte zum Zeitpunkt der Probennahme exprimiert wurden (d.h. ob Neusynthese der entsprechenden Proteine stattfand).

**b,** Der Stamm W9700 (*CDC123-myc13-kanMX6/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pMET3-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2 natNT2-pGALL-GCD11/GCD11-ha3-HIS3MX6*) wurde in SRG+met bei 25°C kultiviert, zunächst für 3 h in SD+met und anschließend für 1 h in SD-met umgesetzt. Die Probennahme ist in dem Versuchsschema auf der linken Seite dargestellt. Aus den Proteinlysaten wurden Cdc123-myc und flag-Cdc123 mit 9E10- bzw.  $\alpha$ -flag-Antikörper präzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP und  $\alpha$ -flag IP) wurden im Western-Blot mit 9E10- und  $\alpha$ -flag-Antikörper und affinitätsgereinigtem Gcd11-Antiserum analysiert. Die Beschriftung über den Western Blots gibt wieder die aktuelle Expression der Konstrukte an.

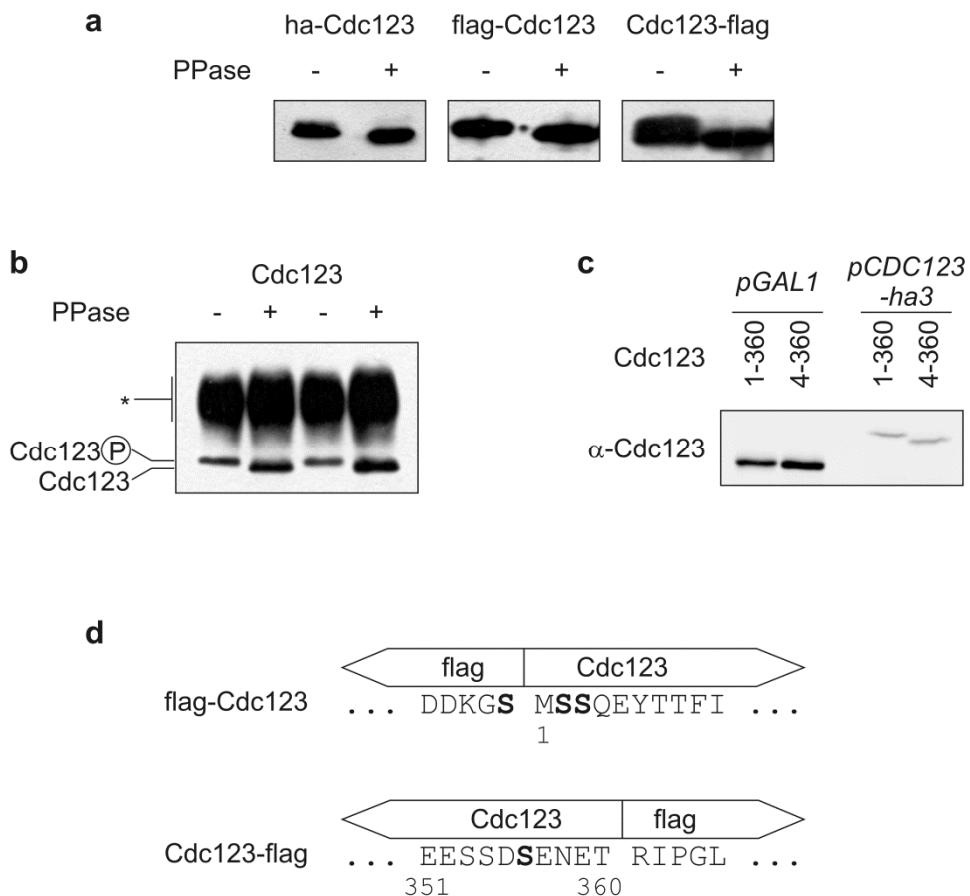
Die Aussagekraft des Experiments wurde jedoch dadurch eingeschränkt, dass zum einen durch Expression von *flag-CDC123* vom *MET3*-Promotor eine leicht erhöhte Menge an Cdc123 vorlag und zum anderen das C-terminale ha-Epitop bei Gcd11 die Interaktion mit Cdc123 beeinträchtigte. Deshalb lässt sich nicht völlig ausschließen, dass Cdc123 eigentlich nur mit neu synthetisiertem Gcd11 interagiert und dass die beobachtete Interaktion der Cdc123-Varianten mit dem vorhandenen Gcd11 eine Folge der erhöhten Cdc123-Menge einerseits und der verringerten Interaktion mit dem neu synthetisierten Gcd11-ha andererseits darstellt. Die Daten belegen aber, dass die Neusynthese von Gcd11 keine strikte Notwendigkeit für die Interaktion mit Cdc123 darstellt. Somit ist eine Rolle von Cdc123 bei der Reassemblierung von zerfallenen eIF2-Komplexen durchaus plausibel.

## 4.7 Die Phosphorylierung von Cdc123 in wachsenden Zellen

Posttranskriptionale Modifikationen sind wichtige Determinanten der Aktivität, Interaktion, Lokalisation und Stabilität von Proteinen. Im Bereich der eukaryotischen Translationskomponenten sind zahlreiche posttranskriptionale Modifikationen bekannt, darunter die Ubiquitinierung von ribosomalen Untereinheiten (Spence et al., 2000), die Modifikation des Elongationsfaktor eEF1A mit Methylgruppen oder Glycerylphosphorylethanolamin (Merrick und Nyborg, 2000), die Derivatisierung eines Histidinrestes von eEF2 zu Diptamid (Merrick und Nyborg, 2000) oder die (nach bisherigem Wissen) einmalige Hypusin-Modifikation von eIF5A (Park et al., 2010). Am weitesten verbreitet ist jedoch die Phosphorylierung, welche auch bei der Regulation der Translationsinitiation eine zentrale Rolle spielt (vgl. 3.2.3). Da *in vitro* Studien mit Protein-Microarrays eine Phosphorylierung von Cdc123 nahe gelegt hatten (Ptacek et al., 2005), sollte nun untersucht werden, ob Cdc123 tatsächlich phosphoryliert wird und ob dies eine regulatorische Funktion auf die eIF2-Assemblierung und damit auf die Translationsinitiation ausübt. In einem ersten Schritt wurde deshalb geklärt, ob Cdc123 *in vivo* in einer phosphorylierten Form vorliegt.

### 4.7.1 Cdc123 ist ein Phosphoprotein

Den ersten Hinweis auf eine Phosphorylierung von Cdc123 lieferte die Phosphatase-Behandlung von immunpräzipitiertem ha-Cdc123: Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist eine veränderte Mobilität der dephosphorylierten Form in der SDS-Gelelektrophorese zu erkennen (Abb. 4.17a), was den Rückschluss zulässt, dass die unbehandelte Form phosphoryliert ist. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Cdc123, welches an N- oder C-Terminus mit einem flag-Epitop markiert war, erzielt und konnten, nachdem ein Cdc123-Antikörper zur Verfügung stand (vgl. Anhang 9.3), auch für Cdc123 ohne Epitop bestätigt werden (Abb. 4.17b). Cdc123 liegt also in wachsenden Zellen in phosphorylierter Form vor.



**Abbildung 4.17: Cdc123 ist ein Phosphoprotein.**

**a,** Die Stämme W6098 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W6890 (*leu2::pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W7474 (*leu2::pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1-LEU2*) wurden in XYL bei 25°C kultiviert und der *GAL1*-Promotor für ca. 3 h durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Aus den Proteinlysaten wurden die epitopmarkierten Cdc123-Varianten mit 12CA5- bzw. α-flag-Antikörper präzipitiert. Die Proben wurden auf zwei Ansätze aufgeteilt, von welchen einer mit λ-Phosphatase behandelt wurde und der andere nicht. Die Analyse im Western Blot erfolgte mit 12CA5- bzw. α-flag-Antikörper.

**b,** Aus Proteinlysaten des Wildtyps K699, welcher in XYD bei 30°C kultiviert wurde, wurde Cdc123 mit affinitätsgereinigtem Antiserum präzipitiert. Eine Hälfte des Präzipitats wurde mit λ-Phosphatase behandelt, die andere diente als Kontrolle. Im Western Blot wurde Cdc123 mit affinitätsgereinigtem Antiserum nachgewiesen (\*= Kreuzreaktion mit dem für die IP eingesetzten Antikörper).

**c,** Die Stämme W8716 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(1-360)-tCYC1-TRP1*) und W8940 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(4-360)-tCYC1-TRP1*) wurden in XYRG bei 25°C kultiviert, die Stämme W8803 (*cdc123Δ::kanMX4 pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(1-360)-tCYC1*) und W8950 (*cdc123Δ::kanMX4 pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1*) in XYD. Von den Proteinlysaten wurden 0,2 OD<sub>595</sub> (W8716, W8940) bzw. 2 OD<sub>595</sub> (W8803, W8950) für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Cdc123-Varianten wurden mit affinitätsgereinigtem Cdc123-Antiserum nachgewiesen.

**d,** flag-markierte Cdc123-Varianten wurden aus den Stämmen W6890 (*leu2::pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W7474 (*leu2::pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1-LEU2*) gereinigt und per Massenspektrometrie auf Phosphorylierungen untersucht. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

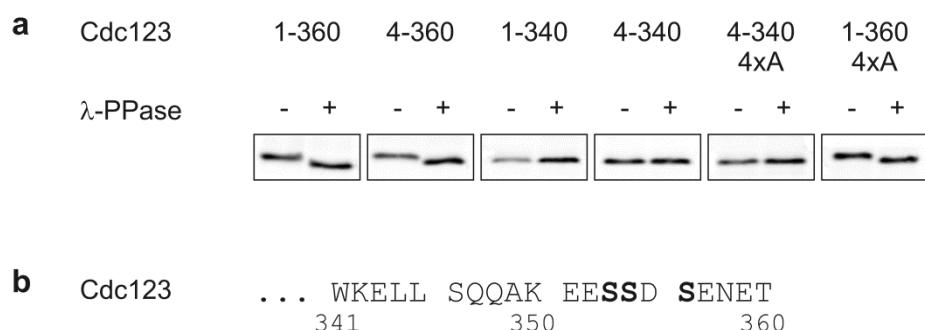
Anschließende Versuche, die Phosphorylierungsstelle(n) von Cdc123 durch Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Deutzmann) zu identifizieren, waren jedoch wenig erfolgreich. Zunächst wurde Cdc123 mit einem N-terminalen flag-Epitop markiert, in Hefe überexprimiert und gereinigt (Anhang 9.2.5). Die massenspektroskopische Analyse ergab – neben Phosphorylierungen im flag-Epitop – die Phosphorylierung der Serine an Position 2 und 3 von Cdc123 (Abb. 4.17d). Da diese direkt auf das Epitop folgen, wird die Phosphorylierung möglicherweise durch die Epitopmarkierung verursacht. So könnte durch die Fusion von Epitop und Cdc123 eine neue Erkennungssequenz für eine Kinase entstehen oder der N-terminale Bereich von Cdc123 könnte durch das Epitop stärker exponiert und damit für Kinasen zugänglich sein. Die Untersuchung einer N-terminalen Verkürzung von Cdc123 zeigte, dass die Serine 2 und 3 nicht notwendig für die Funktionalität von Cdc123 sind (vgl. 4.4.1). Ein interessanter Effekt war bei der SDS-Gelelektrophorese sichtbar (Abb. 4.17c): Beim Vergleich von Cdc123-Varianten ohne Epitop trat nur ein geringer Mobilitätsunterschied zwischen der N-terminal verkürzten und der Wildtyp-Form auf, wie es bei einem Unterschied von nur zwei Serinen zu erwarten ist. Bei N-terminal ha-epitopmarkierten Formen war der Mobilitätsunterschied viel größer, was dafür spricht, dass Cdc123 ohne N-terminales Epitop an den Serinen 2 und 3 nicht phosphoryliert ist und dass ein N-terminales ha- oder flag-Epitop zur Phosphorylierung an Serin 2 und/oder 3 führt.

In Ergänzung zur N-terminal markierten Form wurde auch C-terminal markiertes Cdc123-flag in der Massenspektrometrie untersucht: In diesem Fall war eine Phosphorylierung des letzten Serins von Cdc123 kurz vor dem flag-Epitop nachweisbar (Abb. 4.17d), womit wieder ein Einfluss des Epitops auf die Phosphorylierung plausibel ist.

#### 4.7.2 Der C-terminale Bereich von Cdc123 ist phosphoryliert

Da die Phosphorylierungsstellen von Cdc123 mittels Massenspektrometrie nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten, wurden die in Abschnitt 4.4.3 hergestellten Cdc123-Varianten herangezogen. Aus Stämmen, welche die Cdc123-Varianten ohne Epitop vom *GAL1*-Promotor überexprimieren, wurde Cdc123 immunpräzipitiert und der Einfluss einer Phosphatasebehandlung auf die Mobilität in der SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4.18a). Bei Wildtyp-Cdc123 (1-360) war der erwartete Shift durch Phosphatase-Behandlung sichtbar, ebenso bei der N-terminal verkürzten Variante (4-360) und der 4xA-Substitution (1-360, 4xA). Im Gegensatz dazu war bei der C-terminal verkürzten Form (1-340) und bei den Kombinationen mit C-terminaler Verkürzung (4-340 und 4-340, 4xA) kein Mobilitätsunterschied zwischen Phosphatase-behandelter und unbehandelter Form erkennbar. Der C-Terminus von Cdc123 (Aminosäuren 341-360) ist also phosphoryliert. Eine weitere Phosphorylierung von Cdc123 ist jedoch nicht ausgeschlossen, da eine einzelne Phosphorylierung möglicherweise nicht zu einem Mobilitätsunterschied in der eindimensionalen

SDS-Gelelektrophorese führt. In der Tat wurden mittlerweile drei Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Cdc123 identifiziert (Bodenmiller et al., 2008): Es handelt sich um die Serine 353, 354 und 356 (Abb. 4.18b). Eine Phosphorylierung dieser Serine würde zusammen mit den umgebenden Glutamat- und Aspartat-Resten zu einer stark negativen Ladung des C-Terminus von Cdc123 führen, was die Interaktion von Cdc123 mit anderen Proteinen beeinflussen könnte. Die entsprechenden Serine sind in anderen Eukaryoten nicht konserviert, aber alle untersuchten Homologen weisen negativ geladene Reste in den letzten Aminosäuren auf (vgl. Abb. 3.6). Für eine Bedeutung des nicht konservierten C-terminalen Bereichs in Hefe spricht auch, dass die Verkürzung auf 340 Aminosäuren zu einem langsameren Wachstum führt (vgl. 4.4.3).



**Abbildung 4.18: Der C-Terminus von Cdc123 ist phosphoryliert.**

a, Die Stämme W8716, W8720, W8940, W8944, W8948 und W8979, welche die angegebenen Cdc123-Varianten vom *GAL1*-Promotor exprimieren (allgemeiner Genotyp *cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123-tCYC1-TRP1*), wurden in XYRG bei 25°C kultiviert. Die Cdc123-Varianten wurden aus den Proteinlysaten mit affinitätsgereinigtem  $\alpha$ -Cdc123-Antiserum präzipitiert. Eine Hälfte des Präzipitats wurde mit  $\lambda$ -Phosphatase behandelt, die andere diente als Kontrolle. Im Western Blot wurde Cdc123 mit affinitätsgereinigtem Antiserum nachgewiesen.

b, Im Bereich der letzten 20 Aminosäuren von Cdc123 wurden von anderen Arbeitsgruppen drei Phosphorylierungen identifiziert (Bodenmiller et al., 2008).

## 4.8 Die induzierte Phosphorylierung von Cdc123

Reversible Phosphorylierungen spielen eine zentrale Rolle für die Regulation zahlreicher biologischer Prozesse. Da Cdc123 essentiell für die Integrität von eIF2 ist, wäre eine Regulation der Translationsinitiation über Cdc123 denkbar. Deshalb ist es von großem Interesse zu klären, ob Cdc123 Ziel einer regulatorischen Phosphorylierung ist, unter welchen Bedingungen bzw. auf welche Stimuli hin diese Phosphorylierung auftritt und welche Kinase(n) daran beteiligt sind.

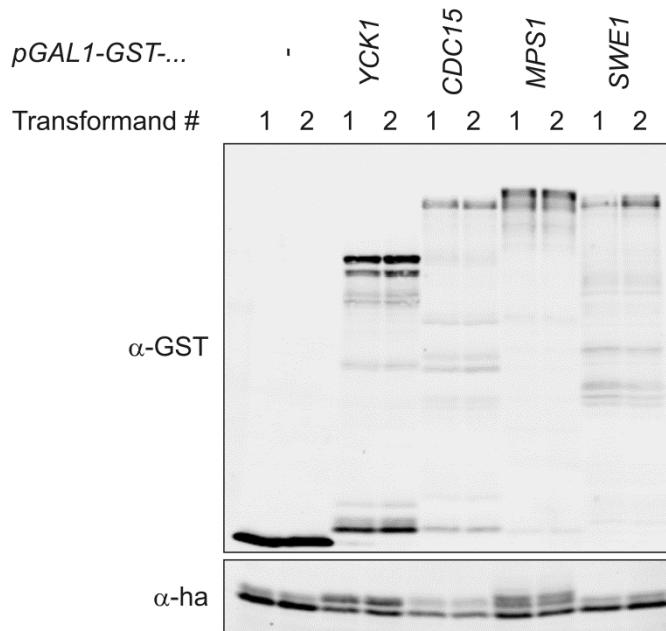
#### 4.8.1 Die Überexpression der Kinasen Yck1, Yck2, Cdc15 und Mps1 führt zur Hyperphosphorylierung von Cdc123

Bei Studien mit Protein-Mikroarrays wurde Cdc123 als potentielles Substrat der Kinasen Swe1 und Cmk1 identifiziert (Ptacek et al., 2005). Swe1 ist homolog zu den Wee-Kinasen höherer Eukaryoten und spielt eine Rolle beim Eintritt in die Mitose (Enserink und Kolodner, 2010): Swe1 inhibiert mitotische CDKs, besonders Clb2-CDK, durch Phosphorylierung der CDK an Y19. In der G2/M-Phase wird Swe1 zum Knospenhals rekrutiert, wo multiple Phosphorylierung durch Cla4, Cdc5 und M-CDKs die Swe1-Degradation einleiten. Störungen des Aktinzytoskeletts oder des Septinrings führen zur Stabilisierung von Swe1, was die Inhibition von M-CDKs und dadurch den Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase zur Folge hat. Die andere potentielle Cdc123-Kinase, Cmk1, ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase (CaM-Kinase), welche mit den Typ II-CaM-Kinasen von Säugern verwandt ist (Ohya et al., 1991). Obwohl Cmk1 *in vitro* aus anderen Organismen bekannte CaM-Kinase-Substrate phosphoryliert, sind die *in vivo*-Substrate von Cmk1 in *S. cerevisiae* noch unklar (Ohya et al., 1991; Cyert, 2001). Möglicherweise spielen die CaM-Kinasen Cmk1 und Cmk2 in *S. cerevisiae* eine Rolle für die Lebensfähigkeit der Zellen bei längerem  $\alpha$ -Faktor-Arrest und Toleranz von schwachen organischen Säuren oder Hitze (Cyert, 2001).

Die große Zahl der identifizierten *in-vitro*-Substrate von Swe1 (117) und Cmk1 (158) wirft jedoch die Frage auf, ob es sich dabei tatsächlich auch um *in-vivo*-Substrate dieser Kinasen handelt.

Deshalb wurde ein unabhängiger Screen zur Identifizierung von Kinasen, die Cdc123 phosphorylieren können, durchgeführt: Dazu wurde ein Set von Stämmen verwendet, welche jeweils ein Kinasegen fusioniert mit GST (Glutathion-S-Transferase) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors auf einem  $2\mu$ -Plasmid enthalten und so die induzierbare Überexpression der Kinasen erlauben (Zhu et al., 2000). In diese Stämme wurde durch Kreuzung ein *pGAL1-ha3-CDC123*-Konstrukt eingebracht. Nach Überexpression der GST-Kinase-Fusionen und von ha-Cdc123 wurde mittels Western Blot untersucht, ob die Kinase-Überexpression einen Einfluss auf die Mobilität von ha-Cdc123 hatte. Von den insgesamt 66 untersuchten Kinaseträgern (Tabelle siehe Anhang 9.2.6.1) ließ sich bei 30 die Kinase-Überexpression nachweisen (d.h. im  $\alpha$ -GST Western Blot war eine Bande mit ungefähr dem erwarteten Molekulargewicht sichtbar). In drei dieser Stämme zeigte ha-Cdc123 ein verändertes Laufverhalten: bei Überexpression der Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1. Die von Ptacek et al. (2005) identifizierten Cdc123-Kinasen konnten nicht bestätigt werden: Cmk1 wurde exprimiert, beeinflusste aber das Laufverhalten von ha-Cdc123 nicht. Möglicherweise ist Cmk1 unter den Versuchsbedingungen jedoch inaktiv, weil keine Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin stattfindet. Bei Swe1 war keine Expression nachweisbar, weshalb ein Plasmid zur Swe1-Überexpression kloniert wurde.

Zur Überprüfung der Ergebnisse des Screens wurden die Plasmide der drei Kandidaten *YCK1*, *CDC15* und *MPS1* aus den Hefestämmen isoliert. Diese Plasmide, sowie das klonierte *SWE1*-Plasmid und der Kontrollvektor pEG(KG) wurden in einen haploiden Hefestamm transformiert, welcher ha-Cdc123 vom endogenen Promotor exprimiert. Auch bei der Kontrolle ohne Kinaseüberexpression ist über der Hauptbande von ha-Cdc123 eine schwache zweite Bande erkennbar (Abb. 4.19), welche dafür spricht, dass ha-Cdc123 in verschiedenen (Phospho-)Formen vorliegt. Bei Überexpression von Yck1 ist eine deutliche Doppelbande von ha-Cdc123 sichtbar und bei Überexpression von Mps1 liegen sogar drei verschiedene ha-Cdc123-Banden vor. Bei der Überexpression von Cdc15 nimmt die ha-Cdc123-Menge ab, relativ zur unteren Bande nimmt die hyperphosphorylierte Form zu. Obwohl die Überexpression von Swe1 gut nachweisbar war, zeigte sie keinen Einfluss auf ha-Cdc123.



**Abbildung 4.19:** Die Überexpression der Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1 beeinflusst die Mobilität von ha-Cdc123.

Der Stamm W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit den Plasmiden pEG(KG), pWS2401, pWS2678, pWS2679 und pWS3394 transformiert. Je zwei Transformanden wurden in SR-U bei 25°C kultiviert und zur Induktion der Kinase-Expression für 5 h in XYRG überführt. Für die Western-Blot-Analyse der Proteinlysate wurden die Antikörper  $\alpha$ -GST und 12CA5 verwendet.

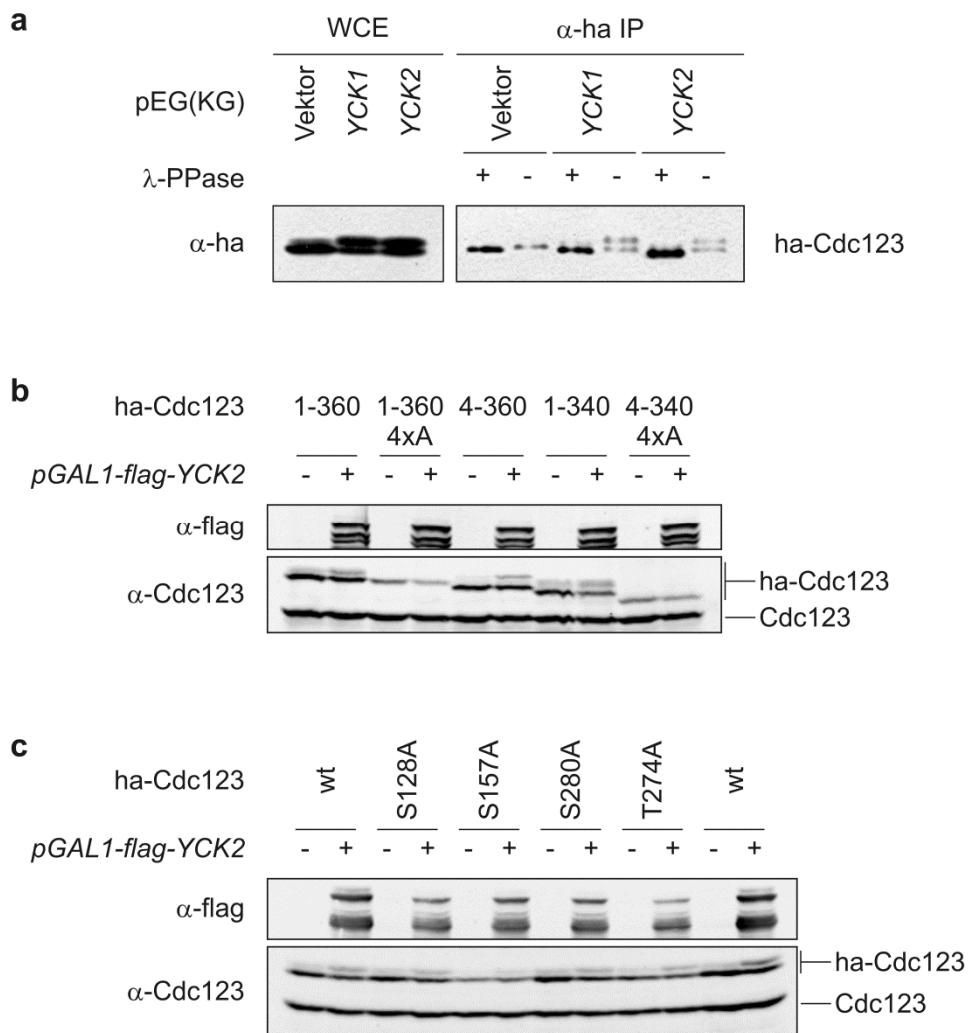
Während sich also kein Hinweis auf die von Ptacek et al. (2005) postulierte Phosphorylierung von Cdc123 durch Cmk1 und Swe1 ergab, führte die Überexpression von Cdc15, Mps1 und Yck1 zur Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123.

Cdc15 ist eine Komponente des MEN (mitotic exit network), welches in der späten Anaphase zur Freisetzung der Phosphatase Cdc14 aus dem Nukleolus führt (Stegmeier und Amon, 2004): Das G-Protein Tem1 ist an dem Spindelpolkörper (SPB) lokalisiert, welcher in die Knospe wandert. In der Knospe trifft Tem1 auf seinen Aktivator Lte1, wodurch die Bindung von GTP an Tem1 gefördert wird. Tem1-GTP aktiviert die Kinase Cdc15 und diese aktiviert den Mob1-Dbf2-Komplex, welcher die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus stimuliert.

Die Kinase Mps1 ist an der Duplikation des Spindelpolkörpers in der späten G1-Phase und am Spindelassemblierungskontrollpunkt (spindle assembly checkpoint, SAC) beteiligt (Winey und Huneycutt, 2002). Der SAC inhibiert den Eintritt in die Anaphase, solange nicht alle Kinetochore korrekt an den Spindelapparat gebunden sind (Musacchio und Salmon, 2007). Zu den Substraten von Mps1 zählen die SPB-Komponenten Spc42, Spc98 und Spc110 (Winey und Huneycutt, 2002). Die Überexpression von Mps1 führt zur Hyperphosphorylierung von Mad1 und zur Aktivierung des SAC unabhängig von Spindeldefekten (Winey und Huneycutt, 2002). Möglicherweise spielt Mps1 auch eine Rolle beim Austritt aus der Mitose, da Mps1 mit der MEN-Komponente Mob1 interagiert und diese *in vitro* phosphoryliert (Winey und Huneycutt, 2002).

Yck1 und die homologe Kinase Yck2 sind funktionell redundante Typ I-Caseinkinasen (CK1). Sie sind über einen Geranylgeranyl-Anker peripher an die cytoplasmatische Seite der Zellmembran gebunden, lokalisieren insbesondere an der apikal wachsenden Knospenspitze und danach am Knopshals und spielen eine Rolle bei Morphogenese, Cytokinese und Endocytose (Robinson et al., 1999). Zu den zahlreichen Substraten der CK1 zählen: Rezeptoren und Transporter in der Zellmembran, wie der  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 oder die Uracil-Permease Fur4, deren Phosphorylierung die Ubitquitinierung und Endozytose auslöst (Hicke et al., 1998; Marchal et al., 2000); die Phosphatase Mih1, welche die Phosphorylierung von M-CDKs durch Swe1 rückgängig macht und durch CK1-abhängige Phosphorylierung inhibiert wird (Pal et al., 2008); der Translationsrepressor Kdh1, welcher die Translation von knospenspezifischen Proteinen während des Transports der mRNA inhibiert und durch CK1-vermittelte Phosphorylierung an der Knospenspitze inaktiviert wird (Paquin und Chartrand, 2008); sowie Mth1 und Std1, welche in Abwesenheit von Glukose die Repression der *HXT*-Gene durch Rgt1 stimulieren und bei Bindung von Glukose an die Sensoren Rgt2 und Snf3 durch die CK1 phosphoryliert und anschließend über SCF<sup>Grr1</sup> ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden (Moriya und Johnston, 2004).

Da Yck2 stark homolog zu Yck1 ist, aber im Kinasescreen nicht enthalten war, wurde untersucht, ob auch die Überexpression von Yck2 zur Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 führt. In der Tat verursacht sowohl die Überexpression von Yck1, als auch die Überexpression von Yck2 eine Doppelbande von ha-Cdc123. Bei beiden Banden handelt es sich um phosphorylierte Formen, wie aus dem Shift bei Phosphatase-Behandlung ersichtlich ist (Abb. 4.20a).



**Abbildung 4.20: Die Überexpression von YCK1 oder YCK2 führt zur Phosphorylierung von Cdc123.**

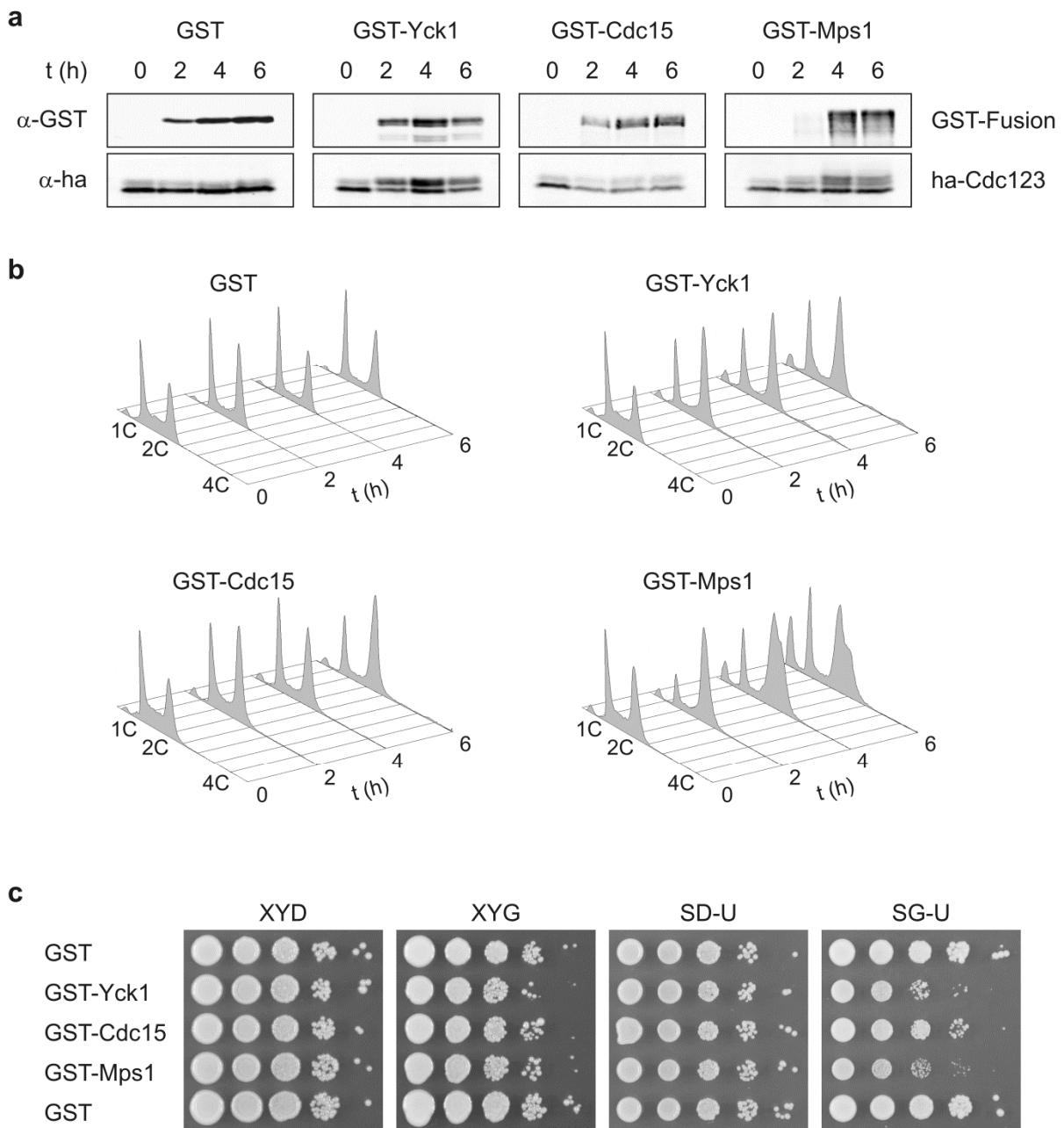
**a,** W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit den Plasmiden pEG(KG), pWS2401 und pWS2342 transformiert, in SR-U bei 25°C kultiviert und zur Induktion der Kinase-Expression für 5 h in XYRG überführt. Aus den Proteinlysaten wurde ha-Cdc123 mit 12CA5-Antikörper präzipitiert und eine Hälfte des Präzipitats mit  $\lambda$ -Phosphatase behandelt. Für die Western-Blot-Analyse von Lysaten und Präzipitaten wurde 12CA5-Antikörper verwendet.

**b,** Die Stämme K699 (WT) und W8426 (*his3::pGAL1-flag3-YCK2-tCYC1-HIS3*) wurden mit den ARS/CEN-Plasmiden pWS3057, pWS3060 und pWS3084-pWS3086 transformiert, welche ein *pCDC123-ha3-CDC123*-Konstrukt zur Expression der angegebenen Cdc123-Varianten enthalten. Die Transformanden wurden zunächst in SR-T bei 25°C kultiviert, für 2 h in XYL überführt und danach für 3 h 2% Galaktose zugegeben. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert, wofür  $\alpha$ -flag-Antikörper und affinitätsgereinigtes  $\alpha$ -Cdc123-Antiserum eingesetzt wurde.

**c,** Der Versuch von Abschnitt **b** wurde mit den Plasmiden pWS2466, pWS2476, pWS2579, pWS2580 und pWS3021 wiederholt. Da diese Plasmide einen *URA3*-Marker enthalten wurde SR-U für die Vorkultur eingesetzt.

Um die Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, wurde der Einfluss der Yck2-Überexpression (in diesem Fall von einem integrierten *pGAL1-flag3-YCK2*-Plasmid) auf verschiedene ha-Cdc123-Mutanten aus Abschnitt 4.4.3 analysiert (Abb. 4.20b). Bei der N-terminalen Verkürzung (4-360) ist das Auftreten der hyperphosphorylierten Form nach Yck2-Überexpression deutlich erkennbar. Im Fall der C-terminalen Verkürzung (1-340) ist bereits in der Kontrolle eine hyperphosphorylierte Form sichtbar, welche bei Yck2-Überexpression zunimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Phosphorylierung durch Yck2 weder am N-Terminus (Serine 2 und 3) noch am C-Terminus stattfindet. Bei den 4xA-Substitutionen (1-360, 4xA und 4-340, 4xA) ist keine hyperphosphorylierte Form erkennbar, allerdings ist die ha-Cdc123-Menge auch deutlich geringer. Deshalb ist nicht entscheidbar, ob die Hyperphosphorylierung durch die 4xA-Substitution verhindert wird oder ob die hyperphosphorylierte Form auf Grund der verringerten ha-Cdc123-Menge nicht mehr nachweisbar ist. Eine Untersuchung der Einzelaustausche (Abb. 4.20c) ergab, dass bei S128A, T274A und S280A eine Doppelbande nach Yck2-Überexpression sichtbar ist, während das Fehlen der hyperphosphorylierten Form bei S157A auf Grund der verringerten Menge an ha-Cdc123 wieder nicht eindeutig interpretierbar ist. Die Position, an welcher Cdc123 von Yck2 phosphoryliert wird, konnte also nicht eindeutig identifiziert werden, wobei S157 ein potentieller Kandidat bleibt. Aber auch andere Phosphorylierungsstellen oder multiple Phosphorylierungen können nicht ausgeschlossen werden.

Zur eingehenderen Charakterisierung der identifizierten Cdc123-Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1 wurde deren Überexpression induziert und die Auswirkung auf ha-Cdc123 und auf den Zellzyklus analysiert (Abb. 4.21). Bei Yck1 ist die Expression bereits nach 2 h deutlich nachweisbar und geht einher mit der Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 und einer leichten Erhöhung des Anteils an Zellen mit 2C-DNA-Gehalt (also Zellen in G2- und M-Phase). Die Überexpression von Cdc15 ist ebenfalls bereits nach 2 h detektierbar und verursacht vor allem eine Abnahme der hypophosphorylierten Form von ha-Cdc123, während die Menge der hyperphosphorylierten Form annähernd konstant bleibt. Bei Mps1 ist die Überexpression nach 2 h schwach, nach 4 h gut nachweisbar. Sie geht einher mit dem Auftreten von zwei hyperphosphorylierten ha-Cdc123-Formen. Die Überexpression führt außerdem zu einem Block der Mitose durch Aktivierung des Spindel-Assemblierungskontrollpunkts, wodurch Zellen mit 2C-DNA-Gehalt akkumulieren. Die Schulter des 2C-Peaks bei den Zeitwerten 4 h und 6 h ist ein Indiz dafür, dass DNA-Synthese stattfindet, ohne dass die vorangegangene Zellteilung abgeschlossen wurde.



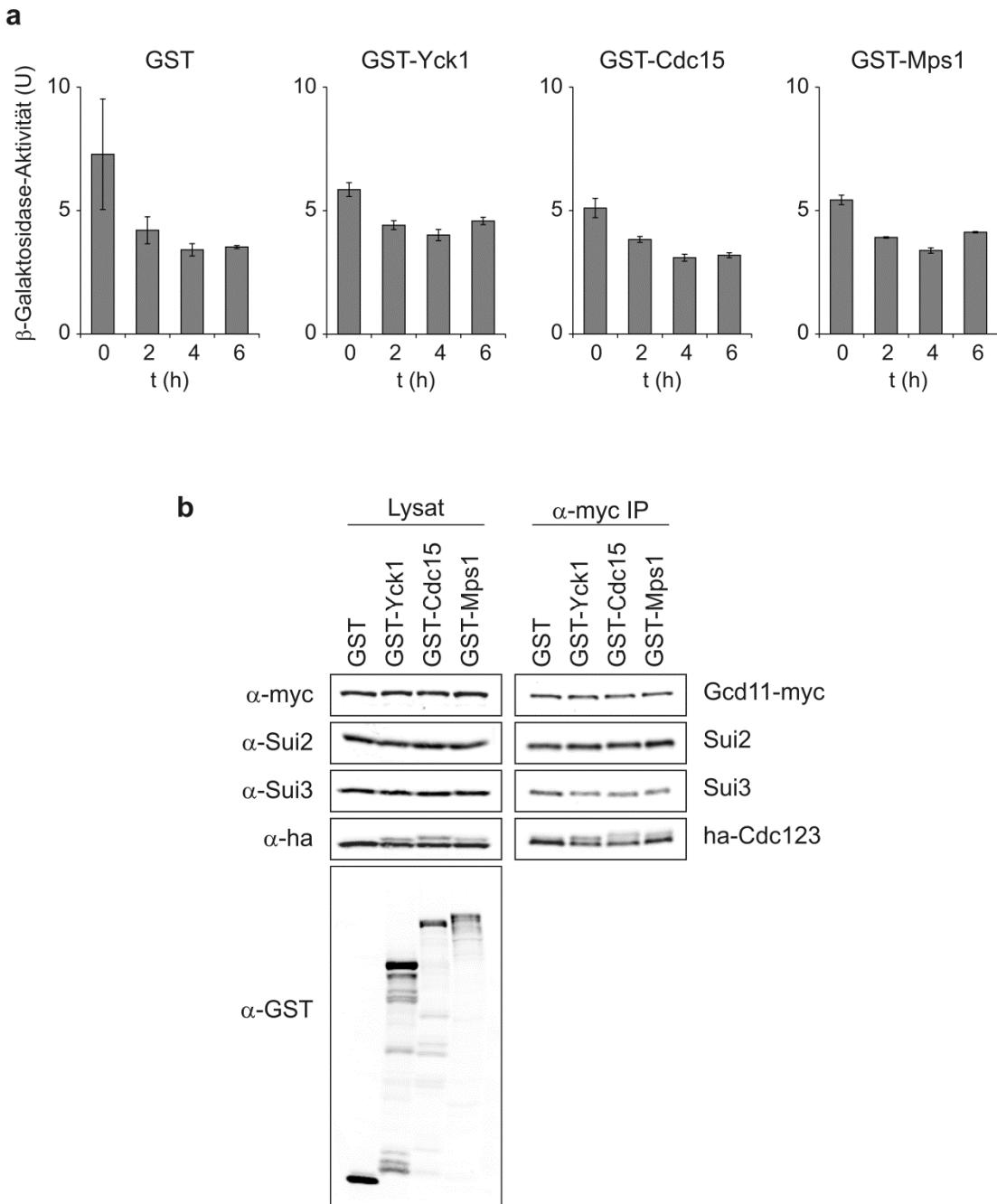
**Abbildung 4.21: Auswirkungen der Überexpression von *YCK1*, *CDC15* oder *MPS1* auf Cdc123, Zellzyklusprogression und Wachstum**

W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit den Plasmiden pEG(KG), pWS2401, pWS2678 und pWS2679 transformiert.

**a**, Die Stämme wurden zunächst in SR-U bei 25°C kultiviert und für 3 h in XYL überführt. Dann wurden die Kinase-Expression durch Zugabe von 2% Galaktose induziert und alle 2 h Proben genommen. Für die Western-Blot-Analyse der Proteinlysate wurden die Antikörper  $\alpha$ -GST und 12CA5 verwendet.

**b**, Die Zellzyklusprogression während der Zeitreihen von Teil **a** wurde durch Messung von Sytox Green-farbten Proben im Durchflusszytometer verfolgt.

**c**, Die Stämme wurden in SR-U bei 25°C kultiviert, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und in Verdünnungsreihen auf die angegebenen Platten gestempelt. Die Platten wurden für 2-4 Tage bei 25°C inkubiert.



**Abbildung 4.22: Die Überexpression von YCK1, CDC15 oder MPS1 zeigt keinen Einfluss auf eIF2.**

**a**, W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS3395 und den Plasmiden pEG(KG), pWS2401, pWS2678 und pWS2679 transformiert. Je zwei Transformanden wurden zunächst in SR-UT bei 25°C kultiviert und für 3 h in XYL überführt. Dann wurde die Kinase-Expression durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Alle 2 h wurden Proben genommen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Messung der beiden Transformanden.

**b**, W10192 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 GCD11-myc13-HIS3MX6*) wurde mit den Plasmiden pEG(KG), pWS2401, pWS2678 und pWS2679 transformiert. Die Stämme wurden in SR-U bei 25°C kultiviert, für 3 h in XYL überführt und anschließend für 3 h 2% Galaktose zugegeben. Aus den Proteinlysaten wurde Gcd11-myc mittels 9E10-Antikörper präzipitiert. Die Lysate und Präzipitate wurden im Western Blot analysiert, wobei die Antikörper 9E10, 12CA5 und  $\alpha$ -GST und spezifische Antiseren für Sui2 und Sui3 Anwendung fanden.

Die Überexpression der drei Kinasen führt zu deutlichen Wachstumsproblemen (Abb. 4.21c), wobei der Effekt bei Cdc15 moderater ist als bei Yck1 und Mps1. Auf SG-U waren die Wachstumsnachteile wesentlich ausgeprägter als auf XYG, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Kinasen von 2 $\mu$ -Plasmiden exprimiert werden und auf XY-Medien auch Zellen wachsen können, die dieses Plasmid verloren haben. Ob die Wachstumsprobleme auf die Hyperphosphorylierung (und mögliche Inaktivierung) von Cdc123 zurückzuführen sind, ließ sich nicht eindeutig klären (Anhang 9.2.6.2).

Eine wichtige Frage war, ob die Hyperphosphorylierung von Cdc123 durch die drei Kinasen zu einer Inhibition von Cdc123 führt. In diesem Fall müsste die Interaktion der eIF2-Untereinheiten abnehmen, was zu einer verringerten Menge an ternären Komplexen und zu einem Anstieg der GCN4-Expression führen würde (vgl. 4.1). Deshalb wurde der Einfluss der Kinase-Überexpression auf die GCN4-Expression mit Hilfe eines *GCN4-lacZ*-Reporters untersucht: Nach Induktion der Expression von Yck1, Cdc15 und Mps1 war jedoch kein Anstieg der GCN4-Expression nachweisbar (Abb. 4.22a). Zusätzlich wurde die Interaktion der eIF2-Untereinheiten direkt durch Immunpräzipitation von Gcd11-myc analysiert (Abb. 4.22b): Die Interaktion von Gcd11-myc mit Sui2 und Sui3 wurde von der Überexpression von Yck1, Cdc15 und Mps1 nicht beeinträchtigt. Außerdem zeigte die Immunpräzipitation, dass auch die hyperphosphorylierten Formen von Cdc123 an Gcd11 binden. Sowohl die Analyse der GCN4-Expression, als auch die Immunpräzipitation von Gcd11-myc sprechen also gegen eine Beeinträchtigung der Cdc123-Funktion und der eIF2-Assemblierung durch die Hyperphosphorylierung von Cdc123, welche bei Überexpression der Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1 auftritt.

#### 4.8.2 DNA-Schäden führen zur Hyperphosphorylierung von Cdc123

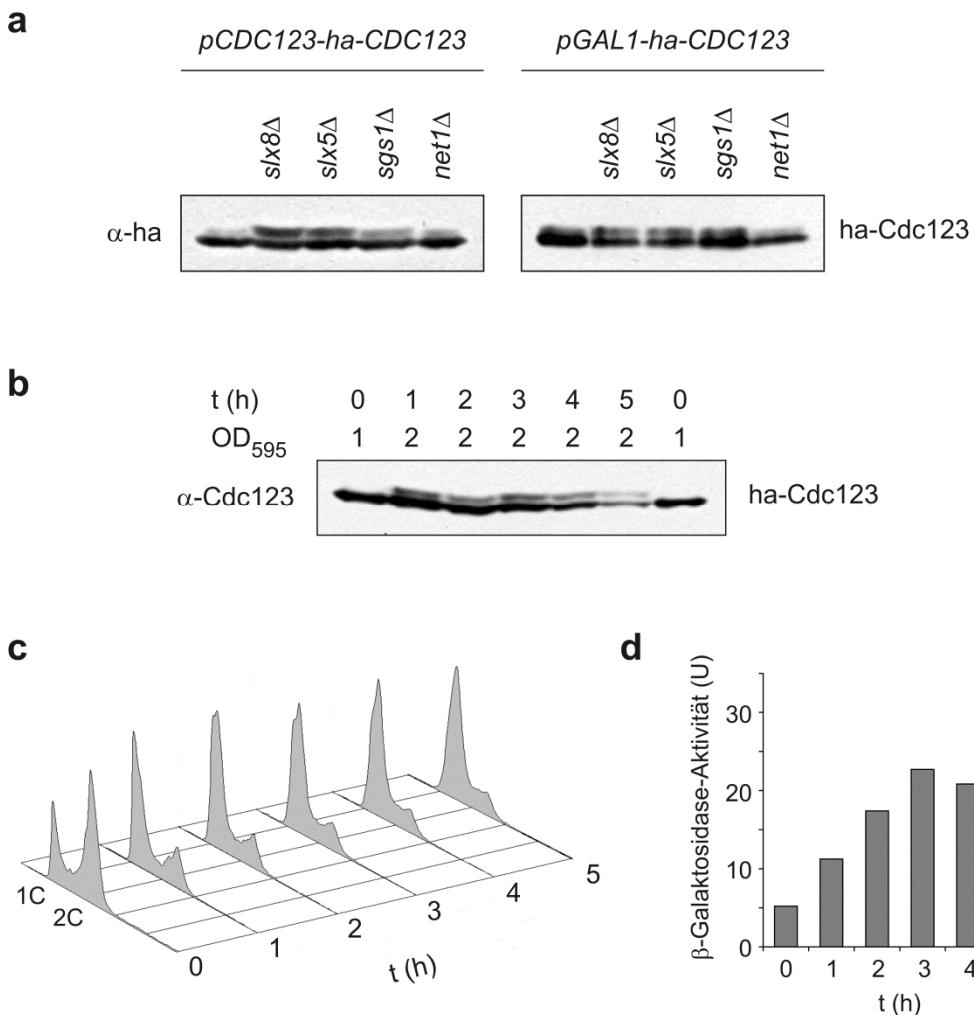
In unserer Arbeitsgruppe wurde die Auswirkung der Deletion von *SLX8* auf die Expression des *GAL1*-Promotors untersucht, wofür zufälligerweise ein *pGAL1-ha3-CDC123*-Konstrukt verwendet wurde. Dabei fiel auf, dass bei Lysaten des *slx8Δ*-Stammes im Western Blot eine Doppelbande von ha-Cdc123 auftritt (M. Schwab, unpublizierte Daten), was auf eine mögliche Phosphorylierung von ha-Cdc123 in diesem Stamm hindeutet. Slx8 bildet einen Komplex mit Slx5 und beide Faktoren wurden ursprünglich anhand der synthetischen Letalität ihrer Deletion mit der Deletion von *SGS1* identifiziert (Mullen et al., 2001). Sowohl Slx8 und Slx5, als auch Sgs1 sind wichtig für die Stabilität des Genoms. Sgs1 ist eine RecQ-Helikase, welche an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Homologe Rekombination und an der Wiederaufnahme der Replikation bei blockierten oder kollabierten Replikationsgabeln beteiligt ist (Rouse, 2009). Der Slx5-Slx8-Komplex ist eine E3-Ubiquitin-Ligase vom RING-Finger-Typ, welche SUMOylierte Proteine ubiquitiniert. Vermutlich ist die Slx5-Untereinheit für die Substraterkennung und die Slx8-Untereinheit für die Ubiquitinierung zuständig. Slx5 und Slx8 sind essentiell für das Überleben von Zellen in Anwesenheit von Agenzien,

welche die DNA-Replikation verlangsamen, z.B. Hydroxyurea. Das Anhalten von Replikationsgabeln führt ebenso wie DNA-Schäden zur SUMOylierung von Komponenten der Homologen Rekombination. Möglicherweise ist die Ubiquitinierung durch Slx5-Slx8 wichtig für den Abbau dieser Proteine, welcher entweder weitere Schritte oder die Beendigung der Homologen Rekombination ermöglicht (Rouse, 2009).

Der Einfluss der Deletion von *SLX8*, *SLX5* oder *SGS1* auf das Laufverhalten von ha-Cdc123 im Western Blot wurde sowohl bei Expression von *ha-CDC123* vom *GAL1*-Promotor als auch bei Expression vom *CDC123*-Promotor überprüft (Abb. 4.23a). Es zeigte sich, dass die drei Deletionen zu einer Doppelbande von ha-Cdc123 führen und zwar unabhängig davon, von welchem Promotor *ha-CDC123* exprimiert wurde. Da die Deletion von *SLX8*, *SLX5* und *SGS1* auch zu einem langsameren Wachstum der Stämme führt, wurde als Kontrolle ein sehr langsam wachsender *net1Δ*-Stamm untersucht. Bei diesem war jedoch keine deutliche Doppelbande von ha-Cdc123 sichtbar, was gegen eine generelle Auswirkung von langsamem Wachstum auf ha-Cdc123 spricht. Vielmehr könnte die Doppelbande von ha-Cdc123 in den *slx8Δ*-, *slx5Δ*- und *sgs1Δ*-Stämmen durch DNA-Schäden und die damit verbundene Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und Zellzyklus-Checkpoints ausgelöst werden.

Um dies zu überprüfen, wurde das Laufverhalten von ha-Cdc123 nach Behandlung der Hefen mit Methylmethansulfonat (MMS) untersucht. MMS führt zur Methylierung von DNA-Basen und N3-Methyladenin blockiert die DNA-Replikation (Lee et al., 2007; Rouse, 2009). Dadurch kommt es bei MMS-Behandlung zur Aktivierung des Intra-S-Kontrollpunkts durch blockierte Replikationsgabeln (Segurado und Tercero, 2009). Die RecQ-Helikase Sgs1 ist gemeinsam mit der Topoisomerase Top3 an der Auflösung von Hemicatenan-ähnlichen Strukturen, die während der fehlerfreien Fortsetzung der DNA-Replikation durch Template Switching auftreten, beteiligt (Branzei und Foiani, 2010). Möglicherweise spielt Sgs1 auch eine Rolle bei der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und dem Arrest in der S-Phase (Fu et al., 2008).

In der Tat führte die Zugabe von MMS ebenfalls zum Auftreten einer Doppelbande von ha-Cdc123 (Abb. 4.23b). Dies ging einher mit einem Zellzyklusarrest in der G1- und frühen S-Phase (Abb. 4.23c) und einem Anstieg der *GCN4-lacZ*-Expression (Abb. 4.23d), was eine Verringerung der ternären Komplexe nahelegt.



**Abbildung 4.23:** Die Mobilität von ha-Cdc123 wird durch Deletionen, welche die Genomstabilität beeinträchtigen, und Behandlung mit MMS beeinflusst.

**a**, Die Stämme W7569, W7684 (*sly8Δ::kanMX4*), W7686 (*sly5Δ::kanMX4*), W7688 (*sgs1Δ::kanMX4*) und W7697 (*net1Δ::HIS3MX6*), welche das Konstrukt *leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2* enthalten, wurden in XYD bei 30°C kultiviert. Die Stämme W6098, W7678 (*sly8Δ::kanMX4*), W7680 (*sly5Δ::kanMX4*), W7682 (*sgs1Δ::kanMX4*) und W7694 (*net1Δ::HIS3MX6*), welche das Konstrukt *leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2* enthalten, wurden in XYL bei 30°C kultiviert und der *GAL1*-Promotor für 3 h mit 2% Galaktose induziert. Für die Western-Blot-Analyse der Proteinlysate wurde 12CA5-Antikörper verwendet.

**b-d**, W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert und in SD-U bei 25°C kultiviert. Nach Zugabe von 0,05% MMS wurden Proben im Abstand von einer Stunde genommen. ha-Cdc123 wurde in den Proteinlysaten mittels Western Blot mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Cdc123 detektiert (**b**). Die Zellzyklusprogression wurde durch Durchflusszytometrie von Sytox Green-gefärbten Proben verfolgt (**c**). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde durch einen ONPG-Test bestimmt (**d**).

Für eine eingehende Untersuchung wurde der Stamm W6194 (*cdc123Δ leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) für 3 h mit MMS behandelt. Eine Phosphatase-Behandlung von immunpräzipitiertem ha-Cdc123 zeigte, dass es sich bei der Doppelbande um zwei verschiedene Phosphoformen von ha-Cdc123 handelt (Abb. 4.24a). Die Aktivität des *GCN4-lacZ*-Reporters war bei MMS-Behandlung etwa fünfmal so hoch wie in der Kontrolle (Abb. 4.24b). In der Durchflusszytometrie zeigte sich ein Arrest der Zellen in der frühen S-Phase (Abb. 4.24d), sowie eine Zunahme des Vorwärtsstreuulichts (Forward Scatter, FSC, Abb. 4.24c), was für eine Zunahme der Zellgröße spricht. Um den Zellzyklusarrest eingehender zu charakterisieren, wurden Knospung und Kernteilung am Mikroskop analysiert (Abb. 4.24e). Die Behandlung mit MMS beeinträchtigt nicht die Ausbildung einer Knospe, der Anteil an knospenden Zellen nimmt sogar zu. Im Gegensatz dazu ist die Kernteilung bei MMS-Behandlung stark beeinträchtigt: Während der Anteil an Zellen mit Knospe und ungetrenntem Kern stark zunimmt, sind die Anteile an Zellen mit Knospe und elongierten oder getrennten Kernen stark reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nicht in der G1-Phase arretieren, da sie in diesem Fall keine Knospen ausbilden würden. Vielmehr scheint erst nach Beginn der S-Phase ein Arrest der DNA-Synthese und des Zellzyklus einzutreten, wenn die DNA-Polymerasen auf die DNA-Schäden treffen und daraufhin die blockierten Replikationsgabeln zur Aktivierung des Intra-S-Kontrollpunkts führen (Segurado und Tercero, 2009).

Die bisherigen Daten führten zu der Hypothese, dass DNA-Läsionen zur Aktivierung einer Kinase führen, welche Cdc123 phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dies dient zur Verminderung der globalen Translationsinitiation und damit der Proteinsynthese, solange der Zellzyklus zur Reparatur der DNA-Schäden arretiert ist. Es wäre auch denkbar, dass neben Gcn4 weitere Proteine über regulatorische Sequenzen in ihren mRNAs verstärkt translatiert werden und dass diese Proteine die DNA-Reparatur oder den Zellzyklusarrest unterstützen.

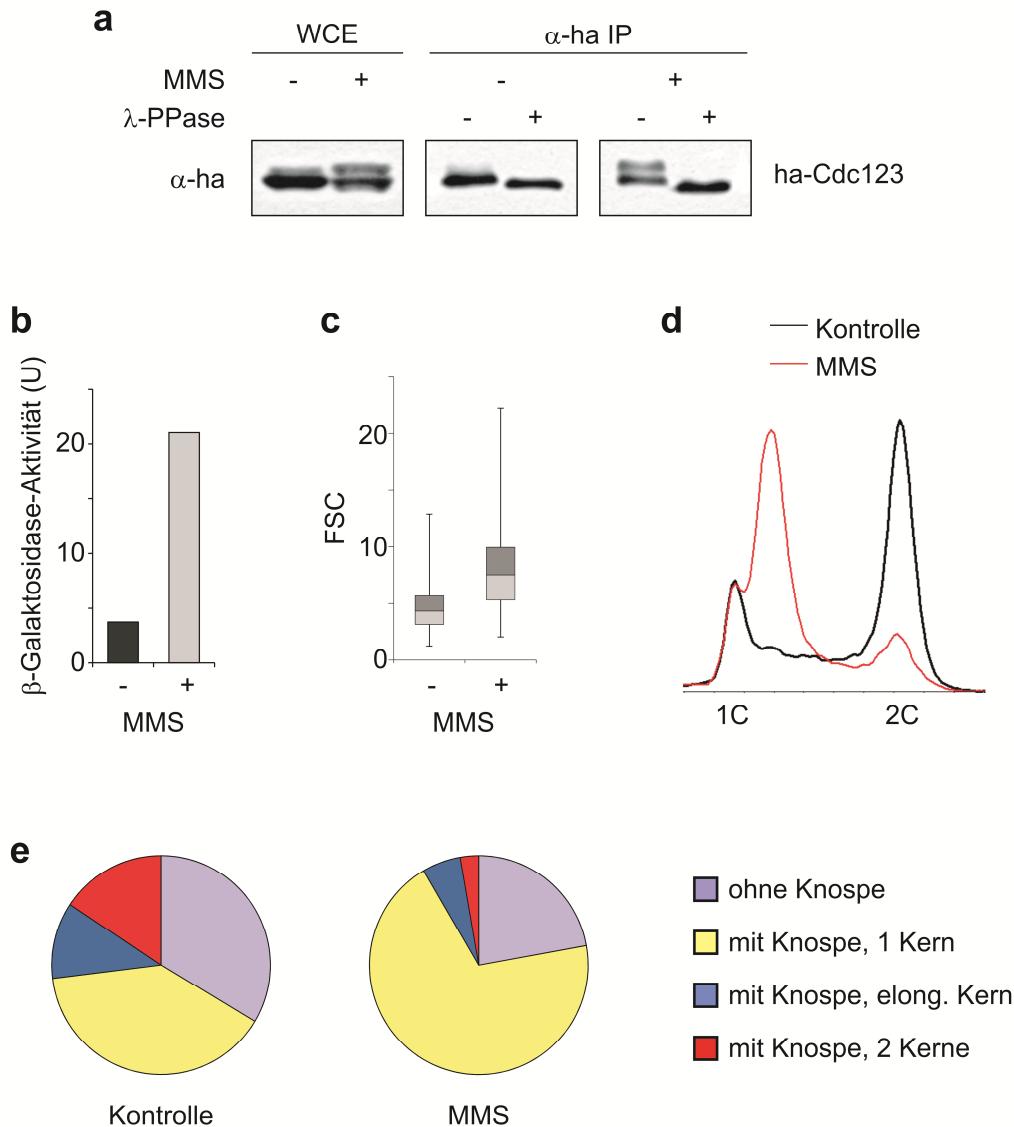
Um die Hypothese, dass DNA-Schäden sich über Cdc123 auf die Translationsinitiation auswirken, zu überprüfen, wurde der Einfluss der Deletion von *CDC123* bei MMS-Behandlung untersucht. Nachdem die Deletion von *CDC123* letal ist, wurde ein Suppressorstamm verwendet, welcher *GCD11* und *SUI2* überexprimiert. Da der Anstieg der *GCN4*-Expression andererseits auch über den bekannten Regulationsweg der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  vermittelt werden könnte, wurden ein *gcn2Δ*-Stamm, bei welchem die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  nicht stattfinden kann, und ein *gcn3Δ*-Stamm, dessen eIF2B-Komplex durch phosphoryliertes eIF2 nicht inhibiert wird, analysiert. Da die bisherigen Versuche alle mit ha-Cdc123 durchgeführt wurden und ein Einfluss des N-terminalen ha-Epitops auf die Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden außerdem ein Wildtyp und ein Stamm mit C-terminal ha-markiertem Cdc123 getestet. Bei Vertebraten phosphoryliert ATM, eine Kinase, die durch DNA-Schäden aktiviert wird und homolog zu Tel1 in *S. cerevisiae* ist, die

Histonvariante H2AX an einem Serin in der Sequenz SQEY (Reinhardt und Yaffe, 2009). In *Saccharomyces cerevisiae* liegt am N-Terminus von Cdc123 ein solches Motiv (3SQEY) vor, weshalb zusätzlich ein Stamm untersucht wurde, bei welchem die Serine 2 und 3 fehlen (ha-Cdc123(4-360), vgl. 4.4.1).

Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Deletion von *CDC123* den Anstieg der *GCN4*-Expression bei MMS-Behandlung nicht verhindert (Abb. 4.25b). Im Gegensatz dazu reprimierte die Deletion von *GCN2* oder *GCN3* den Anstieg der *GCN4*-Expression. Dies lässt den Schluss zu, dass die beobachtete Zunahme der *GCN4*-Expression nach MMS-Behandlung auf eine Aktivierung von Gcn2 und die damit verbundene Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  zurückzuführen ist. Die Untersuchung verschiedener Cdc123-Varianten im Western Blot ergab, dass nur bei Anwesenheit eines N-terminalen ha-Epitops und der Serine 2 und 3 eine hyperphosphorylierte Form nach MMS-Behandlung nachweisbar war (Abb. 4.25a). Die naheliegendste Erklärung ist, dass das ha-Epitop zur Exposition des N-terminalen Cdc123-Fragments führt, woraufhin bei MMS-Behandlung eine Phosphorylierung an Serin 2 und/oder 3 stattfindet. Es ist jedoch auch möglich, dass die Phosphorylierung von Cdc123 nach MMS-Behandlung an einer anderen Stelle stattfindet, aber nur in Kombination mit weiteren Phosphorylierungen, welche vom N-terminalen ha-Epitop und den Serinen 2 und 3 abhängen, zu einem sichtbaren Shift in Gelelektrophorese und Western Blot führt. Die Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 war unabhängig von der Deletion von *GCN2* oder *GCN3*, was bedeutet, dass sie keine Folge der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ist.

Bei Cdc123 ohne Epitop hatte die MMS-Behandlung keine Auswirkung, bei Cdc123-ha und ha-Cdc123(4-360) führte die MMS-Behandlung zu einer Abnahme der Proteinmenge, aber nicht zum Auftreten einer zweiten Bande. Die Gründe für diese Unterschiede sind unklar; möglicherweise verursacht die Epitopmarkierung von Cdc123 eine Verringerung der Stabilität, welche jedoch erst unter ungünstigen Bedingungen (MMS-Behandlung) zu einer deutlichen Abnahme der Proteinmenge führt. Im Vergleich mit den *GCN4-lacZ*-Reportermessungen ergab sich keine Korrelation zwischen den Auswirkungen der MMS-Behandlung auf die *GCN4*-Expression einerseits und auf Menge und Hyperphosphorylierung von Cdc123 andererseits.

Im Gegensatz zur eingangs aufgestellten Hypothese ist der Anstieg der *GCN4*-Expression bei MMS-Behandlung keine Folge der Hyperphosphorylierung von (ha-)Cdc123, sondern wird über die eIF2 $\alpha$ -Kinase Gcn2 vermittelt. Die physiologische Relevanz der Hyperphosphorylierung von (ha-)Cdc123 ist unklar. Für den Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase spielt weder die Hyperphosphorylierung von Cdc123 noch die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung eine Rolle (Abb. 4.25c). Auch beim Wachstum auf Platten mit verschiedenen MMS-Konzentrationen waren keine Unterschiede zwischen den Stämmen erkennbar (Anhang 9.2.7).



**Abbildung 4.24: Die Behandlung von Zellen mit MMS führt zur Phosphorylierung von ha-Cdc123 und zum Arrest in der S-Phase.**

W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert und in XYD bei 25°C kultiviert. Die Kultur wurde auf zwei Kolben verteilt, zu einer der beiden Kulturen wurde 0,05% MMS zugegeben und beide Kolben wurden für weitere 3 h bei 25°C inkubiert.

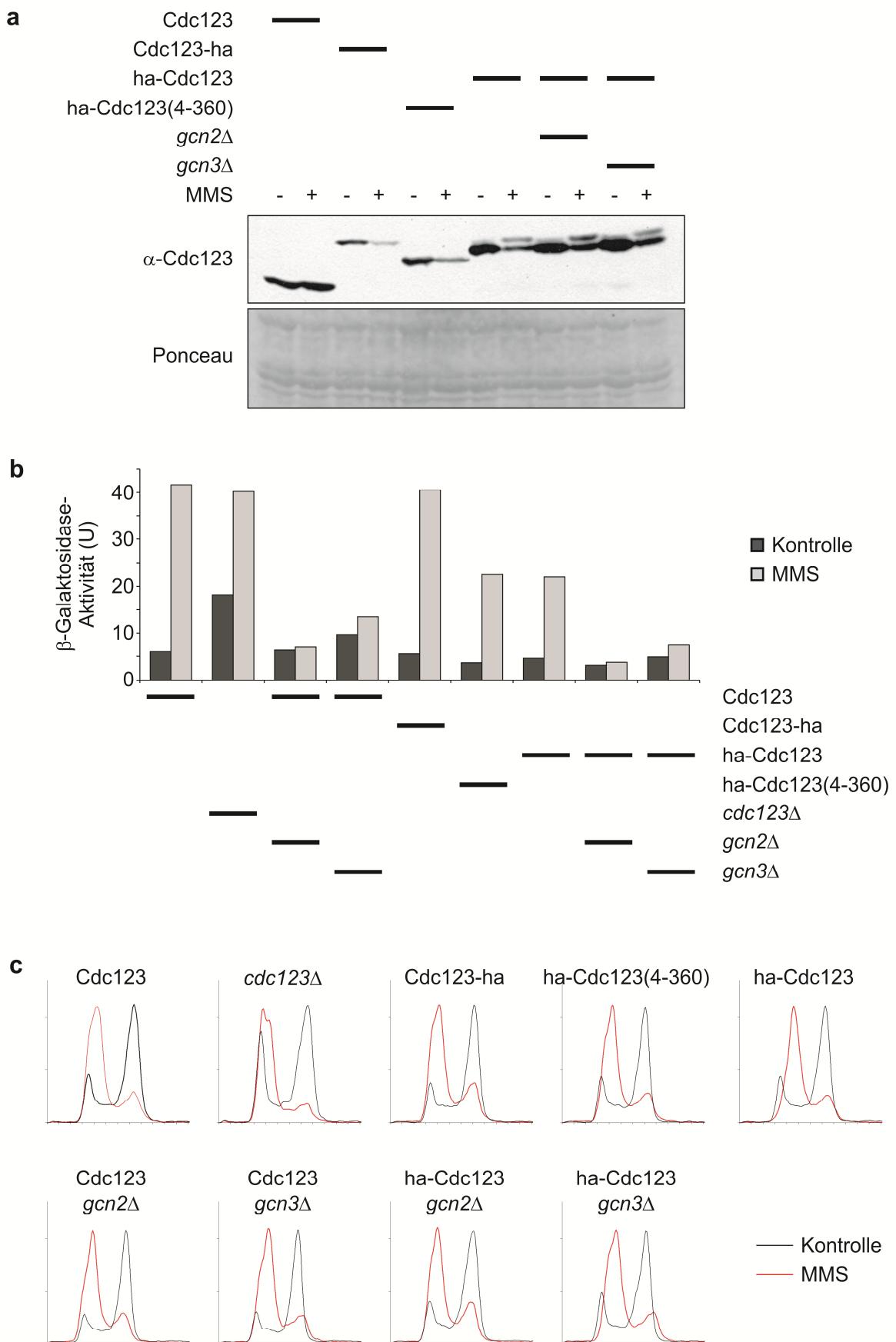
**a**, Aus den Proteinlysaten wurde ha-Cdc123 mit 12CA5-Antikörper präzipitiert und eine Hälfte des Präzipitats mit  $\lambda$ -Phosphatase behandelt. Für die Western-Blot-Analyse von Lysaten und Präzipitaten wurde 12CA5-Antikörper verwendet.

**b**, Mittels ONPG-Test wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

**c**, Der Forward Scatter der Zellen wurde am Durchflusszytometer gemessen und als Box-Plot dargestellt.

**d**, Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden mit Sytox Green-gefärbte Proben im Durchflusszytometer gemessen.

**e**, Zur Verfolgung von Knospung und Kernteilung wurden die Zellen mit DAPI gefärbt und 400 Zellen je Probe am Mikroskop ausgezählt.



**Abbildung 4.25:** Rolle von Gcn2, Gcn3 und verschiedenen Cdc123-Varianten bei MMS-Behandlung  
(Erläuterung s. nächste Seite)

**Abbildung 4.25: Rolle von Gcn2, Gcn3 und verschiedenen Cdc123-Varianten bei MMS-Behandlung**

(Abbildung s. vorige Seite)

**a,** Die Stämme K699 (WT), W5482 (*CDC123-ha3-HIS3MX6*), W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W7506 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*), W8788 (*gcn2Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*) und W8792 (*gcn3Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert, auf je zwei Ansätze verteilt, zu einem Ansatz 0,05% MMS zugegeben und beide Ansätze für 3 h bei 25°C inkubiert. Die Cdc123-Varianten wurden in den Proteinlysaten mittels Western Blot mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Cdc123 analysiert.

**b-c,** Die Stämme aus Teil **a** sowie W7328 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*), W8765 (*gcn2Δ::natNT2*) und W8766 (*gcn3Δ::natNT2*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert. Die Kultur und MMS-Behandlung erfolgte wie in Teil **a**. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde mittels ONPG-Test bestimmt (**b**) und die Zellzyklusprogression wurde durch Durchflusszytometrie von Sytox Green-gefärbten Proben verfolgt (**c**).

## 4.9 Die Rolle von eIF2 und Cdc123 bei Verschlechterung des Nährstoffangebots

eIF2 steht im Mittelpunkt eines der am besten untersuchten Regulationswege der Translationsinitiation (vgl. 3.2.3.1): Bei Aminosäuremangel führt die Akkumulation von unbeladener tRNA zur Aktivierung der Kinase Gcn2, welche die α-Untereinheit von eIF2 (Sui2) phosphoryliert. Dies inhibiert den Nukleotidaustausch durch eIF2B, wodurch die Konzentration an ternären Komplexen sinkt. In Folge dessen sinkt die globale Translationsinitiationsrate, während die Translation spezifischer mRNAs, z.B. von *GCN4*, gefördert wird.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die von Cdc123 stimulierte Assemblierung des trimeren eIF2-Komplexes eine Rolle bei der Regulation der Translationsinitiation spielt – sei es durch Modulation des Gcn2-abhängigen Regulationsweges oder sei es als eigenständiger Mechanismus zur Regulation von eIF2. Frank Richter untersuchte in seiner Doktorarbeit die Rolle von Cdc123 bei Rapamycin-Behandlung. Rapamycin führt über Inhibition der TOR-Signalwege zur Aktivierung von Gcn2. Bei eingeschränkter Cdc123-Funktion durch das *cdc123Δ327*-Allel steigt die Menge an phosphoryliertem Sui2 langsamer an als bei einem Wildtyp-Stamm, erreicht aber schließlich ein ähnliches Niveau, das auch zu einer vergleichbaren Gcn4-Expression führt (Richter, 2006).

#### 4.9.1 Die Relokalisation von eIF2 bei Aminosäuremangel ist bei *cdc123Δ327* beeinträchtigt

Neuere Studien zeigen, dass eIF2 und eIF2B nicht homogen im Cytoplasma verteilt sind, sondern gemeinsam in punkt- oder strichförmigen Foci lokalisieren (Campbell et al., 2005; Noree et al., 2010). Im Fall von eIF2 wird die Foci-Lokalisation durch Aminosäuremangel stimuliert (Campbell et al., 2005). In unserer Arbeitsgruppe war Sui2-GFP bei der Mikroskopie von Zellen auf SD-Agar mit Aminosäuren (SD++) im Cytoplasma verteilt und es waren keine Foci sichtbar (Abb. 4.26). Wurde der Versuch jedoch auf Agar ohne Aminosäuren (SD-aa) durchgeführt, traten innerhalb weniger Minuten Foci auf. Diese bewegten sich in der Zelle und in vielen Fällen waren erst mehrere kleine Foci in einer Zelle sichtbar, welche sich schließlich vereinigten (Abb. 4.26). Das Auftreten der Sui2-Foci bei Aminosäuremangel war abhängig von Gcn2 (Abb. 4.26) und Gcn3 (Daten nicht gezeigt). Diese Daten sprechen dafür, dass die Lokalisation von Sui2 in den Foci eine Folge der Phosphorylierung von Sui2 und der verstärkten Interaktion mit eIF2B in inaktiven Komplexen ist.

Die Untersuchung eines Stammes mit dem *cdc123Δ327*-Allel zeigte, dass Cdc123-Defekte die Bildung der Sui2-Foci beeinträchtigen (Abb. 4.26): Die Sui2-Foci traten im Vergleich zum *CDC123*-Wildtypstamm später und in deutlich weniger Zellen auf.

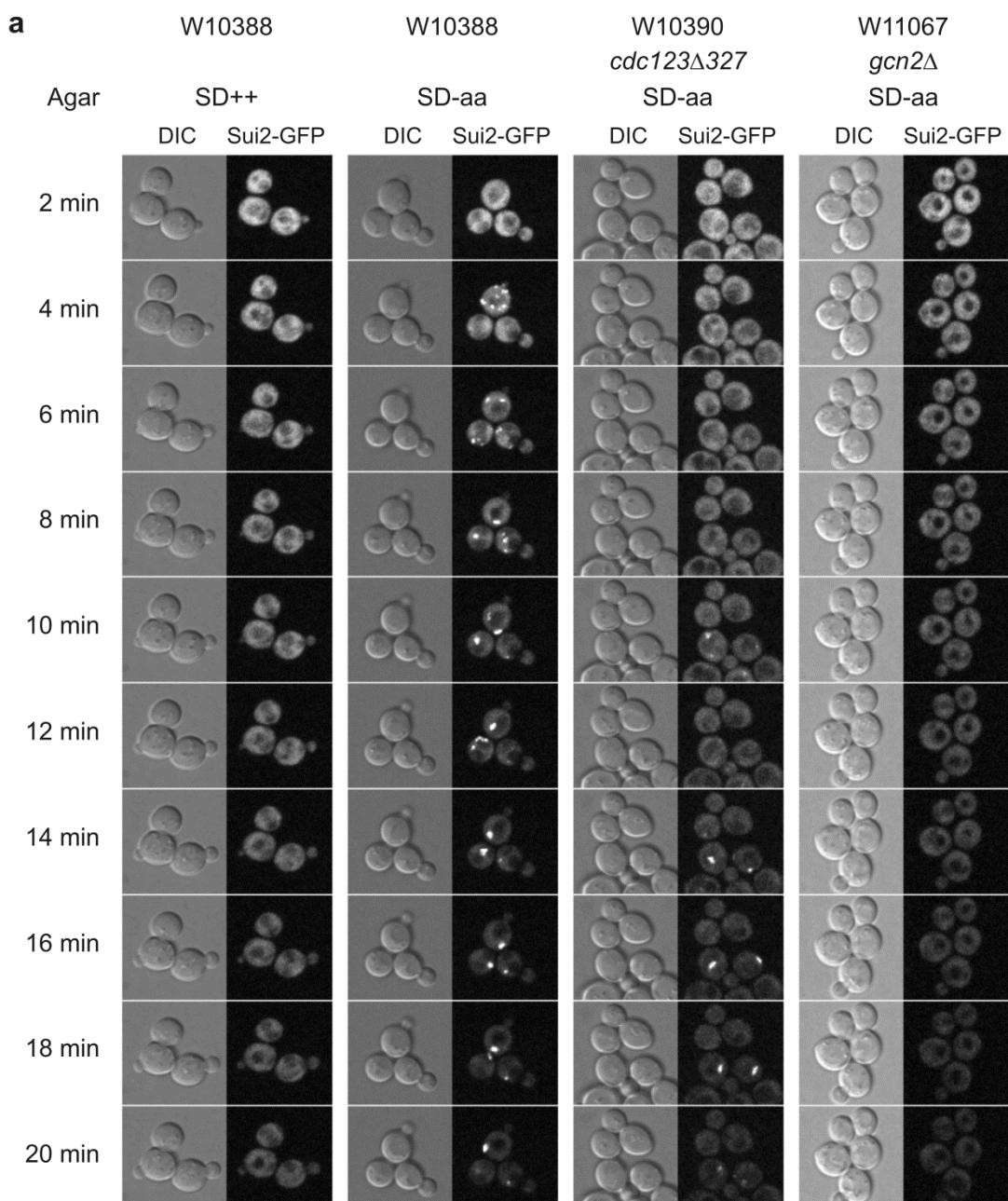
Um zu untersuchen, ob die verringerte Sui2-Foci-Bildung bei *cdc123Δ327* auf eine verlangsamte Sui2-Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurde die Sui2-Phosphorylierung im Western Blot überprüft (Abb. 4.27). Dazu wurden ein Wildtyp und ein *cdc123Δ327*-Stamm aus SD-Medium mit Aminosäuren (SD++) in SD-Medium ohne Aminosäuren (SD-aa) überführt und die Sui2-Phosphorylierung über 30 Minuten verfolgt. Wie erwartet, ist die Phosphorylierung von Sui2 in SD++ gering und steigt nach Überführen in SD-aa schnell an. Bei Vorliegen des *cdc123Δ327*-Allels ist die Sui2-Phosphorylierung in SD++ verringert, steigt aber in SD-aa rasch an und erreicht spätestens nach 10 Minuten ein ähnliches Niveau wie beim Wildtyp. Bei den späteren Zeitwerten ist die Sui2-Phosphorylierung möglicherweise sogar höher als beim Wildtyp. Die Phosphorylierung von Sui2 bei Aminosäuremangel ist also durch *cdc123Δ327* nicht wesentlich beeinträchtigt. Vielmehr ist anzunehmen, dass die verringerte Menge an eIF2-Komplexen in *cdc123Δ327* und damit auch die verringerte Interaktion von eIF2 mit eIF2B (vgl. 4.3.3) die Ursache für die beobachtete reduzierte Sui2-Foci-Bildung ist.

**Abbildung 4.26: *cdc123Δ327* und *gcn2Δ* beeinträchtigen die Bildung von eIF2-Foci bei Aminosäuremangel.**  
(Abbildung siehe nächste Seite)

Die Stämme W10388 (*SUI2-GFP-TRP1*), W10390 (*cdc123Δ327-ha3-natMX4 SUI2-GFP-TRP1*) und W11067 (*gcn2Δ::natNT2 SUI2-GFP-TRP1*) wurden in SD++ bei 25°C kultiviert. Die Zellen wurden in SD-Medium mit Aminosäuren (SD++) oder ohne Aminosäuren (SD-aa) umgesetzt und auf entsprechendem Agar mikroskopiert.

**a,** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min am Mikroskop verfolgt. Die erste Aufnahme erfolgte 2 min nach dem Umsetzen der Zellen, weitere Bilder wurden im Abstand von 1 min aufgenommen.

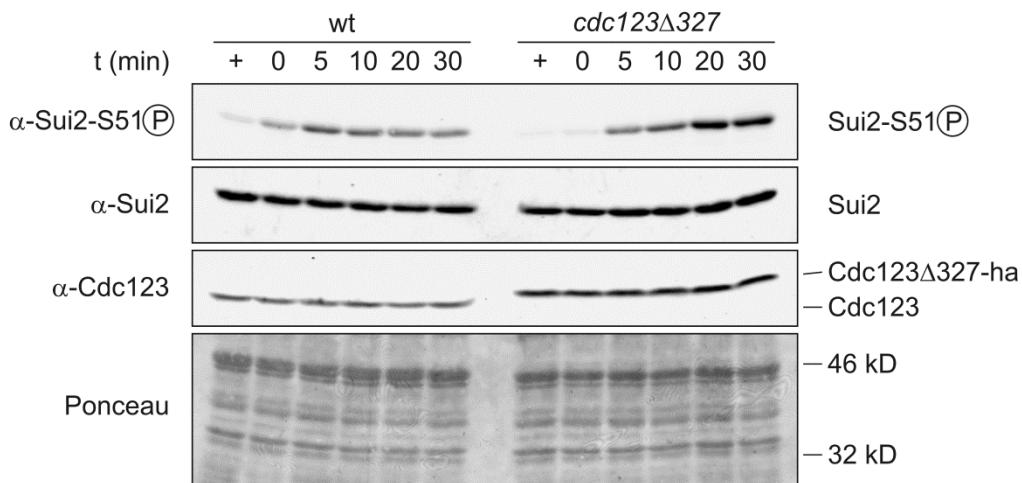
**b,** Nach 20 min wurde die Zahl der Zellen insgesamt und die Zahl der Zellen mit Foci bestimmt.



**b**

	W10388 SD++	W10388 SD-aa	W10390 <i>cdc123Δ327</i> SD-aa	W11067 <i>gcn2Δ</i> SD-aa
ausgezählte Zellen	108	132	156	112
davon mit Foci	0	110	25	0
Anteil mit Foci	0 %	83 %	16 %	0 %

**Abbildung 4.26: *cdc123Δ327* und *gcn2Δ* beeinträchtigen die Bildung von eIF2-Foci bei Aminosäuremangel.**  
(Erläuterung siehe vorige Seite)



**Abbildung 4.27: *cdc123Δ327* verringert die basale Phosphorylierung von Sui2, aber nicht den Anstieg der Phosphorylierung bei Aminosäuremangel.**

K699 (WT) und W10180 (*cdc123Δ327-ha3-natMX4*) wurden in SD++ bei 25°C kultiviert. Nach der Entnahme der ersten Probe (+) wurden die restlichen Zellen in SD-aa umgesetzt und zu den angegebenen Zeiten Proben genommen. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert, wofür ein phospezifischer Sui2-Antikörper, Sui2-Antiserum und affinitätsgereinigtes Cdc123-Antiserum verwendet wurden. Neben dem Ausschnitt der Ponceau-gefärbten Membran ist die Lage der Standardbanden angegeben.

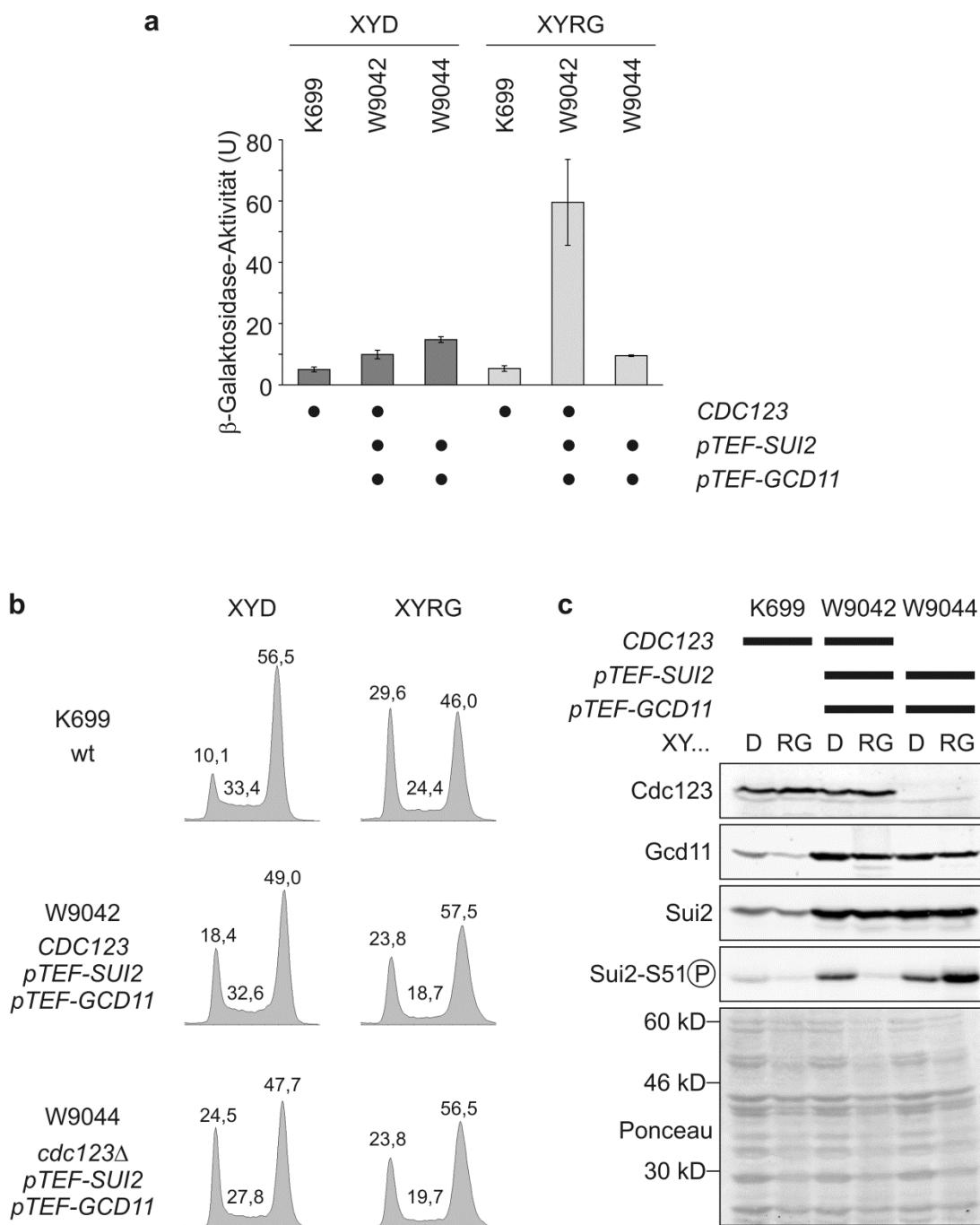
#### 4.9.2 Die Manipulation der eIF2-Menge beeinträchtigt das Wachstum abhängig von der Kohlenstoffquelle

Glukose ist die bevorzugte Kohlenstoffquelle von *Saccharomyces cerevisiae* und mehrere Signalwege regeln Genexpression und Metabolismus in Abhängigkeit von der Glukose-Verfügbarkeit (Santangelo, 2006; Zaman et al., 2008). Steht nicht Glukose, sondern Galaktose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, führt dies zu einem Anstieg der eIF2α-Phosphorylierung, welche jedoch nicht durch Aktivierung von Gcn2, sondern durch Inhibition der Phosphatasen Glc7 (PP1α) und Sit4 (PP2A) vermittelt wird (Cherkasova et al., 2010).

Bei der Untersuchung der *GCN4*-Expression in Stämmen mit veränderten Mengen an eIF2-Untereinheiten und Cdc123 zeigte sich unerwarteterweise ein starker Einfluss der Kohlenstoffquelle (Abb. 4.28a): In Glukosemedium (XYD) entsprach die Expression des *GCN4-lacZ*-Reporters den Erwartungen. In einem *cdc123Δ*-Stamm, welcher durch Überexpression von *GCD11* und *SUI2* gerettet wurde (W9044), war die *GCN4*-Expression dereprimiert (Gcd<sup>-</sup>-Phänotyp) und etwa dreimal so hoch wie beim Wildtyp. Die Überexpression von *GCD11* und *SUI2* in Anwesenheit von Cdc123 (W9042) führte zu einem leichten Anstieg der *GCN4*-Expression. In Medium mit Raffinose und Galaktose als Kohlenstoffquellen (XYRG) zeigte sich ein ganz anderes Bild. Beim Wildtyp war die *GCN4*-Expression in XYRG ähnlich hoch wie in XYD, es ist also kein Einfluss des Mediums erkennbar. Der *cdc123Δ*-Stamm (W9044) hatte im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte *GCN4*-Expression, allerdings war der

Anstieg in XYRG geringer als in XYD. Die Überexpression von *GCD11* und *SUI2* in Anwesenheit von Cdc123 (W9042) verursachte hingegen in XYRG einen sehr starken Anstieg der Expression des *GCN4-lacZ*-Reporters, welche sich in einer Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf mehr als das Zehnfache des Wildtyp-Niveaus widerspiegeln. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Effekt auch bei Medium mit Raffinose oder Galaktose und in geringerem Ausmaß auch bei Saccharose als Kohlenstoffquelle auftrat (Anhang 9.2.8.1). Die Überexpression von entweder *GCD11* oder *SUI2* alleine führte nicht zu einem Anstieg der *GCN4*-Expression in XYRG, sondern nur die Kombination von *GCD11*- und *SUI2*-Überexpression (Anhang 9.2.8.2). Außerdem konnten weder die Überexpression von *SUI3* noch von *CDC123* den Effekt aufheben (Anhang 9.2.8.3).

Für eine eingehendere Analyse wurde als nächstes der Einfluss der Kohlenstoffquellen auf die Zellzyklusprogression der Stämme (Abb. 4.28b) untersucht: In XYD korreliert die *GCN4*-Expression mit dem Anteil der Zellen in der G1-Phase. Beide Parameter zeigen eine Zunahme in der Reihenfolge Wildtyp < W9042 (*CDC123*) < W9044 (*cdc123 $\Delta$* ). In XYRG hingegen hat der Wildtyp zwar die niedrigste *GCN4*-Expression, aber den höchsten Anteil an G1-Zellen. Die beiden anderen Stämme weisen trotz ihrer stark unterschiedlichen *GCN4*-Expression einen ähnlichen Anteil an G1-Zellen auf, der geringer ist als beim Wildtyp. Ein Vergleich der Proteinn Mengen von Cdc123, Gcd11 und Sui2 mittels Western Blot (Abb. 4.28c) zeigte – bei Berücksichtigung der geringeren Menge großer Proteine in den Lysaten aus XYRG-Kulturen, welche in der Ponceau-Färbung erkennbar ist – keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Kohlenstoffquellen. Um zu untersuchen, ob die Assoziation der drei eIF2-Untereinheiten durch die Kohlenstoffquelle beeinflusst wird, wurde Sui3 mit einem flag-Epitop markiert und immunpräzipitiert (Abb. 4.29). Im Vergleich zum Kontrollstamm mit endogenen Mengen an Gcd11, Sui2 und Cdc123 führt die Überexpression von *GCD11* und *SUI2* in Anwesenheit von Cdc123 zu einem geringfügigen Anstieg der Menge an Gcd11 und Sui2, die mit flag-Sui3 co-präzipitiert wird. Im Gegensatz dazu war bei Abwesenheit von Cdc123 (*cdc123 $\Delta$* ) eine geringfügige Abnahme der Interaktion nachweisbar. In beiden Fällen hatte die Kohlenstoffquelle keinen wesentlichen Einfluss auf die Interaktion.



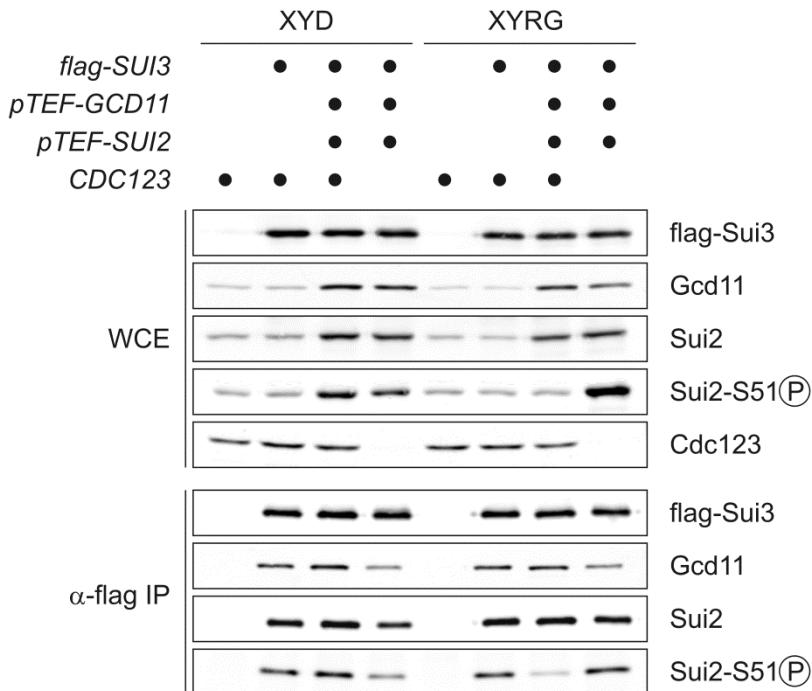
**Abbildung 4.28:** Die Überexpression von *GCD11* und *SUI2* hat unterschiedliche Konsequenzen, abhängig von der Kohlenstoffquelle und dem Vorhandensein von Cdc123.

Die Stämme K699 (WT), W9042 (*leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) und W9044 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) wurden aus einer Vorkultur in XYD geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für ca. 15 h in XYD und XYRG bei 25°C kultiviert.

**a,** Die Stämme wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert und wie beschrieben kultiviert. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde mittels ONPG-Test bestimmt. Die Ergebnisse stellen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Proben dar.

**b,** Das Zellzyklusprofil wurde mit Sytox Green-gefärbten Proben am Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase wurde mit der FloMax-Software quantifiziert und ist in % angegeben.

**c,** Für die Western-Blot-Analyse der Proteinlysate wurden spezifische Antiseren für Gcd11 und Sui2, affinitätsgereinigtes Cdc123-Antiserum und ein phosphospezifischer Sui2-Antikörper verwendet.



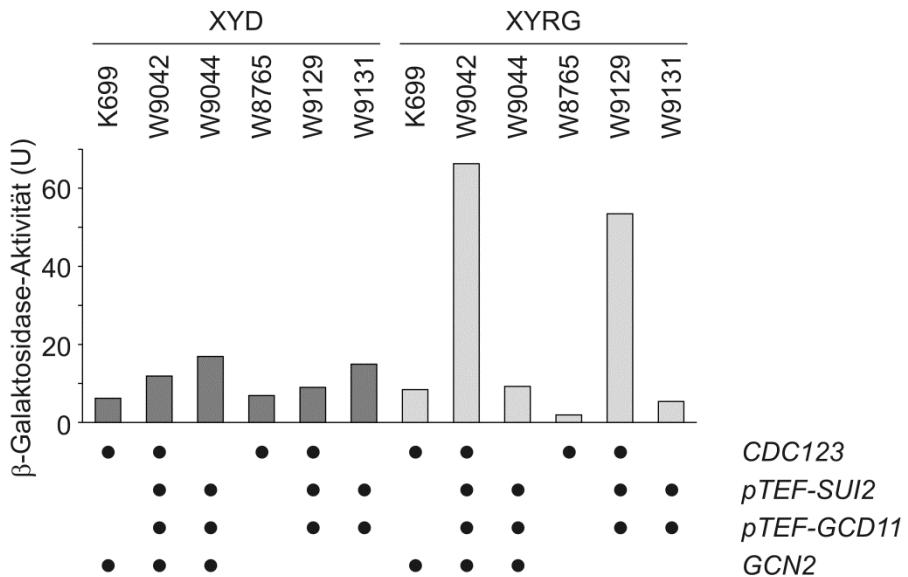
**Abbildung 4.29: Die Zusammensetzung des eIF2-Komplexes in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und den Mengen an Gcd11, Sui2 und Cdc123**

Die Stämme K699 (WT), W10114 (*natMX4-pSUI3-flag3-SUI3*), W10120 (*natMX4-pSUI3-flag3-SUI3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) und W10122 (*natMX4-pSUI3-flag3-SUI3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert, in H<sub>2</sub>O gewaschen, in XYD und XYRG umgesetzt und für ca. 15 h bei 25°C inkubiert. Aus den Proteinlysaten wurde flag-Sui3 mit  $\alpha$ -flag-Antikörper präzipitiert. Zum Nachweis der Proteine im Western Blot dienten  $\alpha$ -flag-Antikörper, Sui2-Antiserum, affinitätsgereinigte Antiseren gegen Cdc123 und Gcd11 sowie ein phosphospezifischer Sui2-Antikörper.

Da die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  (Sui2) zum einen eine zentrale Rolle bei der GCN4-Expression einnimmt (vgl. 3.2.3.1) und zum anderen durch die Kohlenstoffquelle beeinflusst wird (Cherkasova et al., 2010), wurde die Phosphorylierung von Sui2 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers untersucht (Abb. 4.28c und 4.29). In Glukosemedium ist die Menge an phosphoryliertem Sui2 proportional zur Menge an Sui2: Bei Überexpression von *SUI2* (und *GCD11*) nimmt die Menge an phosphoryliertem Sui2 in den Lysaten in ähnlichem Maß zu wie die Gesamt-Sui2-Menge. Bei der Immunpräzipitation von flag-Sui3 wurden unabhängig von der *SUI2*-Überexpression ähnliche Mengen von Sui2 copräzipitiert und ebenso von phosphoryliertem Sui2. Ganz anders stellte sich die Situation in Raffinose/Galaktose-Medium dar: Bei Überexpression von *SUI2* (und *GCD11*) in Anwesenheit von Cdc123 ist das Verhältnis von phosphoryliertem Sui2 zu Gesamt-Sui2 im Lysat stark verringert, während es in Abwesenheit von Cdc123 leicht erhöht ist. Entsprechend verhält sich die Menge an phosphoryliertem Sui2 im flag-Sui3-Präzipitat. Im Gegensatz zum Wildtyp und zum *cdc123Δ*-Stamm ist also bei Überexpression von *GCD11* und *SUI2* in Anwesenheit von Cdc123 die eIF2-

Phosphorylierung in Raffinose/Galaktose-Medium stark verringert. Paradoixerweise geht dies einher mit einer starken Derepression der *GCN4*-Expression.

Zur weiteren Analyse der Rolle der Sui2-Phosphorylierung wurde die *GCN4*-Expression bei Deletion von *GCN2* untersucht (Abb. 4.30). Auch hier zeigte sich, dass die Effekte der Kohlenstoffquelle auf die *GCN4*-Expression unabhängig von Gcn2 und damit von der eIF2-Phosphorylierung sind.



**Abbildung 4.30: Der Anstieg der *GCN4*-Expression in XYRG ist Gcn2-unabhängig.**

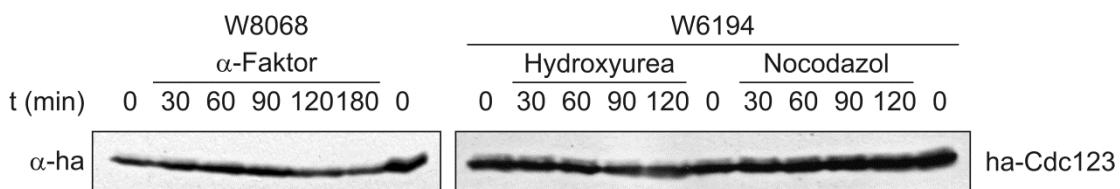
Die Stämme K699 (WT), W8765 (*gcn2Δ::natNT2*), W9042 (*leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*), W9044 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*), W9129 (*gcn2Δ::natNT2 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) und W9131 (*gcn2Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Die Transformanden wurden aus einer Vorkultur in XYD geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für ca. 15 h in XYD und XYRG bei 25°C kultiviert. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde mittels ONPG-Test bestimmt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Überexpression von *SUI2* und *GCD11* bei Anwesenheit von Cdc123 in Raffinose/Galaktose-Medium zur Derepression der *GCN4*-Translation führt, was auf eine Verringerung der Menge an ternären Komplexen hindeutet. Dies ist jedoch weder auf eine verringerte Assoziation der eIF2-Untereinheiten, noch auf eine erhöhte Phosphorylierung von eIF2 zurückzuführen. Im Gegenteil, es kommt unter diesen Bedingungen sogar zu einer verringerten Sui2-Phosphorylierung. Die Ursache dieser Effekte ist unklar, allerdings eröffnen sie die interessante Möglichkeit, dass die Glukoseverfügbarkeit in Hefe die Bildung des ternären Komplexes reguliert (vgl. Diskussion Abschnitt 5.5.2) – mit Parallelen zur Insulin-abhängigen Regulation der eIF2B-Aktivität in Säugern (Cohen und Frame, 2001).

## 4.10 Die Rolle von eIF2 und Cdc123 bei einem Arrest des Zellzyklus

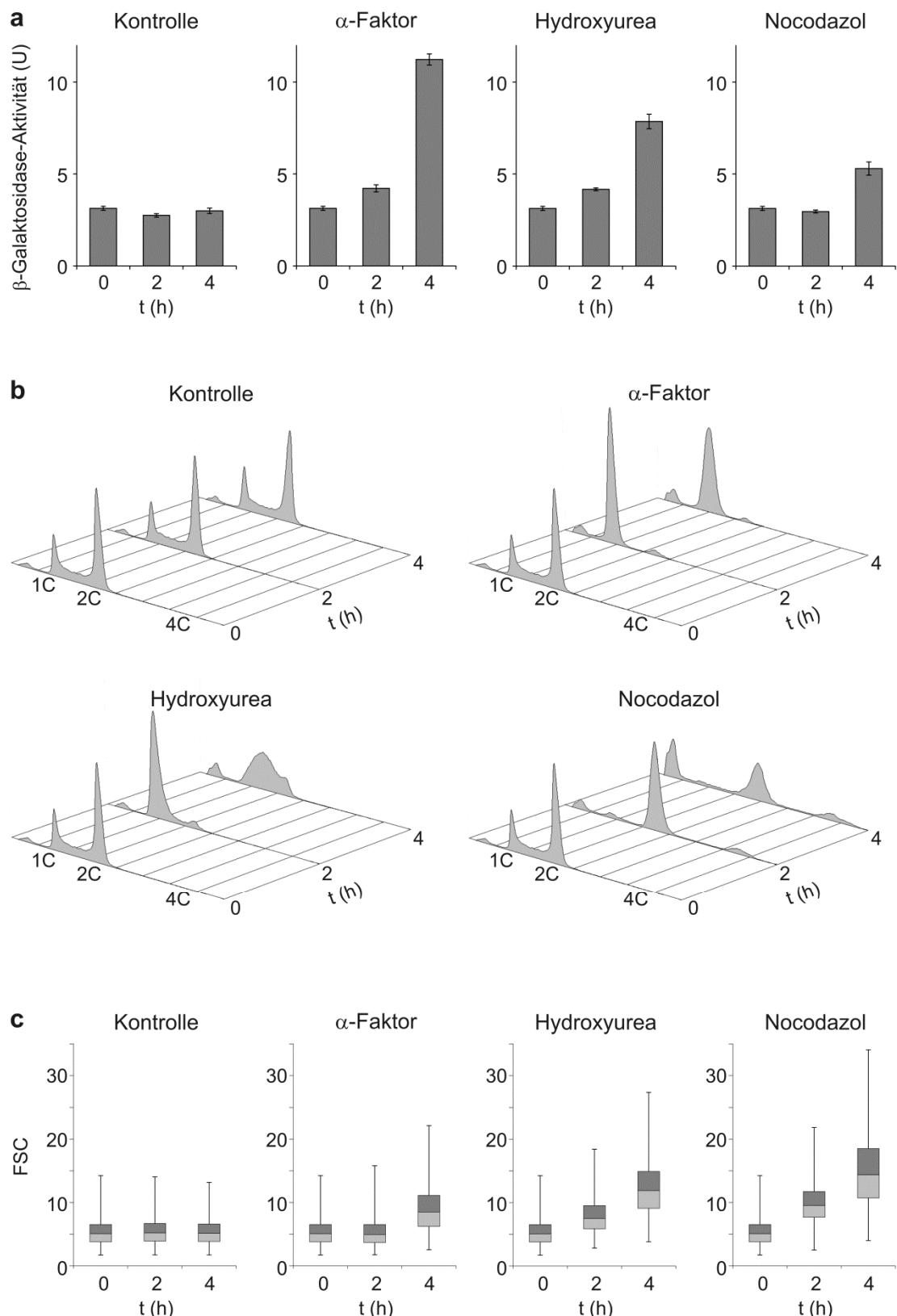
Zur Wahrung einer konstanten Zellgröße muss der Eintritt in den Zellzyklus mit dem Größenwachstum koordiniert werden. In der Tat ist das Überschreiten von START von dem Erreichen einer kritischen Zellgröße abhängig, wobei es Hinweise gibt, dass nicht das Zellvolumen per se, sondern die Translationskapazität entscheidend ist (Rupes, 2002; Jorgensen und Tyers, 2004). So führt eine Beeinträchtigung der Translationsinitiation durch verringerte Cdc123- oder eIF2-Funktion zur Inhibition des G1/S-Übergangs, obwohl die Größe der Zellen zunimmt (vgl. 4.3.1; Richter, 2006; Weinzierl 2011). Umgekehrt wird auch die Translationsinitiation durch die Zellzyklusprogression beeinflusst: So ist in höheren Eukaryoten die cap-abhängige Translationsinitiation während der Mitose inhibiert, woran unter anderem die Bindung von eIF4E durch 4E-BPs beteiligt ist (Pyronnet und Sonenberg, 2001; Van Der Kelen et al., 2009). Um die Homöostase der Zellgröße zu wahren, wäre es plausibel, bei einer Verzögerung oder einem Arrest des Zellzyklus die Proteinsyntheserate zu senken. Deshalb stellte sich die Frage, ob ein Arrest des Zellzyklus Auswirkungen auf Cdc123 oder eIF2 hat.

Im Folgenden wurden drei verschiedene Arrestbedingungen untersucht: Die Behandlung von *MAT<sub>a</sub>*-Stämmen mit α-Faktor führt zu einem Arrest in der G1-Phase (vgl. 3.1.3). Hydroxyurea (HU, auch als Hydroxyharnstoff bezeichnet) hemmt die Ribonukleotidreduktase und führt dadurch zur Beeinträchtigung der DNA-Replikation und einem Arrest des Zellzyklus in der S-Phase. Nocodazol inhibiert die Ausbildung der Spindel und verhindert so den Eintritt in die Mitose. Eine zwei- bis dreistündige Behandlung mit α-Faktor, Hydroxyurea oder Nocodazol hatte keinen Einfluss auf die Menge oder das Laufverhalten von ha-Cdc123 im Western Blot (Abb. 4.31).



**Abbildung 4.31: Einfluss verschiedener Zellzyklusarrests auf die Mobilität von ha-Cdc123**

Die Stämme W8068 (*MAT<sub>a</sub> bar1Δ::HIS3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurden in XYD bei 25°C kultiviert. W8068 wurde durch Zugabe von α-Faktor, W6194 durch Hydroxyurea bzw. Nocodazol arretiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und Proteinlysate hergestellt. Die Western-Blot-Analyse von ha-Cdc123 wurde mit 12CA5-Antikörper durchgeführt.



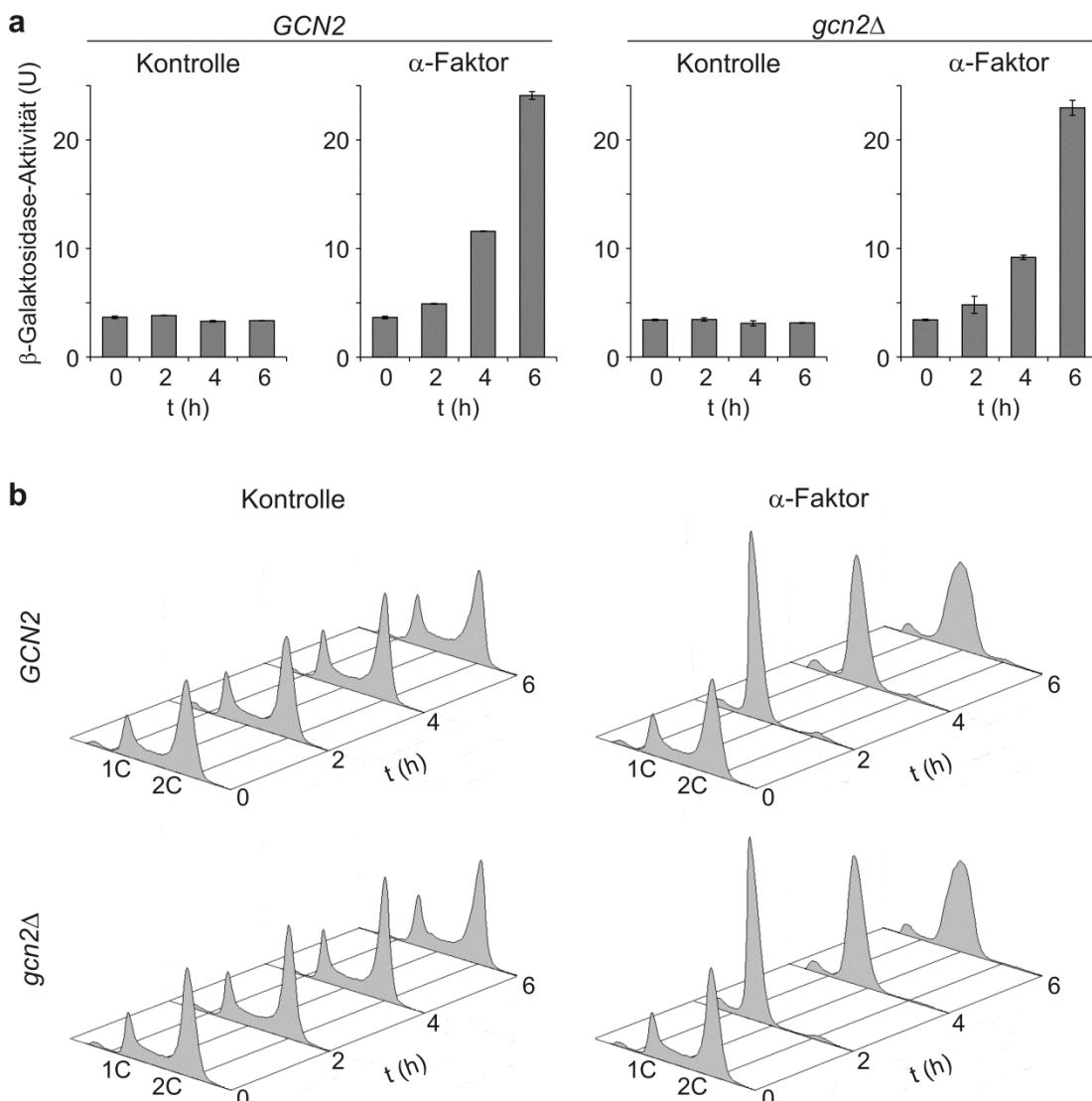
**Abbildung 4.32:** Einfluss verschiedener Zellzyklusarrests auf die GCN4-Expression (Erläuterung s. nächste Seite)

**Abbildung 4.32: Einfluss verschiedener Zellzyklusarrests auf die *GCN4*-Expression** (Abbildung s. vorige Seite)

Der Stamm W8605 (*MATa bar1Δ::LEU2*) wurde mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert. Drei Transformanden wurden in XYD bei 25°C kultiviert und nach Entnahme des 0 h-Wertes auf jeweils 4 Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz diente als Kontrolle, zu den anderen drei Ansätzen wurde  $\alpha$ -Faktor, Hydroxyurea oder Nocodazol zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch einen ONPG-Test bestimmt (a, dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der drei Transformanden). Von einem Transformanden wurden zusätzlich Sytox Green-gefärbte Proben am Durchflusszytometer gemessen und die Zellzyklusprogression (b), sowie die Entwicklung der Zellgröße (c, dargestellt als Box-Plot des Forward Scatters) verfolgt.

Als sensitiver Nachweis der eIF2-Funktionalität wurde die Expression von *GCN4* verwendet (vgl. 3.2.3.1 und 4.1): In der Tat war nach vierstündiger Behandlung mit  $\alpha$ -Faktor ein moderater Anstieg der *GCN4*-Expression nachweisbar (Abb. 4.32a). Auch bei der Behandlung mit Hydroxyurea und Nocodazol kam es zu einem Anstieg der Gcn4- $\beta$ -Gal-Reporteraktivität, welche jedoch geringer ausfiel als bei der  $\alpha$ -Faktor-Exposition. Allerdings ist nach zweistündiger Behandlung mit den drei Agenzien noch kein wesentlicher Anstieg der Gcn4- $\beta$ -Gal-Reporteraktivität nachweisbar, obwohl der Zellzyklusarrest bereits deutlich ausgeprägt ist (Abb. 4.32b). Möglicherweise führt also erst ein prolongierter Zellzyklusarrest zu Effekten auf eIF2 und damit zu einer erhöhten *GCN4*-Expression. Auch trat unter allen drei Arrestbedingungen eine Zunahme der Zellgröße auf, wie die Messung des FSC zeigt (Abb. 4.32c). Dies weist darauf hin, dass der Arrest des Zellzyklus nicht zu einer (vollständigen) Inhibition der Proteinsynthese führt.

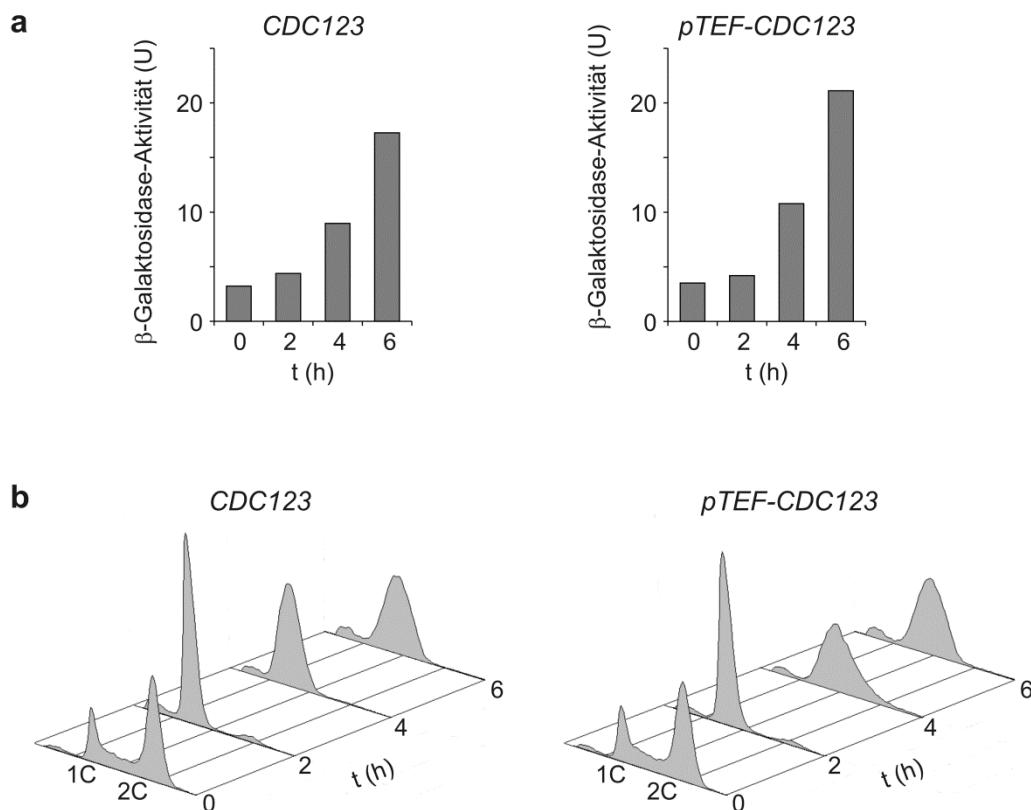
Da der  $\alpha$ -Faktor-Arrest den deutlichsten Anstieg der *GCN4*-Expression zur Folge hatte, wurde er für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Zeitreihe wurde auf sechs Stunden ausgedehnt, was einen weiteren Anstieg der Gcn4- $\beta$ -Gal-Reporteraktivität zur Folge hatte (Abb. 4.33a). Eine erste wichtige Frage war, ob der bekannte Regulationsweg über Gcn2-abhängige eIF2-Phosphorylierung eine Rolle beim Anstieg der *GCN4*-Expression spielt. So könnte Gcn2 entweder durch übergeordnete Signalwege oder in Folge der Größenzunahme der Zellen aktiviert werden, da bei großen Zellen auf Grund des verringerten Oberflächen/Volumen-Verhältnisses und des größeren Zelldurchmessers die Aufnahme und Diffusion von Aminosäuren beeinträchtigt sein könnte. Interessanterweise war die *GCN4*-Expression jedoch unabhängig von der Kinase Gcn2 (Abb. 4.33).



**Abbildung 4.33: Zellzyklusarrest und Anstieg der GCN4-Expression bei  $\alpha$ -Faktor-Behandlung sind Gcn2-unabhängig.**

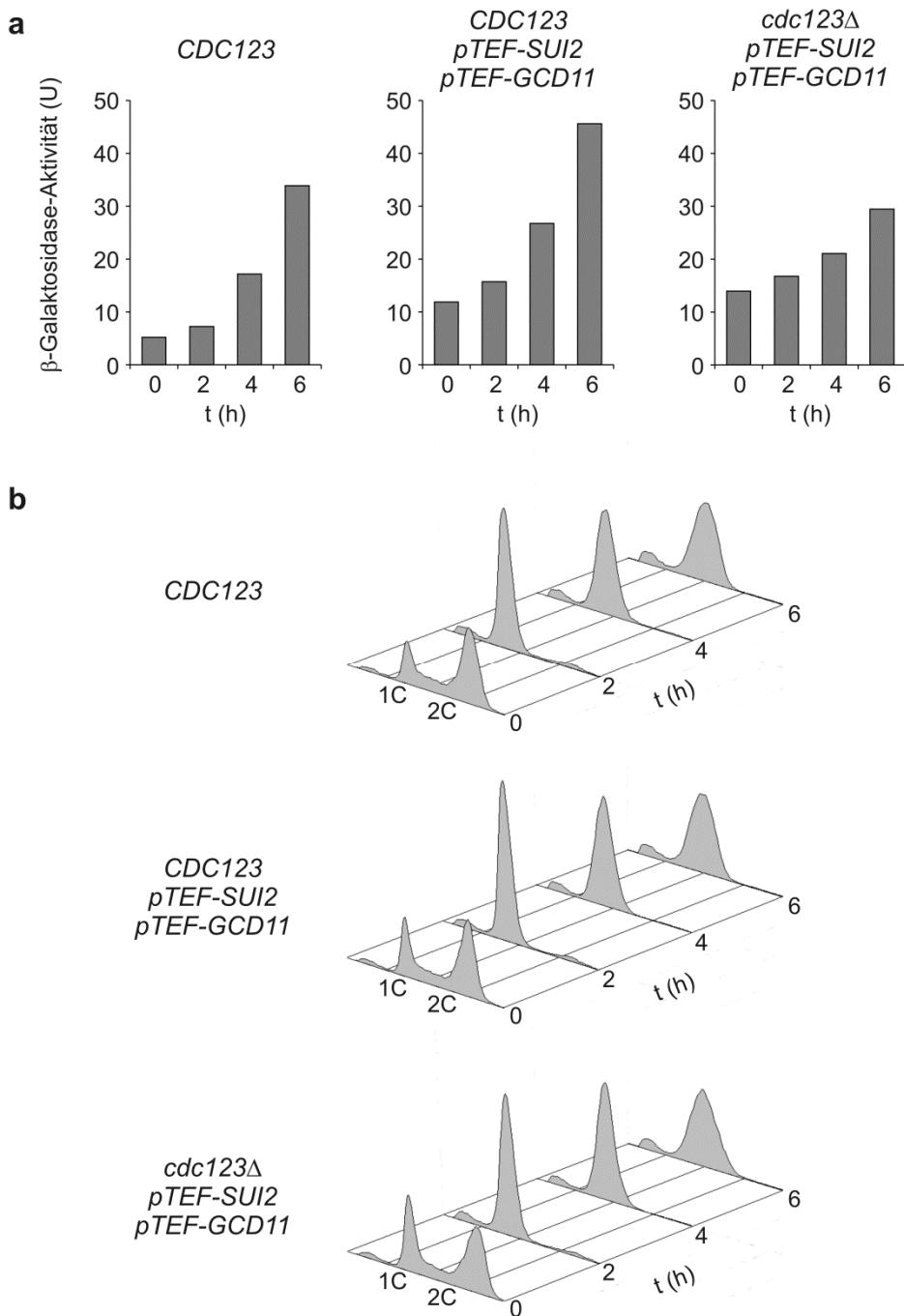
Der diploide Stamm W10440 (*GCN2/gcn2 $\Delta$ ::natNT2 BAR1/bar1 $\Delta$ ::LEU2 pWS1429*) wurde sporuliert und aus der Tetradenanalyse wurden je zwei haploide Stämme mit den Genotypen *MATa GCN2 bar1 $\Delta$  pWS1429* und *MATa gcn2 $\Delta$  bar1 $\Delta$  pWS1429* ausgewählt. Die Stämme wurden in XYD bei 25°C kultiviert und auf zwei Ansätze aufgeteilt. Zu einem Ansatz wurde  $\alpha$ -Faktor zugegeben, der andere diente als Kontrolle. Im Abstand von 2 h wurden Proben entnommen und ein ONPG-Test zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durchgeführt (a, dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der zwei Stämme). Von einem Stamm jedes Genotyps wurde zusätzlich die Zellzyklusprogression analysiert, indem Sytox Green-gefärbte Proben am Durchflusszytometer gemessen wurden (b).

In einem nächsten Schritt wurde die Bedeutung von Cdc123 für die *GCN4*-Expression analysiert, um zu überprüfen, ob die Behandlung mit  $\alpha$ -Faktor möglicherweise zur Inaktivierung von Cdc123 führt. Die Überexpression von *CDC123* durch den *TEF2*-Promotor konnte den Anstieg der *GCN4*-Expression nicht verhindern, sondern hatte sogar eine leichte Zunahme zur Folge (Abb. 4.34). Damit ist es unwahrscheinlich, dass der Gcn4-Anstieg durch eine Reduktion der Cdc123-Menge oder durch eine verringerte Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 verursacht wird, da diese durch erhöhte *CDC123*-Expression zumindest partiell kompensiert werden sollten. Die Untersuchung eines *cdc123 $\Delta$* -Stammes, welcher durch Überexpression von *GCD11* und *SUI2* gerettet wird, ergab, dass die *GCN4*-Expression in diesem Stamm zwar konstitutiv dereprimiert ist (*Gcd $^+$* -Phänotyp), aber bei Behandlung mit  $\alpha$ -Faktor weniger stark ansteigt (Abb. 4.35). Demnach könnte Cdc123 eine Rolle für den Anstieg der *GCN4*-Expression im  $\alpha$ -Faktor-Arrest spielen, aber der Anstieg wird nicht allein über Cdc123 vermittelt. Außerdem war der Anstieg der *GCN4*-Expression bei der Überexpression von *GCD11* und *SUI2* in Anwesenheit von Cdc123 vergleichbar mit einem Wildtypstamm. Dies spricht wiederum dafür, dass der Anstieg der *GCN4*-Expression nicht auf verringelter Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 beruht, da sich dieser Stamm sonst wie der *cdc123 $\Delta$* -Stamm verhalten müsste. Eine mögliche Deutung dieser Ergebnisse wäre, dass bei  $\alpha$ -Faktor-Behandlung Cdc123 zwar an Gcd11 bindet, aber die eIF2-Assemblierung stört. Eine andere Möglichkeit ist, dass Cdc123 keine Rolle für den Anstieg der *GCN4*-Expression bei  $\alpha$ -Faktor-Arrest spielt. In diesem Fall könnte die beobachtete geringere Zunahme der *GCN4*-Expression bei Deletion von *CDC123* darauf zurückzuführen sein, dass die konstitutionale Derepression der *GCN4*-Expression in dem *cdc123 $\Delta$* -Stamm zur Aktivierung von Kompensationsmechanismen führt – sei es auf Ebene der Translationsinitiation oder sei es durch Reduktion der *GCN4*-Transkription, Stimulation des Abbaus der *GCN4*-mRNA oder verstärkte Degradation von Gcn4. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, ob der Anstieg der Gcn4- $\beta$ -Gal-Reporteraktivität bei prolongiertem Zellzyklusarrest auf eine Regulation auf Translationsinitiationsebene zurückzuführen ist und welche Rolle Cdc123 dabei spielt.



**Abbildung 4.34:** Einfluss der Überexpression von *CDC123* auf Zellzyklusarrest und Anstieg der *GCN4*-Expression bei  $\alpha$ -Faktor-Behandlung

Der diploide Stamm W10443 (*his3/his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3 BAR1/bar1Δ::LEU2 pWS1429*) wurde sporuliert und aus der Tetradenanalyse je ein haploider Stamm mit dem Genotyp *MATa bar1Δ pWS1429* und *MATa his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3 bar1Δ pWS1429* ausgewählt. Die Stämme wurden in XYD bei 25°C kultiviert und auf einen Kontrollansatz und einen Ansatz mit  $\alpha$ -Faktor aufgeteilt. Im Abstand von 2 h wurden Proben entnommen, ein ONPG-Test zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durchgeführt (a) und Sytox Green-gefärbte Proben am Durchflusszytometer gemessen (b).



**Abbildung 4.35: Einfluss der Deletion von *CDC123* auf Zellzyklusarrest und Anstieg der *GCN4*-Expression bei  $\alpha$ -Faktor-Behandlung**

Die Stämme W995 (*MATa bar1Δ::HIS3*), W10491 (*MATa bar1Δ::HIS3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) und W10492 (*MATa bar1Δ::HIS3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Die Stämme wurden in XYD bei 25°C kultiviert und auf einen Kontrollansatz und einen Ansatz mit  $\alpha$ -Faktor aufgeteilt. Im Abstand von 2 h wurden Proben entnommen, ein ONPG-Test zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durchgeführt (a) und Sytox Green-gefärbte Proben am Durchflusszytometer gemessen (b).

## 5. DISKUSSION

*CDC123* ist ein essentielles Gen, das von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist (Richter, 2006). Untersuchungen in der Ratten-Fibroblasten-Zelllinie 3Y1 und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifizierten Cdc123 als Zellproliferationsfaktor. Temperatursensitive *cdc123*-Allele führen bei restriktiver Temperatur zu einer Beeinträchtigung des Eintritts in den Zellzyklus und zur Akkumulation der Zellen in der G1-Phase (Ohno et al., 1984; Richter, 2006). Ein G1-Arrest wurde in dieser Arbeit auch bei der Repression der *CDC123*-Expression und der damit verbundenen Abnahme der Cdc123-Menge beobachtet (vgl. 4.3.1). In weiteren Studien wurde Cdc123 mit der Initiation der Translation in Verbindung gebracht: Cdc123 interagiert mit Gcd11, der γ-Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2 (Bieganowski et al., 2004; Richter, 2006). Die Beeinträchtigung von Cdc123 hat eine verringerte Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten und dadurch eine Verminderung der Translationsinitiation zur Folge (Richter, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdc123 mit der C-terminalen Domäne III von Gcd11 interagiert und dass diese Interaktion notwendig für die Assemblierung des heterotrimeren eIF2-Komplexes ist. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Cdc123 in wachsenden Zellen im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 341-360) phosphoryliert ist und dass sowohl die Überexpression der Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1, als auch die Behandlung mit dem Mutagen MMS zur Hyperphosphorylierung von Cdc123 führt. Außerdem ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Cdc123 an der Regulation der eIF2-Aktivität in Abhängigkeit des Nährstoffangebots und der Zellzyklusprogression.

### 5.1 Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11

Im Vorfeld dieser Arbeit war die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 bekannt (Bieganowski et al., 2004; Richter, 2006), es war jedoch unklar, ob weitere Proteine, insbesondere die beiden anderen eIF2-Untereinheiten Sui2 und Sui3, an diesem Komplex beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte durch heterologe Expression in *E. coli* gezeigt werden, dass Cdc123 und Gcd11 direkt miteinander interagieren und keine weiteren Hefeproteine für die Interaktion von Cdc123 und Gcd11 notwendig sind. Des Weiteren ergaben Immunpräzipitationen aus Hefe, dass Cdc123 mit dem Gcd11-Monomer und nicht mit dem eIF2-Heterotrimer interagiert: Während bei der Präzipitation von eIF2B alle drei Untereinheiten des eIF2-Komplexes nachgewiesen werden konnten, wurde mit Cdc123 zwar eine ähnliche Menge an Gcd11 präzipitiert, aber Sui2 und Sui3 waren nicht detektierbar. Eine Wechselwirkung von Cdc123 mit dem eIF2-Komplex ist jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen, da in anderen Co-Immunpräzipitationen eine schwache Interaktion von Cdc123-myc mit Sui2-ha (Richter, 2006) und von flag-Sui3 mit Cdc123 (vgl. 4.3.1) nachgewiesen wurde.

In diesem Zusammenhang sollte auch beachtet werden, dass bei der Co-Expression in *E. coli* nicht nur eine Interaktion von Cdc123 mit Gcd11, sondern auch eine schwache Wechselwirkung von Cdc123 mit Sui2 beobachtet wurde (vgl. 4.2.2). Dieser Befund sollte jedoch durch weitere Kontrollen abgesichert werden, um auszuschließen, dass die verwendeten Fusionen mit dem Maltosebindeprotein (mbp) und der his6-Sequenz die Interaktion beeinflussen oder dass die Proteine nicht richtig gefaltet sind und deshalb aggregieren.

Durch den Einsatz von verkürzten Formen von Cdc123 und Gcd11 wurde untersucht, welche Regionen der beiden Proteine an der Interaktion beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass der N-terminale Bereich von Cdc123 wichtig für die Interaktion mit Gcd11 ist: Die Entfernung der Aminosäuren 1-56 führte zu einer deutlich verringerten Interaktion mit Gcd11 im Hefe-Zwei-Hybrid-System und diese Verkürzung konnte die Deletion von *CDC123* nicht komplementieren. Allerdings ist der N-terminale Bereich von Cdc123 nicht hinreichend für die Interaktion mit Gcd11, da ein N-terminales Fragment (Aminosäuren 1-71) nicht mit Gcd11 interagiert (vgl. 4.4.4). Zwar könnte dies auch auf eine verringerte Expression zurückzuführen sein, aber der Befund steht im Einklang mit Ergebnissen einer Zufallsmutagenese von Cdc123: Die identifizierten Aminosäuresubstitutionen, welche die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 verringern, ohne die Cdc123-Menge zu beeinflussen, betrafen nicht nur den N-terminalen Bereich von Cdc123 (Morgenthaler, 2009). Dies deutet darauf hin, dass Cdc123 keine spezielle Gcd11-bindende Domäne aufweist, sondern dass verschiedene Cdc123-Regionen an der Interaktion mit Gcd11 beteiligt sind.

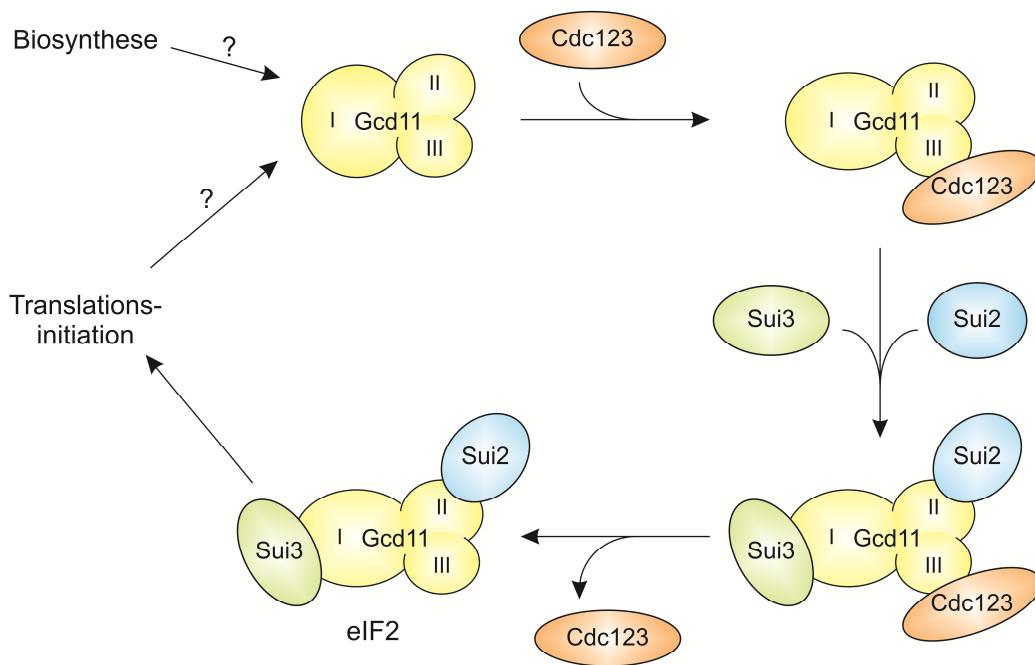
Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die C-terminale Domäne (Domäne III) von Gcd11 notwendig und hinreichend für die Interaktion mit Cdc123 ist (vgl. 4.5). Ein C-terminales Fragment von Gcd11 (Aminosäuren 410-527) zeigte im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine ähnlich starke Interaktion mit Cdc123 wie Wildtyp-Gcd11 (1-527). Dagegen führte die Entfernung von nur 13 Aminosäuren am C-Terminus von Gcd11 zu einer deutlichen Reduktion der Interaktion von Gcd11 mit Cdc123, Sui2 und Sui3, welche sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System, als auch in der Co-Immunpräzipitation beobachtet wurde. Da Strukturuntersuchungen an eIF2-Homologen aus Archäen gezeigt haben, dass Sui2 mit der Domäne II und Sui3 mit der Domäne I von Gcd11 interagiert (Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2007), verhindert die Verkürzung wahrscheinlich primär die Interaktion mit Cdc123, wodurch die Assemblierung des eIF2-Komplexes und somit die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3 beeinflusst wird.

## 5.2 Die Assemblierung von eIF2 durch Cdc123

Erste Hinweise auf eine funktionelle Verbindung von Cdc123 mit der Translationsinitiation ergaben sich bei einer Analyse von synthetischen genetischen Interaktionen: Die Kombination von *cdc123*-Allelen mit Deletionsmutanten von Genen, welche für verschiedene Translationsinitiationsfaktoren codieren, führte zu langsamem Wachstum (Richter, 2006). Dass Cdc123 tatsächlich eine Rolle für die Translationsinitiation spielt, zeigte die Reduktion der Polysomen in *cdc123*-Mutanten (Richter, 2006). Weitere Analysen ergaben, dass sich Cdc123-Defekte auf den Translationsinitiationsfaktor eIF2 auswirken: Die Expression von *GCN4* wird auf Ebene der Translation reguliert und reagiert sensibel auf die Menge an ternären Komplexen aus eIF2, GTP und der Initiator-tRNA (vgl. 3.2.3.1). Die erhöhte *GCN4*-Expression in *cdc123*-Mutanten weist deshalb darauf hin, dass die Menge an ternären Komplexen verringert ist. Dies ist nicht auf eine Aktivierung des bekannten Regulationsweges zur Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 zurückzuführen ist, denn die erhöhte *GCN4*-Expression in *cdc123*-Mutanten ist unabhängig von der eIF2 $\alpha$ -Kinase Gcn2 (vgl. 4.1.1). Neben *cdc123*-Mutanten führen verschiedene Mutationen in eIF2- und eIF2B-Untereinheiten zu einem Gcd $^{-}$ -Phänotyp, d.h. zu einer Gcn2-unabhängigen Derepression der *GCN4*-Expression (Hinnebusch, 2005). Dies unterstreicht den engen funktionellen Zusammenhang von Cdc123 und eIF2.

Die Auswirkungen einer Beeinträchtigung von Cdc123 auf eIF2 wurden mit Hilfe der Depletion von Cdc123 untersucht, wofür *CDC123* unter Kontrolle des *GALL*-Promotors gestellt wurde und die Expression durch Zugabe von Glukose reprimiert wurde (vgl. 4.3). Die Reduktion der Cdc123-Menge hatte eine verringerte Interaktion der drei eIF2-Untereinheiten Sui2 ( $\alpha$ ), Sui3 ( $\beta$ ) und Gcd11 ( $\gamma$ ) zur Folge. Ähnliche Ergebnisse waren auch zuvor mit *cdc123*-Mutanten erzielt worden (Richter, 2006). Cdc123 ist also wichtig für die Integrität des eIF2-Heterotrimers. Nachdem Cdc123 hauptsächlich mit monomerem Gcd11 und nicht mit dem eIF2-Komplex interagiert (vgl. 4.2.1 und 5.1), stimuliert Cdc123 die Interaktion der eIF2-Untereinheiten nicht über Stabilisierung vorhandener eIF2-Heterotrimere. Vielmehr scheint Cdc123 an der Assemblierung von eIF2-Komplexen aus den drei Untereinheiten beteiligt zu sein (Abb. 5.1). Es wäre möglich, dass Cdc123 ein Enzym ist, welches Gcd11 modifiziert und so die Affinität von Gcd11 für Sui2 und Sui3 erhöht. Allerdings wurde bisher kein Einfluss von Cdc123 auf die Mobilität von Gcd11 in der SDS-PAGE beobachtet (vgl. z.B. Abb. 4.8 + 4.28c). Dies schließt jedoch eine Modifikation nicht kategorisch aus: die Modifikation könnte entweder unter den Bedingungen der Probenvorbereitung und Gelelektrophorese instabil sein oder auf Grund geringer Masse und Ladung keinen Einfluss auf die Mobilität von Gcd11 bei der eindimensionalen Gelelektrophorese ausüben. In letzterem Fall könnte eine zweidimensionale Gelelektrophorese weitere Erkenntnisse bringen. Eine andere Möglichkeit ist, dass Cdc123 als allosterischer Aktivator der eIF2-Assemblierung wirkt: Die Bindung von Cdc123 an Gcd11 könnte eine Änderung der Gcd11-Konformation bewirken, welche die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3

ermöglicht. Diese Hypothese ist besonders attraktiv, weil Cdc123 nicht im Bereich der Sui2- und Sui3-Bindestellen von Gcd11 (Domäne II bzw. Domäne I) bindet, sondern an Domäne III von Gcd11 (vgl. 4.5 + 5.1). In diesem Modell könnten die beobachteten schwachen Interaktionen von Cdc123-myc mit Sui2-ha (Richter, 2006) oder flag-Sui3 mit Cdc123 (vgl. 4.3.1) als Komplex aus Cdc123 und eIF2 erklärt werden, welcher als Zwischenprodukt der Assemblierung auftritt: Zunächst interagiert Cdc123 mit Domäne III von Gcd11 und bewirkt eine Konformationsänderung, woraufhin Sui2 und Sui3 an die Domänen II bzw. I von Gcd11 binden und zuletzt dissoziiert Cdc123 vom eIF2-Komplex.



**Abbildung 5.1: Modell zur eIF2-Assemblierung durch Cdc123**

Cdc123 bindet an die Domäne III von Gcd11 und erhöht – möglicherweise durch Änderung der Gcd11-Konformation – die Affinität von Gcd11 für Sui2 und Sui3. Ob die Bindung von Sui2 und Sui3 in einer festen Reihenfolge erfolgt, ist unklar. Nach der Assemblierung des eIF2-Komplexes löst sich Cdc123 rasch von Gcd11 und der eIF2-Komplex kann in der Translationsinitiation wirken.

Die Reihenfolge der Bindung von Sui2 und Sui3 ist unklar. Zunächst legten Studien zur Suppression der *CDC123*-Deletion durch Überexpression von eIF2-Untereinheiten eine besondere Bedeutung der Wechselwirkung von Sui2 und Gcd11 nahe: Während die Überexpression von *SUI2* oder *GCD11* alleine ein langsames Wachstum von *cdc123Δ*-Stämmen ermöglichte und die kombinierte Überexpression von *SUI2* und *GCD11* es *cdc123Δ*-Stämmen sogar erlaubte, annähernd so schnell zu wachsen wie Wildtyp-Stämme, hatte die Überexpression von *SUI3* keinen Einfluss (Richter, 2006; vgl. auch Anhang 9.2.2). Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verbesserte Suppression durch das *gcd11-03*-Allel (Meitinger, 2007) auf eine stärkere Interaktion dieser Gcd11-

Variante mit Sui2 zurückzuführen ist (vgl. 4.3.4). Eine naheliegende Erklärung dieser Beobachtungen wäre, dass die Assemblierung des eIF2-Komplexes in einer strikten Reihenfolge abläuft: Zuerst bindet Cdc123 an Gcd11 und ermöglicht die Anlagerung von Sui2. Die Interaktion von Sui2 mit Gcd11 ist die Voraussetzung für die anschließende Bindung von Sui3, woran Cdc123 nicht direkt beteiligt ist. Ein Hinweis, dass die Bindung von Sui3 an Gcd11 abhängig von Sui2 sein könnte, ergab sich auch bei den Experimenten zur Depletion von Translationsinitiationsfaktoren: Während die Reduktion der Sui3-Menge keinen Einfluss auf die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 hatte, verursachte die Depletion von Sui2 eine Abnahme der Interaktion von Gcd11 mit Sui3 (vgl. 4.3.2). Allerdings war das Ausmaß geringer als für eine strikte Reihenfolge erwartet: Die mit Gcd11 co-präzipitierte Sui2-Menge nahm bei Depletion von Sui2 im Vergleich zur Kontrolle auf ca. 20% ab, wohingegen die Menge an co-präzipitiertem Sui3 nur auf 40% abnahm. Dies spricht zwar dafür, dass Sui2 die Bindung von Sui3 an Gcd11 fördert oder stabilisiert, allerdings scheint die vorherige Bindung von Sui2 nicht strikt notwendig für die Interaktion von Gcd11 und Sui3 zu sein. Gegen eine Abhängigkeit der Interaktion und eine festgelegte Reihenfolge der Bindung sprechen auch Untersuchungen von eIF2-Komplexen aus anderen Eukaryoten: So konnten nach Expression der eIF2-Untereinheiten des Mikrosporidiums *Encephalitozoon cuniculi* in *E. coli* sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta\gamma$ -Dimere aufgereinigt werden (Naveau et al., 2010). Außerdem war bei humanen eIF2-Untereinheiten, welche mit Hilfe des Baculovirussystems einzeln exprimiert und gereinigt wurden, in ELISA-Studien eine paarweise Interaktion von  $\alpha\gamma$  und  $\beta\gamma$  nachweisbar (Suragani et al., 2005). Eine andere Hypothese zur Erklärung der beobachteten Unterschiede zwischen Sui2 und Sui3 hinsichtlich der Interaktion mit Gcd11 und der Fähigkeit zur Suppression der *CDC123*-Deletion ist, dass Sui2 die „korrekte“ Konformation von Gcd11 stabilisiert und so die Bindung von Sui3 unterstützt. Deswegen schwächt die Depletion von Sui2 die Gcd11-Sui3-Interaktion, die Bindung ist aber nicht völlig von Sui2 abhängig, da Cdc123 die Änderung der Gcd11-Konformation und damit die Sui3-Bindung fördert. In Abwesenheit von Cdc123 (*cdc123Δ*) hingegen ist die vorige Bindung von Sui2 strikt notwendig für die Bindung von Sui3 an Gcd11. Um diese Hypothese zu überprüfen und um die Rolle von Cdc123 bei der Assemblierung des eIF2-Komplexes genauer zu analysieren, wäre die Etablierung eines *in vitro*-Assays zur eIF2-Assemblierung von Vorteil.

Auch wenn der genaue Wirkmechanismus von Cdc123 unklar blieb, konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Cdc123 nicht auf die Assemblierung neusynthetisierter eIF2-Untereinheiten beschränkt ist: Durch Co-Immunpräzipitation wurde nachgewiesen, dass Cdc123 auch mehrere Stunden nach der Repression der *GCD11*-Expression mit Gcd11 interagiert (vgl. 4.6). Da zu diesem Zeitpunkt keine Gcd11-Synthese mehr stattfindet, bindet Cdc123 also nicht nur an neusynthetisiertes Gcd11. Es konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Cdc123-Gcd11-Komplexe schon direkt nach der Gcd11-Neusynthese gebildet hatten und während der Repression der *GCD11*-Expression bestehen blieben,

da sich auch dann Cdc123-Gcd11-Komplexe bildeten, wenn zunächst die *GCD11*-Expression reprimiert und danach die *CDC123*-Expression induziert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eIF2-Komplexe zerfallen können und mit Hilfe von Cdc123 reassembliert werden müssen. Es wäre sogar denkbar, dass die Dis- und Reassemblierung von eIF2 ein bisher unerkannter Schritt des Translationsinitiationszyklus ist: Sowohl eIF2 als auch der Elongationsfaktor eEF1A, welcher Homologie zur  $\gamma$ -Untereinheit von eIF2 aufweist, sind G-Proteine, welche in GTP-gebundener Form tRNAs zum Ribosom rekrutieren und diese dort nach Hydrolyse des GTP-Moleküls entlassen. Während bei eEF1A die Affinität für tRNA in der GTP-Form etwa 10000mal höher ist als in der GDP-Form, ist der Affinitätsunterschied bei eIF2 wesentlich geringer: Die Affinität von eIF2 für die Initiator-tRNA ist bei Bindung von GTP nur etwa 20mal höher als in GDP-gebundener Form (Kapp und Lorsch, 2004). Es stellt sich daher die Frage, ob dieser vergleichsweise geringe Unterschied für eine effiziente Freisetzung der tRNA nach der GTP-Hydrolyse ausreichend ist. Eine Möglichkeit ist, dass andere Komponenten des 43S Präinitiationskomplexes einen Einfluss ausüben: Zum einen könnten Interaktionspartner von eIF2 dessen Affinität für die tRNA beeinflussen und dazu führen, dass die Affinitätsunterschiede zwischen der GTP- und der GDP-Form von eIF2 größer sind als die *in vitro* für isoliertes eIF2 gemessenen Werte. Zum anderen könnte durch die Startcodonerkennung und die damit verbundene Umlagerung des Initiationskomplexes in der P-Stelle des Ribosoms eine bessere tRNA-Bindestelle entstehen, welche eine Interaktion der tRNA mit eIF2 aber auf Grund von sterischer Hinderung ausschließt. In der Tat gibt es Hinweise, dass eIF1 die Bindung der tRNA in der P-Stelle sterisch behindert und somit die Freisetzung von eIF1 im Rahmen der Startcodonerkennung die Bindung der tRNA in der P-Stelle stabilisiert (Hinnebusch, 2011). Ob dies die Bindung der tRNA an eIF2 beeinflusst, ist jedoch unklar. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Umlagerung des Initiationskomplexes den Zerfall des eIF2-Heterotrimers auslöst. Nach der Freisetzung der eIF2-Untereinheiten wäre die Reassemblierung des eIF2-Komplexes durch Cdc123 die Voraussetzung für den nächsten Translationsinitiationszyklus. Gemäß dieser Hypothese müsste die Inhibition der Translationsinitiation – z.B. durch Cycloheximid, welches nicht nur die Elongation, sondern auch die Initiation der Translation inhibiert (Pestka, 1971; Campbell et al., 2005) – den Zerfall von eIF2 verhindern und somit zu einer erhöhten Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3, aber einer verringerten Interaktion von Gcd11 mit Cdc123 führen, was sich durch Co-Immunpräzipitation überprüfen ließe.

Sofern der Zerfall von eIF2 kein Teil des Translationsinitiationszyklus ist, könnte der eIF2-Komplex auch spontan dissoziieren. Da möglicherweise sowohl Sui3, als auch Sui2 den Switch1 der G-Domäne von Gcd11 kontaktieren (Stolboushkina et al., 2008), könnte die Interaktion der eIF2-Untereinheiten durch die Konformation der Switch-Regionen und damit durch das gebundene Guanin-Nukleotid beeinflusst werden. So war bei der Depletion von eIF2B-Untereinheiten eine Abnahme der

Interaktion von Sui3 mit Gcd11 beobachtbar (vgl. 4.3.2). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bindung von Sui3 an Gcd11-GDP weniger stark ist als an Gcd11-GTP. In diesem Zusammenhang ist auch bedenkenswert, dass eIF5 neben seiner bekannten Rolle als eIF2-GAP vor kurzem eine zweite Funktion als GDI zugeordnet wurde: eIF5 bindet an eIF2-GDP und verhindert die Dissoziation von GDP (Jennings und Pavitt, 2010a; Jennings und Pavitt, 2010b). Wenn die Affinität der eIF2-Untereinheiten in der GDP-gebundenen Form tatsächlich verringert ist, könnte die Bindung von eIF5 an eIF2-GDP zusätzlich dazu dienen, den Zerfall von eIF2 zu verhindern. Die Einordnung von Cdc123 in den GTP/GDP-Zyklus von eIF2 stellt eine interessante Aufgabe für zukünftige Untersuchungen dar. Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Ausweitung der Versuche zum Einfluss von Cdc123, eIF2B und eIF5 auf die Interaktion der eIF2-Untereinheiten miteinander und mit den anderen genannten Faktoren. In diesem Zusammenhang wäre eine schnellere Inaktivierung von Faktoren, als dies durch Depletion möglich ist, erstrebenswert, zum Beispiel über temperatursensitive Mutanten.

### 5.3 Die Phosphorylierung von Cdc123

Durch Immunpräzipitation und Behandlung mit Phosphatase konnte gezeigt werden, dass Cdc123 bei Wachstum der Zellen unter Standardbedingungen (XYD oder XYRG, 25 – 30°C) phosphoryliert ist. Die Untersuchung von Cdc123-Verkürzungen ergab, dass die Phosphorylierungsstelle(n) im Bereich der letzten 20 Aminosäuren (341-360) liegen. Bei der Massenspektrometrie von Cdc123-flag wurde eine Phosphorylierung von Serin 356 nachgewiesen. Inzwischen gibt es in der Phosphopep-Datenbank (Bodenmiller et al., 2008) einen Eintrag zur Phosphorylierung von Cdc123 im C-terminalen Bereich: In massenspektrometrischen Untersuchungen wurde die Phosphorylierung von Cdc123 aus *Saccharomyces cerevisiae* an den Serinen 353, 354 und 356 beobachtet. Die Bedeutung dieser Phosphorylierungen ist unklar, allerdings beeinträchtigt die Deletion der letzten 20 Aminosäuren das Wachstum (Nachtsheim, 2002; vgl. 4.4.3), was eine Rolle des C-terminalen Bereichs für die volle Funktionalität von Cdc123 unterstreicht.

Des Weiteren ergaben sich Hinweise auf eine Phosphorylierung von Cdc123 an den Serinen 2 und 3, welche möglicherweise nur in Kombination mit N-terminalen Epitopmarkierungen von Cdc123 auftritt: Bei der Massenspektrometrie von flag-Cdc123 wurde die Phosphorylierung der Serine 2 und 3 beobachtet. Die Deletion der Serine 2 und 3 hat bei Cdc123 ohne Epitop kaum Einfluss auf die Mobilität in der SDS-Gelelektrophorese, aber einen deutlicheren Einfluss bei ha-Cdc123. Außerdem neigt ha-Cdc123 zur Ausbildung einer Doppelbande in SDS-Gelelektrophorese und Western Blot, wobei die langsamer laufende, hyperphosphorylierte Form deutlich weniger abundant ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression bestimmter Kininasen oder die Behandlung der Zellen mit dem mutagenen Agens MMS zur Hyperphosphorylierung von Cdc123 führen. In SDS-Gelelektrophorese und Western Blot ist bei Verwendung von ha-Cdc123 unter diesen Bedingungen

eine deutliche Doppelbande beobachtbar, während bei Cdc123 ohne Epitop die Doppelbande in der Regel nicht oder zumindest weniger stark ausgeprägt ist. Vermutlich unterstützt die oben erläuterte Phosphorylierung von ha-Cdc123 an den Serinen 2 und/oder 3 die Auftrennung verschiedener Phosphoformen in der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese. Allerdings hatte eine Deletion der beiden N-terminalen Serine unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Auswirkungen: Während bei der Überexpression der Caseinkinase YCK2 auch bei ha-Cdc123(4-360) eine Doppelbande beobachtbar war, war dies bei der Behandlung mit MMS nicht der Fall (vgl. Abb. 4.20b + 4.25a). Der Vergleich von verschiedenen Cdc123-Varianten und damit mögliche Aussagen zu den Phosphorylierungsstellen wurde durch Schwankungen der Proteinmenge erschwert. So war bei der Überexpression von YCK2 für ha-Cdc123(S157A) keine Doppelbande nachweisbar und bei der MMS-Behandlung, wie bereits erwähnt, für ha-Cdc123(4-360); in beiden Fällen war aber Proteinmenge im Vergleich zur Wildtyp-Variante von ha-Cdc123 reduziert, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Proteine zwar phosphoryliert werden, die Menge der hyperphosphorylierten Form aber unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots lag. Deshalb ist keine endgültige Aussage zu den Phosphorylierungsstellen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier Kinasen identifiziert werden, deren Überexpression zu einer Hyperphosphorylierung von (ha-)Cdc123 führt. Dabei handelte es sich um Cdc15, Mps1, Yck1 und Yck2. Cdc15 und Mps1 sind in die Zellzyklusprogression involviert: Cdc15 ist eine Komponente des MEN-Signalwegs, welcher die Beendigung der Mitose einleitet (Stegmeier und Amon, 2004), und Mps1 ist an der Duplikation der Spindelpolkörper und am Spindelassemblierungskontrollpunkt beteiligt (Winey und Huneycutt, 2002). Yck1 und Yck2 sind zwei funktionell redundante Typ I-Caseinkinasen (CK1), welche zahlreiche Substrate phosphorylieren und an verschiedenen Prozessen beteiligt sind (Robinson et al., 1999). Obwohl die Überexpression dieser Kinasen zur Hyperphosphorylierung von Cdc123 führte, zeigten sich keine Auswirkungen auf eIF2: In Immunpräzipitationen war die Assoziation der eIF2-Untereinheiten unverändert und auch die GCN4-Expression, welche sehr sensitiv auf die Verfügbarkeit an ternären Komplexen reagiert, wurde durch die Kinase-Überexpression nicht beeinflusst. Demnach scheint die Hyperphosphorylierung nicht zu einer Inhibition von Cdc123 zu führen. Neben der funktionellen Bedeutung der Hyperphosphorylierung ist ebenfalls unklar, ob Cdc123 überhaupt ein endogenes Substrat der genannten Kinasen ist oder ob es sich bei der beobachteten Hyperphosphorylierung von Cdc123 um ein Artefakt der Kinase-Überexpression handelt. Während Cdc123 homogen im Cytoplasma lokalisiert ist (Richter, 2006), trifft dies auf die Kinasen nicht zu: Cdc15 bindet an die Spindelpolkörper (Menssen et al., 2001), Mps1 lokalisiert an Spindelpolkörper und Kinetochoren (Castillo et al., 2002) und Yck1 und Yck2 sind über einen Geranylgeranyl-Anker peripher an die Plasmamembran gebunden und besonders an Knospenspitze bzw. Knospenhals konzentriert (Robinson et al., 1999). Die

Überexpression der Kinasen könnte also zu einer Fehllokalisierung im Cytoplasma führen und dadurch die Hyperphosphorylierung von Cdc123 bewirken.

Neben der Überexpression bestimmter Kinasen bewirkte auch eine Beeinträchtigung der Genomintegrität eine Hyperphosphorylierung von (ha-)Cdc123: Sowohl bei Deletion von *SLX8*, *SLX5* oder *SGS1*, als auch bei Behandlung mit MMS bildete sich in SDS-PAGE und Western Blot eine ha-Cdc123-Doppelbande aus. Die RecQ-Helikase Sgs1 und die Ubiquitin-Ligase Slx5-Slx8 sind an der Regulation von DNA-Reparaturprozessen beteiligt und ihr Fehlen führt zu Genominstabilität (Rouse, 2009). Die Behandlung mit MMS verursacht die Methylierung von Adeninbasen der DNA, wodurch die Replikation blockiert wird (Lee et al., 2007; Rouse, 2009). Da einerseits die Behandlung mit MMS zu blockierten Replikationsgabeln führt und andererseits Sgs1, Slx5 und Slx8 mit Prozessen rund um die Stabilisierung und Reparatur von blockierten Replikationsgabeln in Verbindung gebracht wurden (Rouse, 2009), könnte die Blockade von Replikationsgabeln das Signal sein, welches die Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 auslöst. Allerdings trat bei der Behandlung mit Hydroxyurea, welche ebenfalls einen Arrest in der S-Phase bewirkt, keine Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 auf (vgl. 4.10). Hydroxyurea (HU) inhibiert die Ribonukleotidreduktase und verringert somit die Konzentration an Desoxyribonukleotiden, was ähnlich wie die Behandlung mit MMS die Progression der Replikationsgabeln verhindert und den Intra-S-Kontrollpunkt aktiviert (Segurado und Tercero, 2009). Vermutlich sind die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Phosphorylierung von Cdc123 darauf zurückzuführen, dass MMS und HU die Replikation auf unterschiedliche Weise beeinflussen: Während MMS die Bewegung von Replikationsgabeln blockiert, scheint HU die Stabilität der Bindung der Polymerasen an der Replikationsgabel zu verringern (Segurado und Tercero, 2009). Außerdem gibt es gewisse Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung von Kontroll- und Reparaturprozessen (Segurado und Tercero, 2009). Möglicherweise ist auch weniger die Blockade der Replikation, als vielmehr die Aktivierung von DNA-Reparatur- oder Schadenstoleranzmechanismen ausschlaggebend für die Phosphorylierung von Cdc123. So kann bei Blockade von Replikationsgabeln an DNA-Schäden, wie methylierten Basen, die DNA-Replikation durch Transläsionssynthese oder Template-Switch fortgeführt werden. Interessanterweise ist die RecQ-Helikase Sgs1 in die Auflösung von Hemicatenanstrukturen, die beim Template-Switch entstehen, involviert und die Ubiquitinierung und SUMOylierung von beteiligten Komponenten beeinflusst die Wahl zwischen (fehlerhafter) Transläsionssynthese und (fehlerfreiem) Template-Switch (Branzei und Foiani, 2010), womit auch der SUMO-abhängigen Ubiquitin-Ligase Slx5-Slx8 eine Funktion zukommen könnte. Auf welche Weise bei Behandlung mit MMS oder Deletion von *SGS1*, *SLX5* oder *SLX8* letztlich die Hyperphosphorylierung von Cdc123 ausgelöst wird, ist jedoch unbekannt.

Die Phosphorylierung von Cdc123 bei MMS-Behandlung hatte, wie auch bei der Kinaseüberexpression, keinen Einfluss auf die Assoziation der eIF2-Untereinheiten, was gegen eine

Inhibition von Cdc123 durch die Phosphorylierung spricht. Zwar kam es bei Behandlung mit MMS zu einem Anstieg der *GCN4*-Expression, dieser war jedoch nicht von Cdc123, sondern von Gcn2 abhängig und wird demnach durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  vermittelt. Weder Cdc123 noch Gcn2 hatte einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression oder die Überlebensfähigkeit bei MMS-Exposition. Folglich sind der Arrest in der S-Phase und der Erhalt der Viabilität vermutlich auf die Aktivierung der DNA-Reparatur- und Zellzykluskontrollmechanismen zurückzuführen, während der Regulation der Translationsinitiation über eIF2 keine entscheidende Rolle zukommt.

## 5.4 Cdc123 und die Zellzyklusprogression

### 5.4.1 Der Einfluss von Cdc123 auf die Zellzyklusprogression

D123, das Ratten-Orthologe von Cdc123, wurde ursprünglich als Zellproliferationsfaktor identifiziert, da ein temperatursensitives Allel in einer Fibroblasten-Zelllinie bei restriktiver Temperatur zur Akkumulation der Zellen in der G1-Phase führte und außerdem den Wiedereintritt von quieszenten Zellen in den Zellzyklus verhinderte (Ohno et al., 1984). Der Befund, dass die Transformation der Zellen mit SV40 zwar den Zellzyklusarrest, aber nicht die Letalität des ts-Allels bei restriktiver Temperatur aufhebt, deutete darauf hin, dass D123 nicht direkt an der Zellzyklusprogression beteiligt ist, sondern in einem essentiellen Prozess wirkt, dessen Störung letztendlich den Arrest in der G1-Phase bedingt (Ohno und Kimura, 1984). Wie durch Studien mit *cdc123-ts*-Allelen in Hefe gezeigt werden konnte, handelt es sich bei diesem Prozess um die Translationsinitiation: Cdc123 ist notwendig für die Integrität des heterotrimeren eIF2-Komplexes (Richter, 2006). Während in bisherigen Arbeiten meist temperatursensitive *cdc123*-Allele verwendet wurden, wurde nun die Cdc123-Menge verringert, indem *CDC123* unter die Kontrolle des *GALL*-Promotors gestellt und die Expression durch Glukose reprimiert wurde. Dabei nahm die Assoziation der drei eIF2-Untereinheiten ab und zeitgleich trat eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase ein, welche mit einer Zunahme der Zellgröße einherging. Ein Arrest in der G1-Phase bei Zunahme der Zellgröße wurde auch für die Depletion von eIF2-Untereinheiten beobachtet (Weinzierl, 2011). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die primäre Funktion von Cdc123 im Gebiet der Translationsinitiation liegt, nämlich in der Unterstützung der Assoziation der eIF2-Untereinheiten. Die Auswirkungen von Cdc123-Störungen auf den Zellzyklus sind eine Folge der verminderten eIF2-Integrität unter diesen Bedingungen. Eine wesentliche Rolle für die Kopplung von Translation und Zellzyklus nimmt das G1-Zyklin Cln3 ein, dessen Synthese auf Grund eines uORFs in der 5'UTR der *CLN3*-mRNA stark von der Translationsinitiationsrate abhängt (Polymenis und Schmidt, 1997). In der Tat wurde bei der Untersuchung der Depletion von Gcd11 (eIF2 $\gamma$ ) beobachtet, dass die konstitutive *CLN3*-Expression (durch ein *pMET25-CLN3*-Konstrukt ohne die 5'UTR von *CLN3*) den Arrest in der G1-Phase verhindert

(Hirmer, 2009). Auch bei dem Allel *cdc123Δ327*, welches zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der G1-Phase führt, wirkt die konstitutive *CLN3*-Expression der Akkumulation in der G1-Phase entgegen. Das langsame Wachstum von *cdc123Δ327*-Stämmen wird hingegen durch die konstitutive *CLN3*-Expression nicht beeinflusst und ist demnach vermutlich eine Folge der verringerten allgemeinen Translationsinitiationsrate und damit der reduzierten Proteinsynthese dieser Stämme (Weinzierl, 2011).

#### 5.4.2 Der Einfluss der Zellzyklusprogression auf Cdc123

Zur Wahrung einer konstanten Zellgröße ist die Kopplung der Zellteilung mit der Zellgröße von Nöten (Rupes, 2002; Jorgensen und Tyers, 2004). In Hefe ist das Überschreiten von START, d.h. der Eintritt in den Zellzyklus, von dem Erreichen einer kritischen Zellgröße abhängig. Vermutlich dient die Translationskapazität der Zelle als Maß für die Zellgröße (Jorgensen und Tyers, 2004). Für die Kopplung von Start an eine kritische Translationsrate spielt wiederum die Synthese des G1-Zyklins Cln3 eine wesentliche Rolle (Polymenis und Schmidt, 1997; Alberghina et al., 2004). Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Zellgröße wäre es auch sinnvoll, bei einem Arrest des Zellzyklus die Proteinsynthese und somit das Wachstum zu verringern. Angesichts der großen Bedeutung von eIF2 für die Regulation der Translationsinitiation und der identifizierten Rolle von Cdc123 für die Funktionalität von eIF2 wurde der Einfluss eines Zellzyklusarrests auf Cdc123 und eIF2 untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Arrestsituationen analysiert: Der Arrest in der G1-Phase durch Behandlung mit Pheromon ( $\alpha$ -Faktor), der Arrest in der S-Phase durch Verringerung der dNTP-Konzentration (durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase mit Hydroxyurea) und der Arrest in der Metaphase durch Depolymerisation des Spindelapparats (mit Nocodazol). Im Western Blot war unter keinen Bedingungen eine Auswirkung auf Menge oder Mobilität von Cdc123 sichtbar. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen des  $\alpha$ -Faktor-Arrests (Bieganowski et al., 2004), schließt aber eine Modifikation von Cdc123 nicht endgültig aus, da die Auftrennung von Isoformen mit geringen Massen- und Ladungsunterschieden in der eindimensionale SDS-Gelelektrophorese nur begrenzt möglich ist.

In der Tat trat bei allen drei untersuchten Arrestbedingungen eine Derepression der *GCN4*-Expression auf, welche als sensitiver Nachweis für eine Reduktion der ternären Komplexe aus eIF2, GTP und Initiator-tRNA gilt. Dies spricht dafür, dass ein Arrest des Zellzyklus – unabhängig von der Zellzyklusphase – zu einer Beeinträchtigung von eIF2 führt. Der Anstieg der *GCN4*-Expression trat erst nach dem Zellzyklusarrest ein, was darauf hinweist, dass sich möglicherweise erst ein prolongierter Arrest auf eIF2 auswirkt. Im Einklang mit der späten und moderaten Derepression des *GCN4-lacZ*-Reporters nahmen die Zellen im Arrest an Größe zu, was gegen eine starke Reduktion der allgemeinen Proteinsynthese spricht. Anhand des  $\alpha$ -Faktor-Arrests konnte gezeigt werden, dass der

Anstieg der *GCN4*-Expression unabhängig von dem bekannten eIF2-Regulationsweg der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch Gcn2 ist. Dagegen führte die Deletion von *CDC123* zu einem verringerten Anstieg der *GCN4*-Expression. Somit könnte Cdc123 an der Regulation der Translationsinitiation bei Arrest des Zellzyklus beteiligt sein. Diese interessante Hypothese verdient in Zukunft eine detaillierte Untersuchung. Zunächst sollte dabei geklärt werden, ob der Anstieg der *GCN4-lacZ*-Reporteraktivität tatsächlich auf eine verstärkte Translation zurückzuführen ist. Während die translationelle Regulation der Gcn4-Menge im Fokus zahlreicher Untersuchungen stand, sind mögliche Regulationen auf Ebene der Transkription, der mRNA-Stabilität und der Gcn4-Degradation weniger gut erforscht (Hinnebusch, 2005). Schon bei ersten Experimenten mit *GCN4-lacZ*-Reporterkonstrukten Mitte der 1980er Jahre fiel auf, dass die Menge der *GCN4-lacZ*-mRNA bei Aminosäuremangel (ausgelöst durch Inhibition der Histidinsynthese mit 3-Aminotriazol) moderat zunimmt (Hinnebusch, 1984; Hinnebusch, 1985). Ob dies auf eine verstärkte Transkription oder auf eine erhöhte Stabilität der mRNA zurückgeht, ist jedoch unklar (Hinnebusch, 2005). Etwas besser erforscht ist die Regulation der Gcn4-Degradation: Nach Phosphorylierung durch zyklin-abhängige Kinasen wird Gcn4 im Nukleus von SCF<sup>Cdc4</sup> ubiquitiniert und dadurch für den Abbau markiert. Bei den beteiligten CDKs handelt es sich nicht um Cdc28, welche die Zellzyklusprogression steuert, sondern um Srb10 und Pho85. Die CDK Srb10 und ihr Zyklinpartner Srb11 sind Teil des Mediatorkomplexes, welcher mit der RNA-Polymerase II interagiert. Dadurch kommt Srb10 an den Promotoren von Gcn4-abhängigen Genen in die Nähe des Transkriptionsfaktors Gcn4 und phosphoryliert Gcn4 (Irniger und Braus, 2003). Die CDK Pho85 ist durch Assoziation mit 10 verschiedenen Zyklinen an diversen Prozessen beteiligt, unter anderem der Zellzyklusprogression, dem Phosphat- und Glykogenmetabolismus (Huang et al., 2007). Die Phosphorylierung von Gcn4 erfolgt im Nukleus durch Pho85-Pcl5 und ist abhängig von der Aminosäure-Verfügbarkeit: Bei hoher Konzentration an Aminosäuren bewirkt die Phosphorylierung von Gcn4 durch Pho85-Pcl5 einen schnellen Abbau von Gcn4, während bei Aminosäuremangel die Phosphorylierung inhibiert und dadurch Gcn4 stabilisiert wird (Irniger und Braus, 2003). Der in dieser Arbeit verwendete *GCN4-lacZ*-Reporter wurde durch Insertion von *lacZ* in die interne BamHI-Schnittstelle von *GCN4* erstellt, was die Expression eines Fusionsproteines aus den N-terminalen 55 Aminosäuren von Gcn4 und der  $\beta$ -Galaktosidase zur Folge hat (Hinnebusch, 1984). Dieses N-terminale Fragment von Gcn4 enthält aber weder die identifizierten Degradationssignale an Positionen 93-140 und 151-167 von Gcn4 (Meimoun et al., 2000) noch die Signale zur Kernlokalisierung (Aminosäuren 167-200 und 231-249, (Pries et al., 2002)), welche eine Voraussetzung für den effizienten Abbau ist (Irniger und Braus, 2003). Von den fünf möglichen Phosphorylierungsstellen in CDK-Konsensusmotiven liegt nur eines (Serin 17) im Bereich der N-terminalen 55 Aminosäuren von Gcn4 und dessen Bedeutung für den Gcn4-Abbau ist unklar (Irniger und Braus, 2003). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass der Gcn4- $\beta$ -Galaktosidase-Reporter den

Mechanismen zur Regulation der Gcn4-Degradation unterliegt. Um jedoch eine Rolle der Transkription, mRNA-Stabilität oder Proteindegradation bei dem Anstieg der Gcn4-β-Gal-Reporteraktivität während des Zellzyklusarrests definitiv ausschließen zu können, wäre die Analyse eines *GCN4-lacZ*-Reporters ohne die uORFs zur Translationsregulation sinnvoll (Hinnebusch, 1984).

## 5.5 Die Rolle von Cdc123 bei Nährstoffmangel

### 5.5.1 Cdc123 und die Bildung von eIF2-Foci bei Aminosäuremangel

Der Translationsinitiationsfaktor eIF2 steht im Mittelpunkt eines gut untersuchten Regulationsweges der Translationsinitiation (vgl. 3.2.3.1): Bei Aminosäuremangel wird die Kinase Gcn2 durch die Bindung von unbeladener tRNA aktiviert und phosphoryliert die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 (Sui2). Phosphoryliertes eIF2 bindet mit höherer Affinität an eIF2B, es findet jedoch kein Nukleotidaustausch statt. Dadurch sinkt die Menge an eIF2-GTP, welches für die Translationsinitiation benötigt wird. In den letzten Jahren wurde die Lokalisation von eIF2 und eIF2B in cytoplasmatischen Foci beschrieben (Campbell et al., 2005; Noree et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit und in weiteren Experimenten zeigte sich, dass Sui2 (und damit vermutlich eIF2) bei guten Bedingungen homogen im Cytoplasma verteilt ist, aber bei Aminosäuremangel innerhalb weniger Minuten in Foci lokalisiert. Dies war abhängig von der Kinase Gcn2 und der regulatorischen eIF2B $\alpha$ -Untereinheit Gcn3. Dagegen waren eIF2B-Untereinheiten bereits unter guten Bedingungen in Foci lokalisiert und Aminosäuremangel stimulierte die Lokalisation in den Foci nur geringfügig (S. Weinzierl, unpublizierte Daten). Dieses Verhalten wurde sowohl für die Untereinheiten des katalytischen eIF2B-Subkomplexes (Gcd1 und Gcd6), als auch für Gcd7 (eine Untereinheit des regulatorischen Subkomplexes aus Gcn3, Gcd2 und Gcd7) beobachtet. Die Bildung von eIF2B-Foci unter guten Bedingungen war unabhängig von Gcn2, aber abhängig von Gcn3 (S. Weinzierl, unpublizierte Daten). Diese Ergebnisse führten zu folgendem Modell: eIF2B ist – im Wesentlichen unabhängig vom Nährstoffangebot – in Foci lokalisiert, eIF2 hingegen ist bei gutem Nährstoffangebot im Cytoplasma verteilt. Zwar findet die Interaktion mit eIF2B und damit der Nukleotidaustausch vermutlich in den Foci statt, eIF2 ist jedoch sehr mobil und bewegt sich rasch in die Foci und wieder heraus (Campbell et al., 2005). Da eIF2 darüber hinaus in anderen Schritten der Translationsinitiation mit Faktoren interagiert, die homogen im Cytoplasma verteilt sind (Campbell et al., 2005), ist der Großteil von eIF2 ebenfalls homogen verteilt und keine Lokalisation in eIF2-Foci sichtbar. Bei Aminosäuremangel ändert sich dies: Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  durch Gcn2 führt zu einer stärkeren Interaktion mit eIF2B und damit zu einer Konzentration von eIF2 in den Foci. Interessanterweise ist die Konzentrierung von eIF2 in den Foci sehr deutlich, obwohl eIF2 in der Zelle in viel größerer Menge vorhanden ist als eIF2B: Die Schätzungen für das eIF2:eIF2B-Verhältnis reichen von 6:1 (von der Haar und McCarthy, 2002) bis 12:1 (Singh et al., 2007). Nachdem eIF2 und eIF2B im Verhältnis 1:1 miteinander interagieren (Hinnebusch, 2000), bedeutet

dies, dass maximal ein Sechstel der eIF2-Moleküle an eIF2B gebunden sein kann. Da außerdem nur 55% des gesamten eIF2B in den Foci lokalisieren (Campbell et al., 2005), müsste der Anteil des Foci-lokalierten eIF2 deutlich unter 10% des gesamten eIF2 liegen. Tatsächlich wurde aber bei Aminosäuremangel beobachtet, dass 35% von eIF2 in den Foci lokalisieren (Campbell et al., 2005). Dies wirft die interessante Frage auf, ob weitere Protein-Protein-Interaktionen an der Lokalisation von eIF2 in den Foci beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit stand die Rolle von Cdc123 für die Lokalisation von eIF2 in den Foci im Vordergrund. In der Tat führte die Beeinträchtigung von Cdc123 (durch Verwendung des *cdc123Δ327*-Allels) zu einer deutlich reduzierten Bildung von eIF2-Foci: Die Foci traten später und in einem geringeren Anteil der Zellen auf. Nachdem Cdc123 selbst nicht in den Foci lokalisiert (S. Weinzierl, unpublizierte Daten), ist eine Verankerung von eIF2 über Cdc123 in den Foci auszuschließen. Die Phosphorylierung von Sui2 bei Aminosäuremangel wurde durch *cdc123Δ327* ebenfalls nicht beeinträchtigt (vgl. auch 5.5.3). Wahrscheinlich ist die verringerte Assoziation der eIF2-Untereinheiten in *cdc123*-Mutanten also der Grund für die reduzierte Foci-Bildung:

Bei Immunpräzipitationen nach Wachstum der Zellen in Vollmedium wurde beobachtet, dass die Interaktion von eIF2 mit eIF2B bei verringriger Cdc123-Funktion reduziert ist (vgl. 4.3.1 + 4.3.3). Dies deutet darauf hin, dass nur heterotrimere eIF2-Komplexe effizient mit eIF2B interagieren und dass deshalb auch nur eIF2-Heterotrimere, nicht aber monomeres Sui2 bei Aminosäuremangel in den Foci lokalisieren. Vermutlich ist Cdc123 also nicht direkt, sondern indirekt über die Gewährleistung der eIF2-Integrität an der Bildung der eIF2-Foci beteiligt.

### 5.5.2 Die Rolle von Cdc123 und eIF2 bei Glukosemangel

Nicht nur bei Aminosäuremangel, sondern auch bei Glukosemangel scheinen Cdc123 und eIF2 eine wichtige Rolle zu spielen: Bei der Überexpression von *SUI2* und *GCD11* trat nach längerer Inkubation in Vollmedium mit Raffinose und / oder Galaktose als Kohlenstoffquelle eine Derepression der *GCN4*-Expression auf, in Vollmedium mit Glukose jedoch nicht. Dieser Effekt war nur in Anwesenheit von Cdc123, nicht aber bei *cdc123Δ*-Stämmen zu beobachten. Im Gegensatz zur Situation bei Aminosäuremangel scheint die Phosphorylierung von eIF2 in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen: Es gibt zwar Untersuchungen, dass die Phosphatasen Glc7 und Sit4, welche eIF2 $\alpha$  dephosphorylieren, nach einem Wechsel aus Glukose- in Galaktosemedium inhibiert werden (Cherkasova et al., 2010), dies kommt jedoch nicht als Erklärung für den hier beobachteten Anstieg der *GCN4*-Expression in Frage, da dieser unabhängig von der Kinase Gcn2 auftritt und nicht mit der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  korreliert.

Die Derepression der *GCN4*-Expression in Raffinose/Galaktosemedium trat bei gemeinsamer Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von Cdc123 auf. Unter diesen Bedingungen

sollte besonders viel eIF2-Komplex vorhanden sein, da sowohl Cdc123, als auch erhöhte Mengen an eIF2 $\alpha$  und eIF2 $\gamma$  die Assemblierung von eIF2 unterstützen. Möglicherweise bilden sich bei Überexpression von *SUI2* und *GCD11* hauptsächlich  $\alpha\gamma$ -Dimere, allerdings trat die Derepression der *GCN4*-Expression auch bei zusätzlicher Überexpression von *SUI3* auf, d.h. das Ungleichgewicht der eIF2-Untereinheiten und die daraus resultierende Akkumulation von Dimeren kann nicht das entscheidende Kriterium sein. Für die Bildung des ternären Komplexes wird im Allgemeinen der Nukleotidaustausch durch eIF2B als limitierender Schritt angesehen (Pavitt, 2005). Demnach könnte eine erhöhte Menge an eIF2-Komplex zu einer Akkumulation von eIF2-GDP führen, welches dann möglicherweise an weitere Faktoren der Translationsinitiation bindet, z.B. an die Initiator-tRNA oder Komponenten des MFC. Da eIF2 in diesen Komplexen jedoch in GDP-gebundener Form vorliegt, sind die gebildeten Komplexe nicht funktionsfähig. Auf diese Weise könnten die anderen Initiationsfaktoren in unproduktiven Komplexen gebunden werden, was ihre Verfügbarkeit für die Bindung an eIF2-GTP zur Bildung von funktionsfähigen Translationsinitiationskomplexen beeinträchtigen könnte. Da die Initiator-tRNA in etwa zehnfachem Überschuss zu eIF2 vorliegt (Singh et al., 2007), ist sie vermutlich kein limitierender Faktor. Eine Quantifizierung von Translationsinitiationsfaktoren durch Vergleich der Mengen an epitopmarkierten Proteinen ergab hingegen, dass eIF1 und eIF5 in ähnlicher Menge wie eIF2 vorhanden sind und die Menge an eIF3 sogar geringer ist (Singh et al., 2007). Demnach könnte die Sequestrierung dieser Initiationsfaktoren durch erhöhte Mengen an eIF2-GDP ihre Verfügbarkeit für die Translationsinitiation beeinträchtigen. Besonderes Augenmerk verdient eIF5: Dieser Faktor bindet an eIF2-GDP und verhindert als GDI die Dissoziation von GDP (Jennings und Pavitt, 2010b). Anhand von Co-Immunpräzipitationen wurde geschätzt, dass nur 22% aller eIF2-eIF5-Komplexe Initiator-tRNA gebunden haben und dass demnach der Großteil der eIF2-eIF5-Komplexe in GDP-gebundener Form vorliegt (Singh et al., 2007). Bei einem Anstieg an eIF2-GDP könnte sich somit die Zahl der eIF2-GDP-eIF5-Komplexe weiter erhöhen und die Verfügbarkeit an freiem eIF5 für die Bindung an den ternären Komplex reduzieren.

Unerwarteterweise hatte die Menge an Sui3 keinen wesentlichen Einfluss auf die Derepression der *GCN4*-Expression, obwohl Sui3 an der Interaktion mit eIF1, eIF3 und eIF5 beteiligt ist (Hinnebusch et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass die entscheidenden Interaktionen in diesem Kontext also durch die  $\alpha$ - und / oder  $\gamma$ -Untereinheit von eIF2 vermittelt werden. Zum Beispiel ist bekannt, dass eIF5 bei Überexpression von *GCD11* auch mit monomerem eIF2 $\gamma$  interagiert (Jennings und Pavitt, 2010b).

Ein wesentlicher, bisher noch nicht berücksichtigter Aspekt ist, dass die *GCN4*-Derepression nur in Medien ohne Glukose auftrat. Möglicherweise ist die Aktivität von eIF2B unter diesen Bedingungen besonders limitierend, weshalb eIF2-GDP stärker akkumuliert. Zwar konnte eine Rolle der eIF2-Phosphorylierung ausgeschlossen werden, eventuell ist jedoch eIF2B selbst das Ziel einer

regulatorischen Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle: Die Untersuchung von Gcd2 (eIF2B $\delta$ ) ergab Hinweise auf eine Phosphorylierung dieser eIF2B-Untereinheit in Raffinose/Galaktosemedium, welche in Glukosemedium nicht auftrat (vgl. Anhang 9.2.8.4). Auch sind bereits andere Mechanismen zur direkten Regulation der eIF2B-Aktivität bekannt: So wird eIF2B in Hefe durch Fuselalkohole, welche Endprodukte des Aminosäurekatabolismus darstellen und sich bei Verwendung von Aminosäuren als Stickstoffquelle anhäufen, inhibiert, wobei die  $\gamma$ -Untereinheit eine noch nicht genau verstandene Rolle spielt (Pavitt, 2005). Bei Säugern stimuliert Insulin die Translation, indem es die inhibitorische Phosphorylierung von eIF2B $\epsilon$  durch die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) verhindert (Cohen und Frame, 2001). Somit könnte es sowohl in Hefe, als auch in Säugern eine Regulation der eIF2B-Aktivität durch die Glukoseverfügbarkeit geben: In Hefe bedingt Glukosemangel die (vermutlich inhibitorische) Phosphorylierung von eIF2B $\delta$  und in Säugern führt Glukosemangel über die reduzierte Aktivität des Insulinsignalwegs zur inhibitorischen Phosphorylierung von eIF2B $\epsilon$ . Auch wenn es Hinweise auf eine Kohlenstoffquellen-abhängige Modifikation von eIF2B und damit auf eine mögliche Regulation der eIF2B-Aktivität gibt, unterschied sich die GCN4-Expression in einem Wildtypstamm nicht zwischen Glukose- und Raffinose/Galaktose-medium. Dies deutet auf weitere Mechanismen zur Anpassung der Translationsinitiation an die Kohlenstoffquelle hin.

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine erhöhte Menge an eIF2-Komplex (oder möglicherweise auch  $\alpha\gamma$ -Dimeren) bei Glukosemangel schädlich ist. Wenn die Hypothese, dass dies auf die Sequestrierung anderer Translationsinitiationsfaktoren durch erhöhte Mengen an eIF2-GDP zurückgeht, zutreffend ist, so müsste die Überexpression der entsprechenden Initiationsfaktoren dies ausgleichen. Zumindest für die monomeren Initiationsfaktoren eIF1 und eIF5 sollte sich dies leicht überprüfen lassen. Außerdem verdient die mögliche Regulation von eIF2B durch die Kohlenstoffquelle eine eingehendere Untersuchung. Die Aufklärung der übergeordneten Signaltransduktionsprozesse könnte sich jedoch auf Grund der Komplexität der Signalwege zur Glukoseverfügbarkeit (Santangelo, 2006; Zaman et al., 2008) schwierig gestalten.

### 5.5.3 Cdc123 und die Phosphorylierung von eIF2

Die Phosphorylierung von Sui2 (eIF2 $\alpha$ ) ist ein wesentlicher Mechanismus zur Regulation der Translationsinitiation bei Aminosäuremangel und anderen Stresssituationen (Hinnebusch, 2005). Auf Grund des funktionellen Zusammenhangs von Cdc123 und eIF2 wäre ein Einfluss von Cdc123 auf die eIF2-Phosphorylierung möglich. In der Tat weisen Stämme mit dem *cdc123Δ327*-Allel in SD-Medium eine verringerte Sui2-Phosphorylierung auf (vgl. Abb. 4.27) und in XYD-Medium wurde dies ebenfalls beobachtet (Richter, 2006). Die basale Sui2-Phosphorylierung unter guten Wachstumsbedingungen wird also durch *cdc123Δ327* reduziert. Bei einer Behandlung mit Rapamycin, welche über Inhibition

des TOR-Signalwegs zur Dephosphorylierung und Aktivierung von Gcn2 führt (Cherkasova und Hinnebusch, 2003), trat die Sui2-Phosphorylierung in einem *cdc123Δ327*-Stamm verzögert auf, erreichte aber schließlich das gleiche Niveau wie im Wildtyp (Richter, 2006). Diese Daten weisen darauf hin, dass Cdc123-Defekte die Sui2-Phosphorylierung beeinträchtigen. Als mögliche Ursache wurde in Betracht gezogen, dass Cdc123-Defekte die Assoziation der eIF2-Untereinheiten verringern und monomeres Sui2 ein schlechteres Substrat für die Gcn2-Kinase sein könnte (Richter, 2006). Im Gegensatz zur Behandlung mit Rapamycin wurde bei Aktivierung von Gcn2 durch Aminosäuremangel keine Verzögerung der Sui2-Phosphorylierung beobachtet (vgl. 4.9.1), wobei eine eindeutige Aussage durch den extrem schnellen Anstieg der Sui2-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen erschwert wird. Auch wenn *cdc123Δ327* die Assoziation der eIF2-Untereinheiten verringert, wird die Phosphorylierung von Sui2 bei Aminosäuremangel davon nicht wesentlich beeinflusst. Anders als z.B. eIF2B, welches bei verringrigerter Assoziation der eIF2-Untereinheiten schlechter mit diesen interagiert (vgl. 4.3.1 + 4.3.3), scheint die Kinase Gcn2 auch monomeres Sui2 effizient binden zu können. In der Tat gibt es verschiedene Hinweise, dass Gcn2 (und andere eIF2 $\alpha$ -Kinasen) monomeres Sui2 binden und phosphorylieren können. So trat bei Überexpression von *SUI2* (und *GCD11*) in XYD ein Anstieg von phosphoryliertem Sui2 proportional zur gesamten Sui2-Menge auf (vgl. Abb. 4.29). Sowohl Gcn2, als auch die verwandte humane Kinase PKR phosphorylieren *in vitro* GST-Sui2, welches rekombinant in *E. coli* hergestellt wurde (Krishnamoorthy et al., 2001; Dey et al., 2005). Bei Expression im Baculovirussystem interagiert humanes eIF2 $\alpha$  mit seinen Kinasen PKR und PERK (Suragani et al., 2005) und wird von PERK unabhängig von der Anwesenheit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten von eIF2 phosphoryliert (Suragani et al., 2006). Mittlerweile konnte sogar die Struktur eines Komplexes aus PKR und eIF2 $\alpha$  bestimmt werden (Dar et al., 2005). Außerdem spricht die Lage der Interaktionsflächen gegen eine Nähe von Gcn2 zu eIF2 $\gamma$  (und eIF2 $\beta$ ), da die Phosphatakzeptorstelle (Serin 51) und weitere Erkennungssequenzen für Gcn2 in Domäne 1 von Sui2 liegen, während die Interaktion mit Gcd11 über Domäne 3 am entgegengesetzten Ende von Sui2 stattfindet (Dhaliwal und Hoffman, 2003; Yatime et al., 2006). Tatsächlich wird ein N-terminales Sui2-Fragment (Aminosäuren 1-200) *in vivo* von Gcn2 genauso gut phosphoryliert wie Wildtyp-Sui2 (Dey et al., 2005). Da dem Fragment große Teile der Domäne 3 (Aminosäuren 178-304) fehlen, kann es wahrscheinlich nicht mit Gcd11 interagieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Inkorporation von Sui2 in den eIF2-Komplex nicht strikt notwendig für seine Phosphorylierung ist. Die beobachtete Verringerung der basalen Sui2-Phosphorylierung in *cdc123*-Mutanten könnte jedoch darauf hinweisen, dass Gcn2 eine gewisse Präferenz für den eIF2-Komplex hat, welche sich insbesondere bei niedriger Gcn2-Aktivität auswirkt.

Für den Phosphorylierungsstatus von eIF2 $\alpha$  spielen neben den Kinasen auch deren Antagonisten, die Phosphatasen, eine wichtige Rolle, welche jedoch weit weniger gut erforscht ist. Im Gegensatz zu

den spezialisierten eIF2 $\alpha$ -Kinasen haben die Phosphatasen eine breite Substratspezifität. In Hefe wurden die Phosphatasen Glc7 (PPase 1 $\alpha$ ) und Sit4 (PPase 2) mit der Dephosphorylierung von Sui2 in Verbindung gebracht und gezeigt, dass deren Inhibition in Galaktosemedium an der Regulation der Sui2-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle beteiligt ist (Cherkasova et al., 2010). Ob die Phosphatasen jedoch mit Sui2 in monomerer Form oder im eIF2-Komplex interagieren, ist nicht bekannt. Sollten die eIF2 $\alpha$ -Kinasen und -Phosphatasen sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von der Sui2-Inkorporation in den eIF2-Komplex unterscheiden, so würde die Assemblierung von eIF2 auch dessen Phosphorylierungsstatus beeinflussen. Wie bereits erwähnt, bewirken *cdc123*-Mutanten, welche zu einer verringerten Assoziation der eIF2-Untereinheiten führen, eine Verringerung der basalen Sui2-Phosphorylierung. Dies könnte entweder auf eine verringerte Kinaseaktivität oder eine erhöhte Phosphataseaktivität bei monomerem Sui2 zurückzuführen sein. Dieses Modell eröffnet die interessante Möglichkeit, die Phosphorylierung von eIF2 durch Veränderung des Verhältnisses von eIF2-Komplex zu monomerem eIF2 zu modulieren, wofür der eIF2-Assemblierungsfaktor Cdc123 eine wichtige Rolle spielen könnte.

## 5.6 Eine potentielle Rolle von Cdc123 in der Humanpathologie

Bei Säugern ist ein Zusammenhang von Störungen der regulatorischen Phosphorylierung von eIF2 mit der Entwicklung von Typ II Diabetes etabliert (Harding und Ron, 2002; Shi et al., 2003): In sekretorischen Zellen, wie den Insulin-produzierende  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln in der Bauchspeicheldrüse, sind die eIF2 $\alpha$ -Kinase PERK und die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  wichtig, um eine Überladung und Schädigung des ER zu vermeiden. Bei starker Insulin-Produktion kann die Akkumulation von ungefalteten Proteinen, insbesondere Insulin-Vorläufern wie Proinsulin, im ER zu sogenanntem ER-Stress führen, woraufhin die Kinase PERK aktiv wird und eIF2 $\alpha$  phosphoryliert. Dies hat einerseits die Verringerung der generellen Translation und damit der Proteinsynthese zur Folge. Andererseits wird der Transkriptionsfaktor ATF4, welcher ähnlich wie Gcn4 in Hefe über uORFs in der mRNA reguliert wird, unter diesen Bedingungen verstärkt translatiert und induziert die Expression von Genen der unfolded protein response (UPR), wodurch unter anderem Chaperone und ER-Strukturkomponenten verstärkt synthetisiert werden. Durch diese Maßnahmen wird die Integrität des ER gewahrt. Störungen dieses Regulationsweges führen zur Überlastung des ER und schließlich zum Absterben der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen, wodurch Diabetes entsteht (Harding und Ron, 2002; Shi et al., 2003; Scheuner et al., 2005).

So konnte das humane Wolcott-Rallison-Syndrom (WRS) auf Mutationen im Gen für die Kinase PERK zurückgeführt werden. Ein wesentliches Merkmal dieser seltenen autosomal rezessiven Erbkrankheit ist die Entwicklung von Diabetes im frühen Kindesalter (Delepine et al., 2000). Der Zusammenhang

von PERK und der Entwicklung von Diabetes konnte auch bei Mäusen beobachtet werden: Bei  $\text{PERK}^{-/-}$ -Mäusen verschlechterte sich die glykämische Kontrolle in den ersten vier Wochen nach der Geburt. Im Vergleich zu Kontrolltieren war bei den  $\text{PERK}^{-/-}$ -Mäusen der Blutglukosespiegel erhöht und der Seruminsulinspiegel erniedrigt, was sich auf das fortschreitende Absterben von  $\beta$ -Zellen zurückführen ließ (Harding et al., 2001).

Auch eine nicht-phosphorylierbare Variante von eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -S51A) wurde im Mausmodell untersucht: Homozygote Träger der Mutation starben innerhalb von 18 Stunden nach der Geburt. Sie wiesen einen reduzierten Anteil an  $\beta$ -Zellen in den Langerhans-Inseln und niedrige Seruminsulinspiegel auf (Scheuner et al., 2001). Heterozygote Träger der Mutation waren lebensfähig, die Mäuse entwickelten aber bei fettreicher Nahrung Übergewicht und Diabetes. Da bei fettreicher Nahrung der erhöhte Spiegel an Fettsäuren im Blut die Insulinsensitivität der Zellen verringert, muss dies durch erhöhte Insulinproduktion und -Sekretion kompensiert werden. Dadurch wird das ER der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen unter diesen Bedingungen stark belastet. Bei Vorliegen des nicht-phosphorylierbaren eIF2 $\alpha$ -S51A kann die ER-Stressantwort nicht aktiviert werden. Die resultierende Überlastung des ER mit ungefalteten Proteinen führt schließlich zum Absterben der  $\beta$ -Zellen und damit zu verringrigerter Insulin-Sekretion und Entwicklung von Diabetes (Scheuner et al., 2005).

Interessanterweise wurde eine potentielle Verbindung von *CDC123* und Diabetes entdeckt: Eine Meta-Analyse von drei genomweiten Assoziationsstudien von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) und dem Risiko für Typ II Diabetes ergab, dass ein SNP in der intergenischen Region zwischen *CDC123* und *CAMK1D* mit dem Diabetes-Risiko korreliert. Deshalb wurde der *CDC123/CAMK1D*-Lokus als „candidate risk locus“ für Typ II Diabetes eingestuft (Zeggini et al., 2008). Die Untersuchung von homozygoten Trägern des Risikoallels zeigte, dass diese im Vergleich zu Kontrollpersonen einen verringerten Seruminsulinspiegel nach Glukosegabe aufwiesen, vermutlich auf Grund von reduzierter  $\beta$ -Zellmasse (Grarup et al., 2008; Simonis-Bik et al., 2010). Somit ist es denkbar, dass das Risikoallel über eine veränderte Expression von *CDC123* Auswirkungen auf eIF2 hat, welche die ER-Stressantwort beeinträchtigen und zur Entstehung von Diabetes beitragen.

## 6. MATERIAL

### 6.1 Antikörper und Antiseren

#### 6.1.1 Primäre Antikörper und Antiseren

Name	Verdünnung	Beschreibung
12CA5 ( $\alpha$ -ha)	1:100	Monoklonaler Mausantikörper gegen das ha-Epitop (Field et al., 1988)
9E10 ( $\alpha$ -myc)	1:100	Monoklonaler Mausantikörper gegen das myc-Epitop (Evan et al., 1985)
M2 ( $\alpha$ -flag)	1:10000	Monoklonaler Mausantikörper gegen das flag-Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
tetra-His ( $\alpha$ -his)	1:2000	Monoklonaler Mausantikörper gegen 4- oder 6xHistidin (QIAGEN GmbH, Hilden)
$\alpha$ -Cdc123 (Antiserum)	1:1000 – 1:2000	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Cdc123 (diese Arbeit)
$\alpha$ -Cdc123 (gereinigt)	1:1000 – 1:2000	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenantiserum gegen Cdc123 (diese Arbeit)
$\alpha$ -Gcd11 (Antiserum)	1:5000	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Gcd11 (Hannig et al., 1993)
$\alpha$ -Gcd11 (gereinigt)	1:5000	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenantiserum gegen Gcd11 (diese Arbeit)
$\alpha$ -GST	1:4000	Monoklonaler Mausantikörper gegen Glutathion-S-Transferase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
$\alpha$ -LexA	1:5000	Monoklonaler Mausantikörper gegen die LexA-DNA-Bindedomäne (MoBiTec GmbH, Göttingen)
$\alpha$ -Sui2	1:5000 – 1:10000	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Sui2 (Cigan et al., 1989)
$\alpha$ -Sui2-S51(P)	1:2000	Phosphospezifisches polyklonales Kaninchenantiserum gegen an Serin 51 phosphoryliertes Sui2 (Biosource, Camarillo USA)
$\alpha$ -Sui3	1:5000	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Sui3 (Hashimoto et al., 2002)

**Tabelle 6.1: Liste der verwendeten primären Antikörper**

Die angegebene Verdünnung bezieht sich auf die Verwendung im Western Blot. Die Herstellung und Affinitätsreinigung von Antiseren im Rahmen dieser Arbeit ist im Anhang (Kapitel 9.3) beschrieben.

#### 6.1.2 Sekundäre Antikörper

Folgende sekundäre Antikörper wurden bei der Western-Blot-Analyse eingesetzt:

Name	Verdünnung	Quelle
Schaf- $\alpha$ -Kaninchen-IgG-HRP	1:5000	Dianova, Hamburg
Schaf- $\alpha$ -Maus-IgG-HRP	1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IRDye®680	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IRDye®800CW	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- $\alpha$ -Maus-IRDye®800CW	1:5000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

**Tabelle 6.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper**

## 6.2 Nukleotide

dNTPs	New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Burlington (Canada)
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligonukleotide (vgl. 6.8)	MWG-Biotech AG, Ebersberg

## 6.3 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas, Burlington (Canada)
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Color Plus Proteinmarker	New England Biolabs, Ipswich (USA)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
λ-Protein Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Lysozym	Fluka, Deisenhofen
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd (Dänemark)
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich (USA) Fermentas, Burlington (Canada)
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq-Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck

## 6.4 Chemikalien

Aceton <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösungen:	
30% 37,5:1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
30% 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose ultra pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AminoLink Coupling Gel	Pierce (Perbio, Thermo Scientific), Rockford (USA)
Aminosäuren	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Amylose Resin E8021S	New England Biolabs, Ipswich (USA)
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
BM Chemiluminescence Blotting Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
clonNAT (Nourseothricin)	Werner BioAgents, Jena
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DMFA (Dimethylformamid)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA (Ethylenediamintetraacetat)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Euroagar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Formaldehyd (37%)	Fluka, Deisenhofen
G418-Sulfat (Kanamycin)	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt
D-Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
D-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Glycerolphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin <i>p.a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
HIS-Select™ Cartridge (1.25 ml Column)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydroxyharnstoff (HU)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Imidazol	Fluka, Deisenhofen und AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalakto-pyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Milchunion eG Lasana, Everswinkel
Manganchlorid-Tetradhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MMS (Methylmethansulfonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mounting Medium	Southern Biotechnology, Birmingham
myo-Inositol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt

Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nocodazol	Fluka, Deisendorf
ONPG (2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
p-Aminobenzoësäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
p-Phenylendiamin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyethylenlykol PEG 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
ProteinA-Agarose	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz (USA)
D-Raffinose-Pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Rapid Stain™	G-Biosciences, St. Louis (USA)
D-Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D-Sorbitol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
S/W Filmentwickler und Fixierer	Adefo Chemie GmbH, Tetenal
Sytox Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	Fluka, Deisenhofen
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	USB Corporation, Staufen
Tween 20	Fluka, Deisenhofen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uracil	AppliChem GmbH, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylen-Cyanol FF	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Yeast Nitrogen Base	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)

## 6.5 Verbrauchsmaterialien

1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Reagiergefäße	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
10 µl, 100 µl, 1000 µl Pipettenspitzen	G. Kisker GbR, Steinfurt
15 ml, 50 ml Falcon Tube	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Biomax-10K NMWL Membrane 0.5 ml	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Deckgläser 22 x 22 mm	Marienfeld GmbH & Co. KGm Lauda-Königshofen
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
DV-B BLUE Röntgenfilme	Typon Röntgenfilm GmbH, Grünstadt
Elektroporationsküvetten	Equibio, Maidstone Kent (UK)
Glasperlen (0,45 – 0,5 mm)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Braun Biotech, Melsungen

GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Greiner LIA Plate white 96-well	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Immersionsöl 518N	Zeiss, Jena
Impfösen steril 1 µl	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
JETSPIN PLASMID Midi-Prep Kit	Genomed GmbH, Löhne
Küvetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Nucleo Spin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
PCR Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen 92 x 16 mm (mit Nocken)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel Nalge Nunc International Corp., Rochester (USA)
Whatman GB004 und GB005	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel

## 6.6 Geräte und Software

### 6.6.1 Geräte

Brutschrank Tv50b	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Brutschrank WB 120 K	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt
Digitalcamera E-500	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer CA-III und CyFlow Space	Partec, Münster
Elektroblotapparatur Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Elektroporationsapparatur Easyject Prima	Equibio, Maidstone Kent (UK)
French Press	American Instrument Company, Silver Spring (USA)
Frogger	DAN-KAN Corp., Massachusetts (USA)
Gelapparatur für Agarosegele, HE33	Hoefer, San Francisco (USA)
Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel Twin G42	Biometra, Göttingen
Heizblock	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten Research® (variabel) 100 µl, 300 µl, 8-Kanal	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator MSM System	MSM System Singer Instruments

Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Imager M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Steuereinheit MS-2000	Applied Scientific Instrumentation, Eugene (USA)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer:	
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Novaspec II	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Pipetten Research® (variable) 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Retschmühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH, Haan
Rotator	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttelwasserbad Aquatron	Infors AG, Einsbach
Schüttelinkubator VorTemp56	Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Sonopuls-Ultraschall-Homogenisator HD2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät EV231 und EV243	Consort, Turnhout (Belgien)
Thermocycler	Techne Genius Thermo DUX, Wertheim
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée
Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Waage Kern EW6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc., Greifensee (Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Wippe	Bachhofer, Reutlingen
Wippe Rocky	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Wippschüttler ST 5 CAT	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Zentrifugen 5415 D, 5415 R und 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus, Hanau

## 6.6.2 Software

Axio Vision LE Rel. 4.7	Carl Zeiss Vision
Bio Edit Sequence Alignment Editor	Tom Hall Ibis Biosciences, Karlsbad
Clone Manager 6	Sci Ed Central (Scientific & Educational)
Corel Draw Graphics Suite X4	Corel Corporation 2008
Microsoft Office	Microsoft Corporation
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. national Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Odyssey Infrared Imaging System Application Software Version 3.0	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Photoshop CS2 (Version 9.0.2)	Adobe Systems Incorporated
WinMDI 2.8	Joe Trotter
Windows™ FloMax® Software	Partec, Münster

## 6.7 Medien, Puffer und Lösungen

### 6.7.1 Bakterienmedien

LB-Medium (autoklaviert)	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM
TB-Medium (autoklaviert)	Bacto Trypton	12 g/l
	Bacto Yeast Extract	24 g/l
	Glycerin	4 ml/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	72 mM
SOC-Medium (sterilfiltriert)	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde zu LB-Medium 1,7% Euroagar zugegeben. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen wurde nach dem Autoklavieren Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml in 50% Ethanol, Endkonzentration 100 µg/ml) oder Chloramphenicol (Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol, Endkonzentration 50 µg/ml in Flüssigmedium bzw. 34 µg/ml in Platten) zugefügt. Die Induktion des *rha*-Promotors erfolgte durch Zugabe von Rhamnose (Stammlösung 10%, Endkonzentration 0,2%).

## 6.7.2 Hefemedien und deren Stammlösungen

Vollmedium (XY) (autoklaviert)	Bacto Pepton Bacto Yeast Extract Tryptophan Adeninsulfat $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Zucker (nach dem Autoklavieren zugegeben)	20 g/l 10 g/l 200 mg/l 100 mg/l 10 mM 20 g/l
Selektivmedium (S)	10x Yeast Nitrogen Base (YNB) 10x Drop-out - 5 Zucker Adenin Histidin Leucin Tryptophan Uracil	100 ml/l 100 ml/l 20 g/l 50 mg/l 50 mg/l 100 mg/l 100 mg/l 50 mg/l
Selektivmedium ohne Methionin (S-met)	10x Yeast Nitrogen Base (YNB) 10x CSM - 7 Zucker Adenin Histidin Leucin Lysin Tryptophan Uracil	100 ml/l 100 ml/l 20 g/l 50 mg/l 50 mg/l 100 mg/l 50 mg/l 100 mg/l 50 mg/l

Als Zucker wurden folgende autoklavierte Stammlösungen eingesetzt: Glukose (20%), Galaktose (20%), Raffinose (10%) und Saccharose (10%). Zur Herstellung von festen Medien wurde 1,7% Bactoagar zugegeben.

Zur Selektion auf Auxotrophiemarker wurde Selektivmedium ohne die entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen verwendet (Abkürzungen zur Bezeichnung der Medien: A = Adenin, H = Histidin, L = Leucin, T = Tryptophan und U = Uracil). Zur Selektion auf Resistzenzen wurden Toxine in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- G418            500 µg/ml für den Stammhintergrund W303  
                  200 µg/ml für den Stammhintergrund S288c
- clonNAT        100 µg/ml

Für die Mikroskopie von lebenden Zellen wurden folgende Varianten des SD-Mediums eingesetzt:

SD++	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l
	10x Drop-out ++	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
SD-aa	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
	Adenin	50 mg/l
	Uracil	50 mg/l

Bei der Sporulation fanden folgende Medien Anwendung:

Präsporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Pepton	3 g/l
	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Glukose	100 g/l
	Adeninsulfat	50 mg/l
Sporulationsmedium (sterilfiltriert)	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	Glukose	0,5 g/l
	10x Drop-out ++	10 ml/l

#### Stammlösungen zur Herstellung von Hefemedien:

\* = autoklaviert, alle anderen Stammlösungen wurden sterilfiltriert

100x Adenin	Adeninsulfat	5 g/l
clonNAT	clonNAT	200 mg/ml
10x CSM - 7	Arginin	0,5 g/l
	Aspartat	0,8 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Threonin	1,0 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1,4 g/l
10x Drop-out ++	10x Drop-out - 5 mit: Adenin	0,5 g/l
	Histidin	0,5 g/l
	Leucin	1,0 g/l
	Tryptophan	1,0 g/l
	Uracil	0,5 g/l

10x Drop-out - 5	Alanin Arginin Asparagin Aspartat Cystein Glutamin Glutamat Glycin (myo-)Inositol Isoleucin Lysin Methionin p-Aminobenzoësäure Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tyrosin Valin	0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1,0 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1,0 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 0,5 g/l 50 mg/l 0,5 g/l 0,5 g/l 1,0 g/l 1,0 g/l 0,5 g/l 1,0 g/l
G418	G418-Sulfat	200 mg/ml
20% Galaktose *	Galaktose	20 g/l
20% Glukose *	Glukose-Monohydrat	20 g/l
100x Histidin	Histidin	5 g/l
100x Leucin	Leucin	10 g/l
100x Lysin	Lysin	5 g/l
10% Raffinose *	Raffinose	10 g/l
10% Saccharose *	Saccharose	10 g/l
100x Tryptophan	Tryptophan	10 g/l
50x Uracil	Uracil	2,5 g/l
10x YNB	Yeast Nitrogen Base Ammoniumsulfat	17g/l 50g/l

### 6.7.3 Puffer und Lösungen

10x DNA-Ladepuffer (10x LP)	Glycerin EDTA Tris/HCl pH 7,8 EDTA Bromphenolblau optional: Xylen Cyanol FF	50 % 1 mM 10 mM 1 mM 2,5 mg/ml 2,5 mg/ml
--------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------

EasyPrep-Puffer	Tris/HCl pH 8,0 EDTA Saccharose Lysozym RNase A BSA	10 mM 1 mM 150 mg/ml 2 mg/ml 0,2 mg/ml 0,1 mg/ml
HIS-Puffer	NaP <sub>i</sub> pH 8,0 NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 10 mM
λ-Phosphatase-Puffer	HEPES pH 7,5 MnCl <sub>2</sub> DTT	50 mM 2 mM 5 mM
2x LSB (Laemmli-Auftragspuffer)	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	120 mM 40 mg/ml 200 mg/ml 400 µg/ml 100 µl/ml
MBP-Puffer	Tris/HCl pH 7,4 NaCl EDTA DTT	20 mM 200 mM 1 mM 1 mM
Mounting Medium mit DAPI	Glycerin PBS p-Phenyldiamin DAPI	900 mg/ml 0,1% 1 mg/ml 100 µg/ml
Novozym-Lösung	Sorbitol Tris/HCl pH 7,5 EDTA DTT Novozym	1 M 10 mM 1 mM 50 mM 2 mg/ml
PBS (1x)	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 7,2 mit NaOH eingestellt	100 mM 33 mM 17 mM
PEG/LiAc	10x TE 1M LiAc pH 7,5 50% Polyethylenglykol 3350	100 ml/l 100 ml/l 800 ml/l
Ponceau S	Ponceau S Eisessig	1 g/l 50 ml/l
Proteinase K	Proteinase K Tris/HCl pH7,5 Calciumacetat	10 mg/ml 10 mM 1 mM

Puffer 3	NaCl Tris/HCl, pH 7,5 NaF EDTA Igepal CA-630 $\beta$ -Glycerophosphat (optional)	150 mM 50 mM 50 mM 5 mM 0,1 % 60 mM
RNase A	RNase A Tris/HCl pH 7,5 NaCl	10 mg/ml 10 mM 15 mM
50x TAE	Tris-Base EDTA pH = 8,0 mit Eisessig eingestellt	2 M 50 mM
10x TBS	Tris-Base NaCl pH = 7,6 mit HCl eingestellt	200 mM 1,37 M
TBS-T	10x TBS 10% Tween20	100 ml/l 10 ml/l
10x TE	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
TE/LiAc	10x TE 1M LiAc pH7,5	100 ml/l 100 ml/l
TE/SDS	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA SDS	100 mM 10 mM 10 g/l
Transferpuffer	Glycin Tris-Base SDS Methanol	2,9 g/l 5,8 g/l 0,37 g/l 100 ml/l
10x Turbo-LRB	Tris-Base Glycin SDS	250 mM 9,46 M 10 g/l
Z-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> $\beta$ -Mercaptoethanol	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM 50 mM

## 6.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
WS84	TTC CCA GTC ACG ACG TTG	Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS85	CAC ACA GGA AAC AGC TAT G	
WS100	TTGCTGAGTGGAGATGCC	Sequenzierung von pJG4-5-Derivaten
WS638	TCTAACAGGCAAAGGAAGAAAGCAGTGATAGTGAGA ATGAAACT CGGATCCCCGGGTTAATTAA	C-terminale Epitopmarkierung von Cdc123 (Longtine et al., 1998)
WS639	ACAGGGTAATAAAAAGACGAATATATTCAAATGCGGGT TCTAAAT GAATTGAGCTCGTTAAC	
WS821	ATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAG	R-Primer in <i>pTEF2</i> , zur Überprüfung der Integration von pFA-Kassetten
WS826	AGTCACATCAAGATCGTTATGG	Bestimmung des Paarungstyps (MAT-PCR) (Huxley et al., 1990)
WS827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	
WS828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	
WS978	GGTTGGGCAACCATTAAAAAGGGTACTACATTGGAACC CATCGCT CGGATCCCCGGGTTAATTAA	C-terminale Epitopmarkierung von Gcd11 (Longtine et al., 1998)
WS979	CCAGAAGTGTCAAGTTCCCTCCTCTAGCCCGTTCTTA TCTTC GAATTGAGCTCGTTAAC	
WS1015	GAAGATTGCTTGTGAGACGTATC	Überprüfung der C-terminalen Epitopmarkierung von Gcd11
WS1072	AAGTGTACGG ATGTATACAA CAGGG	Amplifikation der <i>SLX8</i> -Deletion aus genomischer DNA
WS1073	TTGTGTAGATGGTCAAATTCTCG	
WS1091	AGAATTGAAGGAGACGGCTCTAATAG	Überprüfung der <i>SLX8</i> -Deletion
WS1122	GGAATTCATGCTCACAAGAATATACAA	F-Primer für <i>CDC123</i> , EcoRI
WS1123	CCGCTCGAGCTAAGTTCTTCACTATCA	R-Primer für <i>CDC123</i> (mit Stop-Codon), Xhol
WS1139	GGGAATTGGATCCATGAGTGACTTACAAGACCAAGAA CC	F-Primer für <i>GCD11</i> , EcoRI
WS1140	CGTAGTCGACTTAAGCGATGGGTTCCAATGTAGTAC	R-Primer für <i>GCD11</i> (mit Stop-Codon), Sall
WS1155	TATACCGACGAGTACGAGTACGAAGATGACGGATTATT TGAGCGT CGGATCCCCGGGTTAATTAA	C-terminale Epitopmarkierung von Gcd1 (Longtine et al., 1998)
WS1156	TACTTACTTGGTCTCTATTAAAGAGACTGAAGGAATATA CATAAG GAATTGAGCTCGTTAAC	
WS1159	GTTCAAAGTGTCACTTCTCATCTG	Amplifikation der <i>SLX5</i> -Deletion aus genomischer DNA
WS1160	ACACAAATCCACTATATAAAACAAAGC	
WS1164	CCATATGAAAGAGACCATTGTATCG	Überprüfung der <i>SLX5</i> -Deletion
WS1241	CCG CTGCAGTTACTCGTCGTCTGACTCATC	R-Primer für <i>SUI2</i> (mit Stop-Codon), PstI
WS1242	CCG CTGCAGTCACATTCTCCTCTTCTTACC	R-Primer für <i>SUI3</i> (mit Stop-Codon), PstI
WS1384	GACCTGCAGAAGAAGGAGATACATATGACCAT	F-Primer für RBS-his6-Konstrukte (aus pJOE4056), PstI
WS1448	GC GGATCCATGAAAGCGTTAACGGCC	F-Primer für LexA (aus pEG202), BamHI

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
WS1449	CATAAATCATAAGAAATTGC	R-Primer in <i>tADH</i> (von pEG202), Xhol
WS1542	CCATAGGATGATAATGCGATTAG	F-Primer in <i>pGALL</i> , zur Überprüfung des Promotoraustausches
WS1581	CATGAATTCATGCAAGAACATAACACTTTATAGAT	F-Primer für <i>CDC123</i> ab AS 4, EcoRI-ATG
WS1582	CATGAATTCATGATCAAGCTACCCCAAGAGG	F-Primer für <i>CDC123</i> ab AS 57, EcoRI-ATG
WS1583	GCTCCAAGTAACTGG GCC GCACCAAGAGACGCTAC	Mutagenese von <i>CDC123</i> : S128A
WS1584	GTAGCGTCTTGGTGC GGC CCAGTTAACCTGGGAGC	
WS1597	GTGGATTGCCGGCTCGGC	Amplifikation der <i>SGS1</i> -Deletion aus genomischer DNA
WS1598	GCTAGACTGGATGACACTTATGG	
WS1599	CTGCCTGAGGTGGACCCGTG	Überprüfung der <i>SGS1</i> -Deletion
WS1643	GCGTAATACACCGTTAACATCGCGCATTAGAGGTAGAC ATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Promotoraustausch vor <i>GCD11</i> (Janke et al., 2004)
WS1644	GTTGATAATAATGCTAGGTTCTGGTCTTGTAAGTCACT CAT CGATGAATTCTCTGTCG	
WS1649	CCAAGCCAGTGAAGGCG	R-Primer in <i>GCD11</i> , zur Überprüfung des Promotoraustausches
WS1706	GCC GTCGAC TTA GATTCGATATCAGTATAATGTTG	R-Primer für <i>GCD11</i> bis AS 432 + Stop-Codon, Sall
WS1767	GGAAGGCCGATTCTTGCTATTGCCTGGAACGAGATT GCTGCGATAG	Mutagenese von <i>CDC123</i> : T274A+S280A
WS1768	CTATCGCAGCAATCTCGTCCAGGCAAATAGCAAAGAA TCGGCCTTCC	
WS1821	TAATTTCCGTTCCCTAACACATACTATGTATAA ATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Deletion von <i>GCN2</i> mittels pFA-System (Janke et al., 2004)
WS1822	AACTGATGCGTTATAGCGCCGCACAGATCTTAAAGGC CTA ATCGATGAATTGAGCTCG	
WS1823	TAAAAGTCTACGTATACCAGAAATCGAGAGGAAAGG ATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Deletion von <i>GCN3</i> mittels pFA-System (Janke et al., 2004)
WS1824	CTTTCTATTAAGTCATTGCGTGCATATATTATGTGA TTA ATCGATGAATTGAGCTCG	
WS1825	GGTGAATCAATCTATAAACAGCC	F-Primer vor <i>GCN2</i> zur Kontrolle der Deletion
WS1826	GTGCACGACTCTATCCAGGG	F-Primer vor <i>GCN3</i> zur Kontrolle der Deletion
WS1871	CGG CTCGAG CTA TTTTGAGTGAGCTCTGGATTG	R-Primer für <i>CDC123</i> bis AS 340 + Stop-Codon, Xhol
WS1872	CGG CTCGAG CTA CTCGGTGTACACAGACCTGG	R-Primer für <i>CDC123</i> bis AS 71 + Stop-Codon, Xhol
WS2009	GTGAAACTAAAAGTGCCTAAAAAGCGCTGACATAA ATTACTTATTG ATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Promotoraustausch vor <i>CDC123</i> (Janke et al., 2004)
WS2010	CTCTGTCACTGGTATATCTATAAAAGTTGTATATTCTG TGAGGA CAT CGATGAATTCTCTGTCG	

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
WS2031	CGTAAGAAATACGTTGTCAAAGAAGCGTCGATAATCAA ATTGCT ATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Promotorau austausch und N-terminale Epitopmarkierung von Gcd2 (Janke et al., 2004)
WS2032	CTTGGCGGTAGCCGACCTAGATTGGCTTCCGATTG GCT CAT CGATGAATTCTCTGTGTC	
WS2073	AAT GCAGGCCGC GGTTATATTGATTGTCCAACGT	F-Primer für <i>SUI2</i> ab bp 241, NotI
WS2074	CAT GAATTCTCGTCGACTCATCCTC	R-Primer für <i>SUI2</i> ohne Stop-Codon (bis bp 912), EcoRI
WS2104	CAT GAATTCCCT GATCGTCTTGTCCGGTCAAGT	F-Primer für <i>GCD11</i> ab AS 410, davor CCT(Prolin), EcoRI
WS2116	TTGTCGAGACGTATCGAAAAGCATTGGCGTTGATTGG TTGG CGGATCCCCGGGTTAATTAA	F-Primer für die C-terminale Verkürzung von Gcd11 auf 514 AS + Epitopmarkierung (Longtine et al., 1998)
WS2140	TAT GTCGAC TTA CCAACCAATCAAACGCCAATGC	R-Primer für <i>GCD11</i> bis AS 514 + Stop-Codon, Sall

Tabelle 6.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

## 6.9 Plasmide und Vektoren

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pAG25	pFA6a-natMX4	(Goldstein und McCusker, 1999)
pBluescript II KS+	<i>E. coli</i> -Vektor, high-copy, amp	(Alting-Mees und Short, 1989)
pEG(KG)	<i>pGAL1-GST-MCS, URA3, 2μ</i>	(Mitchell et al., 1993)
pEG202	<i>pADH-lexA-MCS-tADH, HIS3, 2μ</i>	(Ausubel et al., 2005)
pFA6a-ha3-HIS3MX6		(Longtine et al., 1998)
pFA6a-ha3-kanMX6		(Longtine et al., 1998)
pFA6a-kanMX6		(Longtine et al., 1998)
pFA6a-myc13-HIS3MX6		(Longtine et al., 1998)
pFA6a-natNT2		(Janke et al., 2004)
pJG4-5	<i>pGAL-AD-ha-MCS-tADH, TRP1, 2μ</i>	(Ausubel et al., 2005)
pJOE2955	<i>prha-mbp-MCS-trrn, amp</i>	(Wiese et al., 2001)
pJOE4056.2	<i>prha-his6-MCS-trrn, amp</i>	(Wegerer et al., 2008)
pWS1193	<i>pJOE2955-CDC123</i>	Sammlung
pWS1389	<i>pJOE4056-CDC123</i>	Sammlung
pWS1429 (p180)	<i>GCN4-lacZ, URA3, ARS/CEN</i>	(Hinnebusch, 1985)
pWS1463	<i>pEG202-CDC123</i>	Sammlung
pWS1483	<i>pJOE2955-GCD11</i>	Sammlung
pWS1513	<i>pJG4-5-GCD11</i>	Sammlung
pWS1535	<i>pEG202-SUI3</i>	Sammlung
pWS1537	<i>pEG202-SUI2</i>	Sammlung
pWS1667	<i>pRS305*-pTEF2-GCD11-tCYC1</i>	Sammlung
pWS1696	<i>pJOE2955-SUI2</i>	Sammlung
pWS1697	<i>pJOE2955-SUI3</i>	Sammlung
pWS1864	<i>pRS305*-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1</i>	Sammlung

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pWS1898	pJOE4056-SUI3	Sammlung
pWS1899	pJOE4056-SUI2	Sammlung
pWS1957	pJOE2955-GCD11-RBS-his6-CDC123	Sammlung
pWS1995	pJOE2955-SUI3-RBS-his6-CDC123	Sammlung
pWS2031	pJG4-5-GCD11(310-527)	Sammlung
pWS2047	pJG4-5-GCD11(1-309)	Sammlung
pWS2120	pJOE2955-SUI2-RBS-his6-CDC123	Sammlung
pWS2157	pJOE2955-GCD11-RBS-his6-SUI2	diese Arbeit
pWS2158	pJOE2955-GCD11-RBS-his6-SUI3	diese Arbeit
pWS2229	pJOE2955-GCD11(N376T)	diese Arbeit
pWS2223	pFA6a-flag12-HIS3MX6	Sammlung
pWS2237	pJOE2955-GCD11(N376T)-RBS-his6-SUI2	diese Arbeit
pWS2249	pJOE2955-GCD11(N376T)-RBS-his6-SUI3	diese Arbeit
pWS2250	pJOE2955-GCD11(N376T)-RBS-his6-CDC123	diese Arbeit
pWS2313	PRS305*-pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1	diese Arbeit
pWS2342	pEG(KG)-YCK2	diese Arbeit
pWS2401	pEG(KG)-YCK1	diese Arbeit <sup>#</sup>
pWS2466	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S280A)-tCYC1	Sammlung
pWS2476	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1	Sammlung
pWS2493	PRS304-pTEF2-SUI2-tCYC1	diese Arbeit
pWS2534	PRS305*-pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1	diese Arbeit
pWS2537	PRS305*-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1	diese Arbeit
pWS2538	PRS305*-pCDC123-ha3-CDC123(57-360)-tCYC1	diese Arbeit
pWS2541	PRS413-pMET25-lexA-CDC123	diese Arbeit
pWS2579	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A)-tCYC1	Sammlung
pWS2580	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A)-tCYC1	Sammlung
pWS2614	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1	diese Arbeit
pWS2615	PRS413-pMET25-lexA-MCS	diese Arbeit
pWS2678	pEG(KG)-CDC15	diese Arbeit <sup>#</sup>
pWS2679	pEG(KG)-MPS1	diese Arbeit <sup>#</sup>
pWS2712	pEG202-CDC123(4-360)	diese Arbeit
pWS2713	pEG202-CDC123(57-360)	diese Arbeit
pWS2877	pJG4-5-GCD11(310-432)	Sammlung
pWS2878	pJG4-5-GCD11(433-527)	Sammlung
pWS2940	PRS303*-pGAL1-flag3-YCK2-tCYC1	Sammlung
pWS3021	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(T274A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3022	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3023	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, T274A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3024	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3025	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, T274A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3026	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3027	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3028	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, T274A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3029	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3030	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3031	PRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
pWS3032	pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3041	pRS304-pGAL1-CDC123-tCYC1	diese Arbeit
pWS3042	pRS304-pGAL1-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3057	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1	diese Arbeit
pWS3060	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3081	pRS304-pGAL1-CDC123(4-360)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3082	pRS304-pGAL1-CDC123(1-340)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3083	pRS304-pGAL1-CDC123(4-340, S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3084	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3085	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(1-340)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3086	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(4-340, S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3087	pEG202-CDC123(1-340)	diese Arbeit
pWS3088	pEG202-CDC123(4-340, S128A, S157A, T274A, S280A)	diese Arbeit
pWS3089	pEG202-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)	diese Arbeit
pWS3090	pEG202-CDC123(1-71)	diese Arbeit
pWS3107	pRS304-pGAL1-CDC123(4-340)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3108	pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(4-340)-tCYC1	diese Arbeit
pWS3109	pEG202-CDC123(4-340)	diese Arbeit
pWS3122	pRS415-pSUI2-sui2(S51A)-tCYC1	Sammlung
pWS3193	pRS303*-pTEF2-CDC123-tCYC1	diese Arbeit
pWS3194	pRS303*-pTEF2-SUI3-tCYC1	diese Arbeit
pWS3262	pRS305*-pMET3-flag3-CDC123-tCYC1	diese Arbeit
pWS3377	pRS306-pSUI3-flag3-SUI3-tCYC1	diese Arbeit
pWS3380	pFA6a-kanMX4-pSUI3-flag3-SUI3(bp 1-476)	diese Arbeit
pWS3394	pEG(KG)-SWE1	diese Arbeit
pWS3395	pRS314-GCN4-lacZ	diese Arbeit
pWS3396	pRS315-GCN4-lacZ	diese Arbeit
pWS3400	pRS304-SUI2(bp 241-912)-yeGFP-tCYC1	diese Arbeit
pWS3413	pJG4-5-GCD11(P+410-527)	diese Arbeit
pWS3472	pJG4-5-GCD11(1-432)	diese Arbeit
pWS3473	pJG4-5-GCD11(1-514)	diese Arbeit
pYM-N20	pFA6a-natNT2-pTEF1-ha3	(Janke et al., 2004)
pYM-N22	pFA6a-kanMX4-pGAL1	(Janke et al., 2004)
pYM-N27	pFA6a-natNT2-pGALL	(Janke et al., 2004)

**Tabelle 6.4: Liste der verwendeten Plasmide**

Die pRS-Plasmide sind *E. coli*/Hefe-Shuttlevektoren (Sikorski und Hieter, 1989). Die KpnI-Schnittstelle im *LEU2*-bzw. *HIS3*-Marker wurde durch Punktmutagenese entfernt und entsprechende Derivate sind in der Tabelle mit \* gekennzeichnet. Bei der Beschreibung der Konstrukte beziehen sich die angegebenen Zahlen auf die Aminosäuren des codierten Proteins, außer wenn sie explizit als „bp“ gekennzeichnet sind.

Sammlung = Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Seufert

\* = pRS-Derivat mit mutagenisierter KpnI-Schnittstelle im Marker (*HIS3* bzw. *LEU2*)

# = Die Plasmide wurden aus den Stämmen der Kinase-Kollektion (Zhu et al., 2000) isoliert.

## 6.10 Hefestämme

Name	MAT	relevanter Genotyp	SH	Quelle
BY4741	a	<i>his3-Δ1 leu2-Δ0 met15-Δ0 ura3-Δ0</i>	S288c	Sammlung
BY4742	α	<i>his3-Δ1 leu2-Δ0 lys2-Δ0 ura3-Δ0</i>	S288c	Sammlung
BY4743	a/α	<i>his3-Δ1/his3-Δ1 leu2-Δ0/leu2-Δ0 MET15/met15-Δ0 LYS2/lys2-Δ0 ura3-Δ0/ura3-Δ0</i>	S288c	Sammlung
K699	a	<i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-2 ssd1 can1-100</i>	W303	Sammlung
K700	α	<i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-2 ssd1 can1-100</i>	W303	Sammlung
K842	a/α	<i>ade2-1/ade2-1 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-2/ura3-2 ssd1/ssd1 can1-100/can1-100</i>	W303	Sammlung
W276	α	<i>his3 trp1 ura3-52::URA3-lexAop-lacZ leu2::lexAop-LEU2</i>	W303	Sammlung
W995	a	<i>bar1Δ::HIS3</i>	W303	Sammlung
W2949	α	<i>cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W3702	a	<i>cdc123Δ327-ha3-natMX4</i>	S288c	Sammlung
W3975	α	<i>gcn3Δ::natMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAα1pr-LEU2 lys? met?</i>	S288c	Sammlung
W4050	a	<i>cdc123-1-ha3-URA3</i>	S288c	Sammlung
W4177	a	<i>GCD11-myc13-kanMX6</i>	S288c	Sammlung
W4443	a/α	<i>CDC123/cdc123Δ::kanMX4</i>	W303	Sammlung
W4876	α	<i>GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4887	a	<i>GCD1-myc13-HIS3MX6</i>	S288c	Sammlung
W4893	a/α	<i>CDC123/cdc123Δ327-HA3-natMX4 GCN3/gcn3Δ::kanMX4 CAN1/can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAα1pr-LEU2 pWS1429</i>	S288c	Sammlung
W5290	α	<i>SUI2-ha3-HIS3MX6</i>	S288c	Sammlung
W5294	a	<i>CDC123-myc13-kanMX6</i>	S288c	Sammlung
W5482	α	<i>CDC123-ha3-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W6098	α	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6194	α	<i>cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6388	a	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6390	a	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123(C144S)-tCYC1-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6890	α	<i>leu2::pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6933	a	<i>tif1Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W7089	α	<i>CDC123-flag12-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W7110	a/α	<i>CDC123/CDC123-flag12-HIS3MX6 pWS2401</i>	S288c/ W303	diese Arbeit
W7327	a/α	<i>CDC123/cdc123Δ::kanMX4 trp1/trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2/leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7328	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7329	α	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7342	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S280A)-tCYC1</i>	W303	Sammlung

Name	MAT	relevanter Genotyp	SH	Quelle
W7361	$\alpha$	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1</i>	W303	Sammlung
W7362	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1</i>	W303	Sammlung
W7470	a/ $\alpha$	<i>CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7471	a/ $\alpha$	<i>CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pCDC123-ha3-CDC123(57-360)-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7474	$\alpha$	<i>leu2::pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7506	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7534	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A)-tCYC1</i>	W303	Sammlung
W7536	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A)-tCYC1</i>	W303	Sammlung
W7569	$\alpha$	<i>leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7678	$\alpha$	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 slx8Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7680	$\alpha$	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 slx5Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7682	$\alpha$	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 sgs1Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7684	$\alpha$	<i>leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 slx8Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7686	$\alpha$	<i>leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 slx5Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7688	$\alpha$	<i>leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 sgs1Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7694	a	<i>leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 net1Δ::HIS</i>	W303	diese Arbeit
W7697	$\alpha$	<i>leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 net1Δ::HIS</i>	W303	diese Arbeit
W7701	$\alpha$	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8068	a	<i>bar1Δ::HIS3 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8426	a	<i>his3::pGAL1-3xFLAG-YCK2-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W8571	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(T274A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8573	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8575	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, T274A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8577	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8579	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, T274A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8581	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8583	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(T274A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8585	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, T274A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8587	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit

Name	MAT	relevanter Genotyp	SH	Quelle
W8589	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, T274A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8591	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S157A, T274A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8593	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS316-pCDC123-ha3-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8605	a	<i>bar1Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung
W8715	a	<i>trp1::pGAL1-CDC123-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8716	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8719	a	<i>trp1::pGAL1-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8720	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8765	a	<i>gcn2Δ::natNT2</i>	W303	diese Arbeit
W8766	a	<i>gcn3Δ::natNT2</i>	W303	diese Arbeit
W8788	α	<i>gcn2Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8792	α	<i>gcn3Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8803	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS314-pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8940	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(4-360)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8944	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(1-340)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8948	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(4-340, S128A, S157A, T274A, S280A)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W8950	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 pRS314-pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W8979	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pGAL1-CDC123(4-340)-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W9042	a	<i>trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9044	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9046	a	<i>leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9048	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9050	a	<i>trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W9052	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W9129	a	<i>gcn2Δ::natNT2 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9131	a	<i>gcn2Δ::natNT2 cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9161	a	<i>his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W9171	a	<i>his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W9471	a/α	<i>CDC123-myc13-kanMX6/CDC123-myc13-kanMX6 natNT2-pGALL-GCD11/GCD11-ha3-HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W9486	a	<i>natNT2-pGALL-ha3-GCD6 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit

Name	MAT	relevanter Genotyp	SH	Quelle
W9700	a/α	<i>CDC123-myc13-HIS3MX6/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pMET3-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2 natNT2-pGALL-GCD11/GCD11-ha3-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W9722	a	<i>CDC123-ha3-URA3 GCD1-myc13-HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W9725	a	<i>cdc123Δ327-ha3-natMX4 GCD1-myc13-HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W9788	a	<i>natNT2-pGALL-CDC123 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W9791	a	<i>natNT2-pGALL-CDC123 GCD11-myc13-HIS3MX6 GCD1-ha3-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit
W9796	a	<i>natNT2-pGALL-SUI2</i>	W303	Sammlung
W9798	a	<i>natNT2-pGALL-SUI2 GCD11-myc13-HIS3MX6 ADE2</i>	W303	Sammlung
W9802	a	<i>natNT2-pGALL-SUI3 GCD11-myc13-HIS3MX6 ADE2</i>	W303	Sammlung
W9822	a	<i>natNT2-pGALL-ha3-GCD1 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W9847	a	<i>natNT2-pGALL-TIF5 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W9857	a/α	<i>GCN2/gcn2Δ::natNT2 CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W9943	a	<i>natNT2-pGALL-CDC33 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W10052	α	<i>natNT2-pTEF1-ha3-GCD2</i>	W303	diese Arbeit
W10114	a	<i>natMX4-pSUI3-flag3-SUI3</i>	W303	diese Arbeit
W10120	a	<i>natMX4-pSUI3-flag3-SUI3 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10122	a	<i>natMX4-pSUI3-flag3-SUI3 cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10180	α	<i>cdc123Δ327-ha3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W10192	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 GCD11-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10194	a/α	<i>GCD11/GCD11-ha3-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit
W10195	a/α	<i>GCD11/gcd11Δ514-ha3-kanMX6</i>	W303	diese Arbeit
W10266	a/α	<i>GCD11/GCD11-ha3-kanMX6 CDC123/CDC123-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10267	a/α	<i>GCD11/gcd11Δ514-ha3-kanMX6 CDC123/CDC123-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10388	α	<i>SUI2-GFP-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10390	α	<i>SUI2-GFP-TRP1 cdc123Δ327-ha3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W10440	a/α	<i>GCN2/gcn2Δ::natNT2 BAR1/bar1Δ::LEU2 pWS1429</i>	W303	diese Arbeit
W10443	a/α	<i>his3/his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3 BAR1/bar1Δ::LEU2 pWS1429</i>	W303	diese Arbeit
W10451	α	<i>kanMX4-pSUI3-flag3-SUI3 GCD1-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10452	α	<i>natNT2-pGALL-CDC123 kanMX4-pSUI3-flag3-SUI3 GCD1-myc13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10491	a	<i>bar1Δ::HIS3 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10492	a	<i>bar1Δ::HIS3 cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10493	a/α	<i>CDC123/cdc123Δ::kanMX4 trp1/trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 his3/his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3 leu2/leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10494	a	<i>his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W10504	a	<i>trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit

Name	MAT	relevanter Genotyp	SH	Quelle
W10506	a	<i>cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10749	a/α	<i>GCN3/gcn3Δ::natNT2 CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W10752	a/α	<i>SUI2/sui2Δ::natNT2 CDC123/cdc123Δ327-ha3-HIS3MX6 pRS415-pSUI2-sui2(S51A)-tCYC1</i>	W303	diese Arbeit
W10839	a/α	<i>GCN2/gcn2Δ::kanMX6 CDC123/cdc123Δ327-ha3-natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W10840	a/α	<i>GCN2/gcn2Δ::kanMX6 CDC123/cdc123-1-ha3-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W11067	a	<i>SUI2-GFP-TRP1 gcn2Δ::natNT2</i>	W303	Sammlung

**Tabelle 6.5:** Liste der verwendeten Hefestämme

MAT = Paarungstyp (mating type)

SH = Stammhintergrund

Sammlung = Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Seufert

## 7. METHODEN

### 7.1 Arbeiten mit Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Für die Expression von Hefegenen in *E. coli* wurde der Stamm BL21C+ eingesetzt.

DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d/ <i>lacZΔM15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )-U169 <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA recA1 relA1 supE44 thi-1 λ<sup>-</sup></i>
BL21C+	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)</i>

#### 7.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$  und BL21C+ erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar bei 37°C. Zur Selektion von Plasmid-tragenden Zellen wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Bei BL21C+ wurde dem Medium Chloramphenicol zugesetzt (Flüssigmedium: 50 µg/ml, Agarplatten: 34 µg/ml). Um DH5 $\alpha$ -Transformanden auf  $\alpha$ -Komplementation zu testen, wurden X-Gal (100 µM) und IPTG (400 µM) auf die LB-Agarplatte ausgebracht.

Für die Expression von mbp- und his6-Fusionen wurde BL21C+ zunächst über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol (LB<sub>amp,chl</sub>) bei 37°C kultiviert. Morgens wurden die Bakterien in frisches Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,1 überimpft und für ca. 3 h bei 20°C – 25°C geschüttelt. Dann wurde zur Induktion des *rha*-Promotors 0,2% Rhamnose zugegeben und die Kultur bis zum nächsten Tag (20 – 22 h) bei 20°C geschüttelt.

#### 7.1.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

##### 7.1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurden *E. coli* (DH5 $\alpha$  oder BL21C+) zunächst in LB-Medium bei 37°C angezogen, in 2x 750 ml TB überimpft und über Nacht bei 25°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 geschüttelt. Die Kulturen wurden auf Eis abgekühlt und in sterilen GSA-Bechern zentrifugiert (3000 Upm 15 min 4°C). Die Zellen wurden zweimal mit 150 ml kaltem Wasser gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 70 ml 10% Glycerin resuspendiert, in zwei 50 ml-Falcon-Röhren überführt und 10-15 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 10% Glycerin resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und auf Trockeneis eingefroren. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

### 7.1.2.2 Elektroporation

100 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. 100 µl der Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und 0,5 – 1 µl einer Plasmidlösung oder 2 – 4 µl eines Ligationsansatzes zugegeben. Die Elektroporation wurde bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Kondensatorspannung von 2,5 kV durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion auf Transformanden wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 7.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hefestämmen aus den Stammhintergründen W303 und S288c gearbeitet. Die verwendeten Stämme sind in Abschnitt 6.10 aufgelistet.

### 7.2.1 Kultivierung von Hefestämmen

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte in der Regel in Vollmedium mit 2% Glukose (XYD) bei 25°C oder 30°C. Zur Selektion auf die Marker *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* und *URA3* wurde synthetisches Medium (SD) ohne die entsprechenden Aminosäuren oder Nukleobasen eingesetzt. Abhängig vom Experiment wurde statt Glukose (D) als Kohlenstoffquelle 2% Galaktose (G), 2% Raffinose (R), 1% Raffinose und 2% Galaktose (RG) oder 2% Saccharose (S) verwendet. Für die Experimente wurden exponentiell wachsende Kulturen herangezogen: Im Allgemeinen wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt und daraus abends die Hauptkultur so angeimpft, dass die OD<sub>600</sub> am nächsten Morgen zwischen 0,3 und 0,8 lag.

#### 7.2.1.1 Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren

In dieser Arbeit wurden die Promotoren *pGAL1* und *pMET3* zur induzierbaren Expression von Genen verwendet, während die Repression des *GALL*-Promotors zur Depletion essentieller Proteine diente.

Zur Induktion des *GAL1*-Promotors wurden die Stämme zunächst in Medium mit 2% Raffinose (XYR bzw. SR) bei 25°C angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 2% Galaktose für ca. 3 h.

Bei Verwendung des *MET3*-Promotors wurden die Stämme zuerst in SD+met bei 25°C kultiviert, geerntet und zur Induktion in SD-met umgesetzt.

Zur Repression des *GALL*-Promotors wurden die Stämme in XYRG bei 25°C angezogen und anschließend in XYD überführt. Für die Zeitreihen zur Depletion von Cdc123 (Abschnitt 4.3.1) wurden dabei zwei Kulturen zeitlich versetzt überimpft: Aus Kultur A wurden die Zeitwerte 4, 9, 29 und 33 h

entnommen, aus Kultur B die Werte 14 bzw. 15, 19 und 24 h. Der 0 h-Wert wurde aus der XYRG-Kultur entnommen, als die Kultur A in XYD umgesetzt wurde. Während der Zeitreihe wurden die Kulturen stets so verdünnt, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden ( $OD_{600} < 1$ ).

### **7.2.1.2 Zellzyklusarrests**

Der Arrest des Zellzyklus erfolgte durch Zugabe von  $\alpha$ -Faktor, Hydroxyurea oder Nocodazol zu wachsenden Kulturen, welche bei 25°C in XYD angezogen wurden.

Die Zugabe von  $\alpha$ -Faktor in einer Konzentration von 50 ng/ml zu geeigneten Stämmen (*MATa bar1Δ*) führte über den Pheromonsignalweg (vgl. 3.1.3) zum Arrest in der G1-Phase und Ausbildung eines Shmoo. Die Zugabe von 0,1 M Hydroxyurea (Hydroxyharnstoff) bewirkte einen Arrest in der S-Phase durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase. Bei Zugabe von Nocodazol (Endkonzentration 7,5 µg/ml) kam es auf Grund der Depolymerisation der Mikrotubuli (und damit der Spindel) zu einem Arrest in der Mitose. In allen drei Fällen war der Arrest in der Regel nach 2 h sichtbar.

### **7.2.2 Konservierung von Hefestämmen**

Zur dauerhaften Konservierung wurden Hefestämme über Nacht in 2 – 3 ml eines geeigneten Mediums bei 25°C angezogen. Die Kultur wurde am Mikroskop überprüft, um eine Kontamination auszuschließen. Die Zellen wurden geerntet (2000 Upm 2 min), in 1 ml 15 % Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

### **7.2.3 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihen**

Der Auftrag von Hefesuspensionen in Verdünnungsreihen auf eine Platte ist eine etablierte Methode, um das Wachstum verschiedener Stämme zu vergleichen. Dafür wurden die Stämme in geeignetem Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden geerntet (2000 Upm 2 min), in steriles Wasser resuspendiert und die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Suspension bestimmt. Anschließend wurde in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe in H<sub>2</sub>O angelegt: In der ersten Reihe der Mikrotiterplatte wurde die Dichte der Suspension auf  $OD_{600} = 1$  eingestellt und dann fünf 1:10-Verdünnungsschritte durchgeführt. Von den Zellsuspensionen in der Mikrotiterplatte wurden mit einem Metallstempel, dem sog. Frogger, jeweils ca. 4 µl auf geeignete Platten gestempelt. Die Platten wurden für 2 – 4 Tage bei 25°C, 30°C oder 37°C inkubiert und das Wachstum wurde mit der Digitalkamera dokumentiert.

### 7.2.4 Kreuzung von haploiden Hefestämmen

Treffen haploide Hefezellen unterschiedlichen Paarungstyps (MAT $\alpha$  und MAT $\alpha$ ) aufeinander, so verschmelzen sie zu einer diploiden Zygote. Zur Kreuzung zweier Hefestämme wurden diese auf einer XYD-Platte oder gegebenenfalls auf einer anderen Platte, auf welcher beide Stämme wachsen konnten, übereinander ausgestrichen und über Nacht bei 25°C oder 30°C inkubiert. Anschließend wurden diploide Zellen über Prototrophie- oder Resistenzmarker selektiert, indem Zellmaterial von der Kreuzungsplatte auf einer geeigneten Selektivmediumsplatte bzw. Platten mit G418 oder clonNAT ausgestrichen wurde. Nach 2 – 4 Tagen bei 25°C oder 30°C waren die diploiden Zellen zu Kolonien herangewachsen.

### 7.2.5 Sporulation von diploiden Hefestämmen und Tetradenanalyse

Unter günstigen Bedingungen durchlaufen diploide wie haploide Hefezellen einen mitotischen Teilungszyklus. Diploide Hefezellen treten jedoch bei Nährstoffmangel in die Meiose ein. Dabei entsteht aus einer diploiden Zelle eine Tetrade aus vier haploiden Sporen, die von einem Ascus umgeben sind. Die Sporen stellen Dauerformen für das Überleben ungünstiger Bedingungen dar, unter günstigen Bedingungen keimen die Sporen aus und die haploiden Zellen treten wieder in den mitotischen Zellteilungszyklus ein.

Um die Meiose (oder Sporulation) zu induzieren, wurden diploide Hefestämme in 2 ml nährstofffreiem Präsporulationsmedium entweder mind. 5 h über Tag oder über Nacht bei 25°C angezogen. Die Zellen wurden geerntet (2000 Upm 2 min), mit 2 ml nährstoffarmem Sporulationsmedium gewaschen (2000 Upm 2 min), in 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen und bei 25°C gerollert. Die Sporulation dauerte je nach Stammhintergrund etwa 3 Tage (W303) bis 5 Tage (S288c) und wurde am Durchlichtmikroskop kontrolliert. Zum Verdau des Ascus wurden 100 µl der Kultur mit 100 µl Novozym-Lösung versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 15 µl der Suspension wurden in einem Streifen am Rand einer geeigneten Platte ausgebracht. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden Tetraden aufgenommen und die vier zusammengehörigen Sporen anhand eines Rasters vereinzelt. Die Platte wurde für 2 – 5 Tage bei 25°C oder 30°C inkubiert, bis die Sporen zu Kolonien herangewachsen waren.

Anschließend wurde der Genotyp der Kolonien durch einen Markertest analysiert. Dazu wurden Zellen in 150 µl steriles Wasser in einer Mikrotiterplatte resuspendiert und mit Hilfe des Froggers auf entsprechende Selektivplatten bzw. Platten mit Zusatz von Antibiotikum gestempelt. Das Wachstum wurde nach 2 – 3-tägiger Inkubation bei 25°C oder 30°C ausgewertet.

### 7.2.6 Transformation von Hefen mit der Lithiumacetat-Methode

Die Behandlung mit Alkali-Ionen, z.B. die Inkubation mit Lithiumacetat, befähigt Hefezellen zur Aufnahme von DNA (Gietz und Woods, 2002). Die Hefen wurden aus einer Übernachtkultur 1:20 in Vollmedium verdünnt und für 4 – 5 h bei 25°C geschüttelt ( $OD_{600} = 0,4 - 1,0$ ). Pro Ansatz wurden 1 – 2 OD Zellen geerntet (6000 Upm 2 min) und zuerst mit 1,5 ml sterilem Wasser, dann mit 1 ml TE/LiAc gewaschen (6000 Upm 2 min). Die Zellen wurden in 50 µl TE/LiAc je Ansatz resuspendiert und gegebenenfalls auf mehrere Ansätze verteilt.

Transformationsansatz:

50 µl	Hefesuspension
300 µl	PEG/LiAc
5 µl	Heringssperma-DNA (zur Denaturierung 5 min bei 100°C, dann auf Eis)
1 µl	Plasmid-Lösung (bei ARS/CEN- oder 2µ-Plasmiden)
oder 10 – 15 µl	lineare DNA (Restriktionsverdau oder PCR-Produkt)

Der Transformationsansatz wurde durch Vortexen gemischt, 20 min bei Raumtemperatur gerollert, 15 min bei 42°C im Heizblock inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Für die Selektion der Transformanden durch Prototrophie-Marker wurden die Zellen in 150 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf entsprechende Selektivmediumsplatten ausgebracht. Bei der Transformation mit Resistenzmarkern wurden die Zellen zunächst in 3 ml Vollmedium aufgenommen und zur Ausprägung der Resistenz 3 h bei 30°C im Roller inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (2000 Upm 2 min), der Überstand größtenteils abgekippt und die Zellen nach Resuspension im restlichen Überstand auf Platten mit G418 bzw. clonNAT ausgebracht. Nach 2 – 4 Tagen bei 25°C oder 30°C waren die Transformanden zu Einzelkolonien herangewachsen.

## 7.3 Fixierung, Färbung, Mikroskopie und Durchflusszytometrie

### 7.3.1 Ethanol-Fixierung von Hefezellen

Hefezellen können mit 70%igem Ethanol fixiert werden. Dabei wird zudem die Membran durchlässig, was die Färbung der DNA mit interkalierenden Farbstoffen ermöglicht. Für die Fixierung wurde 1 OD<sub>600</sub> exponentiell wachsender Hefezellen geerntet (13200 Upm 2 min), in 150 µl Wasser resuspendiert und mit 350 µl 100% Ethanol versetzt. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 7.3.2 Färbung der DNA mit Sytox Green und Durchflusszytometrie

Zur Zellzyklusanalyse kann der DNA-Gehalt von Ethanol-fixierten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden (Haase und Reed, 2002). Dafür wurde die DNA mit Sytox Green gefärbt (Anregungsmaximum 504 nm, Emissionsmaximum 523 nm). Dazu wurden 125 µl

(= 0,25 OD<sub>600</sub>) Ethanol-fixierte Zellen mit 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM pH 7,0) gewaschen und in 250 µl Natriumcitrat-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (4 – 6 Pulse, 40% Leistung) vereinzelt, mit 10 µl RNase A versetzt und für 1 h bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K wurden die Proben wiederum 1 h bei 50°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (13200 Upm, 2 min) und in 250 µl Natriumcitrat-Puffer mit 1 µM Sytox Green resuspendiert. Die Färbung erfolgte im Dunkeln bei 4°C für mindestens eine Nacht. Bis Februar 2010 (entprechend den in den Abb. 4.10, 4.23 und 4.25 dargestellten Daten) erfolgte die Messung am Durchflusszytometer CA-III (Partec). Dafür wurden 5 – 10 µl der mit Sytox gefärbten Zellen in 1,5 ml Tris/HCl (50 mM pH 7,5) verdünnt, wobei die Verdünnung so variiert wurde, dass ca. 200 – 300 Ereignisse pro Sekunde gemessen wurden. Die Messung wurde im Kanal FLII (Skala: lin, Gain: 550) durchgeführt und gestoppt, wenn der höchste Peak knapp 600 Counts erreichte.

Für alle anderen Versuche wurde die Messung am Durchflusszytometer CyFlow Space (Partec) durchgeführt. Dabei konnte neben dem DNA-Gehalt auch das Vorwärts-Streulicht (forward scatter, FSC) gemessen werden, wodurch Rückschlüsse auf die Zellgröße möglich sind. Für die Messung wurden 20 µl gefärbte Zellen in 1 ml Tris/HCl (50 mM pH 7,5) verdünnt und folgende Standard-Einstellungen gewählt:

Kanal	Skala	Gain	Lower Limit	Upper Limit
FSC	log3	100	10	999,9
SSC	log3	230	10	999,9
FL1	lin	600	50	999,9

Als Trigger-Parameter wurde FL1 gewählt und die Geschwindigkeit wurde auf 0,6 eingestellt. Bei einer Rate von 100 – 500 Ereignisse pro Sekunde wurden insgesamt 25000 Ereignisse gemessen.

Die Darstellung der DNA-Profile erfolgte mittels der Software WinMDI 2.8. Für die Quantifizierung des Anteils der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde die Gerätesoftware des CyFlow Space-Durchflusszytometers (Partec) verwendet. Für die Darstellung des FSC als Box-Plot wurden die Daten mit dem Programm WinMDI 2.8 in Textdateien umgewandelt und in Microsoft Excel importiert. Zur Analyse der Verteilung der gemessenen FSC-Werte wurde ein Box-Plot-Diagramm erstellt. Die Messung der FSC-Daten erfolgte bei logarithmisch skaliertem x-Achse, um einen weiten Wertebereich mit geringen relativen Fehlern abzudecken. Für die Auswertung mittels Box-Plot wurde eine lineare Skalierung der FSC-Achse gewählt, um die Verteilung der Messwerte besser beurteilen zu können. Die Box im Box-Plot-Diagramm umfasst die mittleren 50% der Daten: Die untere Begrenzung der Box bildet das erste Quartil; 25% der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert. Die obere Begrenzung der Box bildet das dritte Quartil; 25% der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Wert. Die Box wird durch den Median unterteilt; jeweils 50% der Datenwerte liegen

über und unter diesem Wert. Die gesamte Breite der Werteverteilung wird durch die Box und ihre Antennen angegeben: Die Enden der Antennen entsprechen dem Maximum und Minimum der gemessenen FSC-Werte (bei der Auswertung wurden nur Kanäle mit mindestens 5 Ereignissen berücksichtigt). Je größer also die Box und die Antennen sind, desto weiter ist die Größenverteilung in der Zellpopulation aufgespreitet.

### 7.3.3 Färbung mit DAPI und Mikroskopie

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) eignet sich zur Visualisierung von DNA-haltigen Zellstrukturen, da er an DNA bindet und bei Anregung mit geeigneter Wellenlänge im blauen Bereich fluoresziert (Anregungsmaximum 359 nm, Emissionsmaximum 461 nm). Für die Färbung wurden 60 µl (= 0,12 OD<sub>600</sub>) Ethanol-fixierte Zellen zweimal mit 500 µl Natriumcitrat-Puffer (50 mM pH 7,0) gewaschen und zur Auflösung von Zellaggregaten mit Ultraschall behandelt (5 – 6 Pulse, 40% Leistung). Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Großteil des Überstands abgenommen und die Zellen in den restlichen 30 – 50 µl gründlich resuspendiert. 3 µl der Zellsuspension wurden auf einem Objektträger mit 1 µl Mounting Medium mit DAPI gemischt und im Fluoreszenzmikroskop Imager M1 untersucht.

### 7.3.4 Mikroskopie von lebenden Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Aminosäuremangel auf die Lokalisation von Sui2-GFP am Mikroskop verfolgt. Dazu wurden die Stämme in SD++ bei 25°C kultiviert und schonend geerntet (in einem 1,5 ml-Reagiergefäß durch Zentrifugation bei 2000 Upm 2 min). Anschließend wurden die Zellen in SD++ (Kontrolle mit Aminosäuren) oder SD-aa (ohne Aminosäuren) auf OD<sub>600</sub> = 3 resuspendiert, 5 µl auf ein Deckglas (24 x 66 mm) pipettiert und mit einem Stück SD++-Agar bzw. SD-aa-Agar (Größe ca. 15 x 15 mm) und einem Deckglas (22 x 22 mm) bedeckt. Der Agar wurde folgendermaßen hergestellt:

SD++-Agar	1% Agarose (aufgekocht, auf 60°C abgekühlt)	3,5 ml
	20% Glukose	500 µl
	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	500 µl
	10x Drop-out ++	500 µl
SD-aa-Agar	1% Agarose (aufgekocht, auf 60°C abgekühlt)	3,5 ml
	20% Glukose	500 µl
	10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	500 µl
	100x Adenin	150 µl
	50x Uracil	300 µl

Die Mischung wurde sofort in eine Petrischale gegossen und bei Raumtemperatur maximal einen Tag aufbewahrt.

Die Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Sabine Weinzierl am inversen Mikroskop Axio Observer Z.1 mit einer Axiocam MRm und einer LED-Lichtquelle Colibri von Zeiss in einem auf 21°C temperierten Raum durchgeführt. 2 Minuten nach dem Umsetzen der Zellen wurde die Aufnahme gestartet:

Dauer	20 min
Intervall	1 min
Z-Stapel	10 Ebenen, Abstand 0,360 µm
Kanäle	DIC (200 ms)
	488 nm (200 ms, 5% Laserintensität)

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Image J. Im 488nm-Kanal wurde zur Projektion der Ebenen die Einstellung „Maximum Intensity“ gewählt, beim DIC-Kanal wurde zur Darstellung eine Ebene ausgewählt.

## 7.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

### 7.4.1 DNA-Isolation

#### 7.4.1.1 Präparation von high-copy-Plasmiden aus *E. coli*: Kochlysat-Methode

Zur schnellen Isolation von high-copy-Plasmiden aus *E. coli* wurde die Kochlysat-Methode verwendet (Berghammer und Auer, 1993). Dafür wurden die Plasmid-tragenden Bakterien über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C angezogen. 2 ml der Kultur wurden zentrifugiert (13200 Upm 4 min) und die Zellen in 40 µl Easy-Prep-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden erst 1 min bei 100°C im Heizblock, dann mindestens 1 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (13200 Upm 15 min) befand sich die Plasmid-DNA im Überstand. Für die Untersuchung der Plasmide mittels Gelelektrophorese oder Restriktionsverdau wurden 3 – 5 µl des Überstands eingesetzt.

#### 7.4.1.2 Präparation von low-copy-Plasmiden aus *E. coli*: alkalische Lyse

Low-copy-Plasmide wurden durch alkalische Lyse und Ethanol-Fällung aus *E. coli* isoliert. Dafür wurden die Plasmid-tragenden Bakterien über Nacht in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C angezogen. 3 ml der Kultur wurden zentrifugiert (13200 Upm 4 min) und das Pellet in 100 µl F1-Puffer (aus dem JETSPIN-Kit von Genomed) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 150 µl F2-Puffer zugegeben und kurz durch Invertieren gemischt. Darauf wurde der Ansatz durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,0 neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (13200 Upm 10 min) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 750 µl 100%igem Ethanol gemischt und 10 min bei -70°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (13200 Upm 10 min) und mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes

wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Für die Analyse mittels Gelelektrophorese oder Restriktionsverdau wurden 3 – 5 µl der Plasmide eingesetzt.

#### **7.4.1.3 Säulenreinigung von Plasmiden aus *E. coli*: Mini- und Midipreps**

Um Plasmid-DNA in größerer Reinheit zu erhalten, wurden Säulenreinigungsverfahren eingesetzt. Für die Reinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, z.B. für Sequenzierungen, wurde das Nucleo Spin Plasmid Mini Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte ausgehend von 2 – 4 ml Übernachtkultur gemäß den Angaben des Herstellers. Für die Elution wurde 50 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene Kits verwendet: zuerst das JETSPIN-Kit von Genomed, das Plasmid Midi Kit von Qiagen und zuletzt das GenElute HP Plasmid Midiprep Kit von Sigma. Die Plasmidisolation wurde ausgehend von 50 – 80 ml Übernachtkultur nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 1x TE oder Elutionspuffer.

#### **7.4.1.4 Isolation von genomischer DNA aus Hefe**

Die verwendete Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus Hefe beruht auf mechanischer Zerstörung der Zellwände, Lyse der Zellen durch Detergenzien und alkoholischer Fällung der Gesamt-DNA (Fujimura und Sakuma, 1993). Die isolierte DNA kann dann zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR eingesetzt werden.

Die Hefen wurden über Nacht in 5 ml eines geeigneten Mediums angezogen, geerntet (2000 Upm 2 min), in 1 ml Wasser resuspendiert und auf 0,3 g Glasperlen überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und zu den Zellen und Glasperlen 100 µl Tris/EDTA/SDS (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 10 mg/ml SDS) zugegeben. Die Hefezellen wurden 5 min in der Retsch-Mühle bei maximaler Frequenz und 4°C aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 500 µl Tris/EDTA/SDS wurde die Probe 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 200 µl 5 M Kaliumacetat versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (13200 Upm 5 min 4°C). Der Überstand wurde in einem neuen Reagiergefäß mit 1 ml 100 % Ethanol gemischt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (13200 Upm 1 min) und getrocknet. Nach Resuspension in 300 µl TE wurde der Ansatz mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt, pelletiert (13200 Upm 1 min), mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bis zur vollständigen Entfernung des Ethanols getrocknet. Zuletzt wurde die genomische DNA in 50 µl TE bei 65°C gelöst. Zur Kontrolle wurden 2 µl der gelösten DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei die genomische DNA als hochmolekulare Bande läuft.

#### 7.4.1.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand und der Extraktion der DNA durch Denaturierung der Proteine mit organischen Lösemitteln.

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden die Hefen über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen. Die Zellen wurden geerntet (2000 Upm 2 min), in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Proben mit 50 µl TE/SDS und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt. Die Hefezellen wurden 5 min in der Retsch-Mühle bei maximaler Frequenz und 4°C aufgeschlossen. Nach der anschließenden Zentrifugation (13200 Upm 5 min 4°C) befand sich die Plasmid-DNA im Überstand, von welchem 1 µl für die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation (vgl. 7.1.2) eingesetzt wurde.

#### 7.4.1.6 Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung

Ausbeute und Qualität einer Plasmidpräparation wurden mit Hilfe des Biophotometers (Eppendorf) analysiert. Dazu wurden 2 – 3 µl der Plasmidlösung mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl verdünnt und die Extinktion (E) bei 260 nm gemessen. Als Referenz diente steriles Wasser. Die DNA-Konzentration der Plasmidlösung ergab sich aus dem Produkt von E<sub>260</sub> und dem Faktor 50 ng/µl für doppelsträngige DNA, wobei die Verdünnung der Probe zu berücksichtigen ist. Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde die Extinktion bei 280 nm herangezogen: Bei sauberer DNA-Präparationen beträgt der Quotient E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> 1,8, geringere Werte deuten auf Verunreinigung mit Proteinen hin.

### 7.4.2 PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente *in vitro* vervielfältigt werden (Mullis et al., 1986). Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird dabei durch die Primer festgelegt. Diese kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotide sind komplementär zu den Enden des Zielfragments. Die PCR kann sowohl für präparative, als auch für analytische Zwecke eingesetzt werden. Im präparativen Maßstab wurden DNA-Fragmente aus Plasmiden oder genomicscher DNA amplifiziert, welche für die Klonierung (7.4.2.1) oder die homologe Rekombination in das Hefegenom (7.4.2.2) eingesetzt wurden. Eine weitere präparative Anwendung war die zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden (7.4.2.3). Für die präparative PCR wurde die KOD-Polymerase verwendet, da diese eine 3' → 5' Proofreading-Aktivität und somit eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Zu analytischen Zwecken wurde hingegen die Taq-Polymerase verwendet, da in diesem Fall die Genauigkeit keine Rolle spielte. Zu den Anwendungen der analytischen PCR zählt die Überprüfung der Integration von Konstrukten in das Hefegenom mittels Kolonie-PCR (7.4.2.4) und die Bestimmung des Paarungstyps durch MAT-PCR (7.4.2.5).

#### 7.4.2.1 PCR von DNA-Fragmenten für die Klonierung

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden über die Primer Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt. Als Matrize diente genomische DNA aus Hefe oder Plasmid-DNA. Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von ca. 50 – 100 µg/ml verdünnt, bei genomischer DNA wurden verschiedene Verdünnungen getestet.

PCR-Ansatz	Temperaturprofil			
10x KOD-Puffer	5 µl			
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 µl	Denaturierung	95°C	4 min
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Denaturierung	95°C	40 s
Forward-Primer (10 µM)	2 µl	Annealing	T <sub>a</sub>	20 s
Reverse-Primer (10 µM)	2 µl	Elongation	72°C	t <sub>E</sub>
DNA-Matrize	1 µl	Amplifikation	72°C	10 min
KOD-Polymerase	1 µl			
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl			

Die Annealing-Temperatur T<sub>a</sub> wurde 2 – 4°C unter der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Elongationszeit t<sub>E</sub> wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei je 1 kb 30 – 40 s veranschlagt wurden. Vor dem anschließenden Restriktionsverdau wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt, wobei gegebenenfalls mehrere identische Ansätze vereinigt wurden, um die DNA-Menge zu erhöhen. Die Elution erfolgte in der Regel mit 30 µl H<sub>2</sub>O.

#### 7.4.2.2 PCR zur homologen Rekombination

Diese Methode kann dazu verwendet werden, um Hefegene zu deletieren, mit einem Epitop zu fusionieren oder unter die Kontrolle eines anderen Promotors zu stellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das pFA6a-System (Longtine et al., 1998) und dessen Erweiterungen (Goldstein und McCusker, 1999; Janke et al., 2004) eingesetzt. Am 5'Ende der verwendeten Primer befindet sich eine Sequenz von 45 – 50 Basen, die homolog zu dem gewünschten Integrationsort im Hefegenom sind. Das 3'Ende der Primer besteht ca. 20 Basen, welche homolog zu dem als Matrize dienenden Plasmid sind. Der PCR-Ansatz und das Temperaturprofil entsprach Absatz 7.4.2.1, wobei als Matrize 50 – 100 ng Plasmid eingesetzt wurden und als Annealingtemperatur 55°C gewählt wurde. Um größere Mengen an PCR-Produkt zu erhalten, wurden meist 2 – 4 Ansätze vereinigt.

Zur Einführung von Deletionen in den Stammhintergrund W303 wurde teilweise eine andere Methode verwendet: Aus dem entsprechenden haploiden Deletionsstamm mit S288c-Hintergrund wurde genomische DNA isoliert und die Deletionskassette und ihre flankierenden Bereiche durch PCR amplifiziert. Dafür wurden Primer eingesetzt, die 20 – 25 bp lang sind und jeweils 200 – 300 bp vor bzw. hinter der Deletion binden. Der PCR-Ansatz und das Temperaturprofil entsprach Absatz 7.4.2.1.

Die flankierenden Bereiche dienen bei der anschließenden Transformation zur homologen Rekombination mit dem Hefegenom.

Vor der Hefetransformation wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurden gegebenenfalls mehrere PCR-Ansätze vereinigt, um die DNA-Menge zu erhöhen. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers, wobei die DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O oder Elutionspuffer eluiert wurde.

#### 7.4.2.3 PCR zur ortsspezifischen Mutagenese

Die PCR kann zur Einführung von gezielten Mutationen in ein Gen verwendet werden. Dafür wurden ca. 200 ng Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Als Primer dient ein Paar von komplementären Oligonukleotiden mit einer Länge von ca. 50 Basen, welche die gewünschte Mutation und deren umgebende Sequenzen beinhalten. In der PCR wird das ganze Plasmid amplifiziert und dabei über die Primer die Mutation eingeführt.

PCR-Ansatz		Temperaturprofil		
10x KOD-Puffer	5 µl			
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 µl	Denaturierung	95°C	4 min
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Denaturierung	95°C	40 s
Forward-Primer (10 µM)	5 µl	Annealing	50°C	20 s
Reverse-Primer (10 µM)	5 µl	Elongation	72°C	1 min/kb
DNA-Matrize	1 µl	Amplifikation	72°C	10 min
KOD-Polymerase	1 µl			
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl			

Nach Beendigung der PCR-Reaktion ist neben dem mutagenisierten PCR-Produkt auch noch die Matrize vorhanden. Da die Matrize aus dem *E. coli*-Stamm DH5α isoliert wurde, ist sie an Adenin in der Sequenz 5'-GATC-3' methyliert. Deshalb kann die Matrize durch das Restriktionsenzym DpnI geschnitten werden, welches methylierte GATC-Sequenzen erkennt. Das PCR-Produkt hingegen wird von DpnI nicht geschnitten, da es nicht methyliert ist. Um vor der Transformation von *E. coli* (vgl. 7.1.2) mit dem PCR-Produkt die Matrize zu entfernen, wurde deswegen ein Restriktionsverdau mit DpnI (vgl. 7.4.3) durchgeführt.

#### 7.4.2.4 Kontrolle der Integration mittels Kolonie-PCR

Nach der Transformation von Hefen mit integrativen DNA-Konstrukten kann die korrekte Integration in das Hefegenom mittels PCR überprüft werden. Die Primer wurden dafür so gewählt, dass ein Primer im integrierten DNA-Konstrukt bindet und der andere in der Nähe, aber außerhalb des integrierten Konstruktes. Somit ergibt sich nur bei korrekter Integration ein PCR-Produkt spezifischer Länge.

Für die PCR wurde Zellmaterial der zu testenden Transformanden in folgendem Ansatz resuspendiert:

PCR-Ansatz	Temperaturprofil			
10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	Denaturierung	94°C	5 min
dNTP-Mix (2 mM)	2 µl	Denaturierung	94°C	1 min
Forward-Primer (10 µM)	1,5 µl	Annealing	T <sub>a</sub>	1 min
Reverse-Primer (10 µM)	1,5 µl	Elongation	72°C	1 min/kb
Taq-Polymerase	0,3 µl	Amplifikation	72°C	10 min
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl			

Die Annealing-Temperatur T<sub>a</sub> wurde 2 – 4°C unter der Schmelztemperatur der Primer gewählt.

Zur Analyse des PCR-Produkts wurden 10 – 15 µl auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. 7.4.4).

#### 7.4.2.5 Analyse des Paarungstyps mittels MAT-PCR

Der MAT-Locus, welcher den Paarungstyp der Hefe bestimmt, liegt auf Chromosom III. Der Unterschied in den Sequenzen von *MAT $\alpha$* - und *MAT $\alpha$* -Stämmen ermöglicht die Bestimmung des Paarungstyps mittels PCR (Huxley et al., 1990). Dafür werden drei Primer eingesetzt, von welchen einer (WS826) außerhalb des MAT-Locus und somit unabhängig vom Paarungstyp bindet. Die beiden anderen Primer binden spezifisch im *MAT $\alpha$* -Lokus (WS828) bzw. *MAT $\alpha$* -Locus (WS827), allerdings in unterschiedlichem Abstand zu WS826. Somit ist die Größe des PCR-Produkts spezifisch für den Paarungstyp (544 bp für *MAT $\alpha$*  und 404 bp für *MAT $\alpha$* ).

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurde Zellmaterial des zu untersuchenden Stammes in folgendem PCR-Ansatz resuspendiert:

PCR-Ansatz	Temperaturprofil			
10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	Denaturierung	94°C	5 min
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl	Denaturierung	94°C	1 min
Primer-Mix aus WS826, WS827 und WS828 (jeweils 10 µM)	3,0 µl	Annealing	55°C	1 min
		Elongation	72°C	40 s
Taq-Polymerase	0,3 µl	Amplifikation	72°C	3 min
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl			

Zur Analyse des PCR-Produkts wurden 10 – 15 µl auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. 7.4.4).

#### 7.4.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen. Für Klonierungen werden Vektor und Insert mit den gleichen (oder kompatiblen) Enzymen geschnitten und integrative Plasmide werden vor der Transformation in Hefe durch einen Restriktionsverdau linearisiert. Für diese präparativen Anwendungen wurde folgender Ansatz für mindestens 1 h inkubiert:

DNA	4 – 6 µl Plasmid oder 10 – 25 µl PCR-Produkt
10x Restriktionspuffer	3µl
Enzym(e)	5 – 10 U
H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Der Restriktionspuffer und die Inkubationstemperatur wurden je nach verwendetem Restriktionsenzym gemäß den Herstellerangaben ausgewählt.

Wenn bei Klonierungen der Vektor nach dem Verdau kompatible Enden aufwies, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit Phosphatase entfernt, um eine Religation zu verhindern. Dazu wurde nach der Restriktion 1 µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor das Enzym für 15 min bei 65°C inaktiviert wurde.

Der Restriktionsverdau wurde außerdem zur Überprüfung von Plasmiden eingesetzt, da entsprechend der Plasmidsequenz und den verwendeten Enzymen spezifische DNA-Fragmente entstehen, welche in der Gelelektrophorese analysiert werden können. Für diese Anwendung wurde ein kleinerer Ansatz gewählt, aber ansonsten analog zum präparativen Verdau verfahren:

DNA	1 – 5 µl Plasmid
10x Restriktionspuffer	1µl
Enzym(e)	1 – 4 U
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

#### 7.4.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen und Isolation der DNA-Fragmente

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, da DNA als Polyanion im elektrischen Feld zur Anode wandert und sich kleinere DNA-Moleküle im Agarosegel schneller bewegen als größere (Ausubel et al., 2005). Zur Visualisierung der DNA im Gel diente Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert. Zur Herstellung der Agarosegele wurde 0,75% – 1,5% Agarose in 40 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Gießvorrichtung (Hoefer) gegossen, wobei Taschen für den späteren Auftrag der Proben mit einem Kamm ausgespart wurden. Nach dem Erstarren des Gels wurde es eine mit 1 x TAE gefüllte Gelkammer (Hoefer HE33) überführt. Die zu untersuchende DNA wurde mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente der Gene Ruler DNA Ladder Mix von Fermentas. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 V für 40 – 75 min. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

Zur Isolation von DNA-Molekülen aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben. Zur Elution wurden 30 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt.

### 7.4.5 Ligation

Nach dem Restriktionsverdau können DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden mit Hilfe von Ligasen miteinander verbunden werden. Die relativen Mengen von Vektor und Insert wurden anhand der Intensität der Banden im Agarosegel abgeschätzt und für die Ligation ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 5:1 eingestellt. Für die Ligation wurde folgender Ansatz mindestens 3 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

Vektor-DNA	0,5 – 2 µl
Insert-DNA	2 – 5 µl
10x T4-Ligasepuffer	1 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### 7.4.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde zur Identifizierung von Genen, welche im Yeast-two-Hybrid-Screen isoliert wurden, und zur Kontrolle der Sequenz von PCR-Produkten angewandt. Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration (vgl. 7.4.1.6) und Auswahl eines geeigneten Primers wurde folgender Ansatz zur Sequenzierung an Seqlab (Göttingen) geschickt:

Plasmid-DNA	600 – 700 ng
Primer (10 µM)	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 7 µl

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Bio Edit Sequence Alignment Editor.

## 7.5 Proteinanalytische Methoden

### 7.5.1 Zellaufschluss und Reinigung von Proteinen aus Bakterien

#### 7.5.1.1 Testexpression

Zur Testexpression wurden Transformanden des *E. coli*-Stammes BL21C+ aus einer Vorkultur in zwei Kolben mit je 10 – 20 ml LB<sub>amp,chl</sub> überimpft und bei 25°C kultiviert. Zu einer der beiden Kulturen wurde zur Induktion 0,2% Rhamnose zugegeben (vgl. 7.1.1). Aus den Kulturen wurden jeweils 2 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet und in 75 µl MBP-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 75 µl 2x LSB wurden die Proben für mind. 10 min aufgekocht und 10 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese und Färbung der Proteine mit Rapid Stain (vgl. 7.5.6 + 7.5.7.1) und wurde das Bandenmuster der induzierten und nicht-induzierten Proben verglichen.

### 7.5.1.2 Zellaufschluss mittels French Press

Für die Reinigung von Proteinen wurde BL21C+ mit entsprechenden Expressionsplasmiden in 250 – 500 ml LB<sub>amp,chl</sub> kultiviert und die Expression mit Rhamnose induziert (vgl. 7.1.1). Die Zellen wurden in mehreren Schritten in einer 50 ml-Falconröhre geerntet (5000 Upm 5 – 10 min). Bei einem Kulturvolumen von 500 ml wurden die Zellen in GSA-Zentrifugenbechern (4000 Upm 10 min 4°C) geerntet, in H<sub>2</sub>O resuspendiert und in einer 50 ml-Falconröhre pelletiert (5000 Upm 5 – 10 min). Die Zellpellets wurden gegebenenfalls bei -70°C eingefroren.

Während des Aufschlusses wurden die Proben auf Eis gehalten. Die Zellen wurden gründlich in kaltem Säulenpuffer (je nach angestrebter Reinigung MBP-Puffer oder HIS-Puffer) resuspendiert. Dabei wurden als Faustregel je 100 OD<sub>600</sub> geerntete Zellen 1 ml Puffer eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press (große Zelle, 1000 psig = ca. 70 bar, 3 Durchgänge). Anschließend wurden die Proben in einem SS34-Röhrchen zentrifugiert (15000 Upm 15 min 4°C) und der Überstand mit einer Spritze und einem Filter sterilfiltriert. 100 µl des Lysats wurden mit 100 µl 2x LSB versetzt und 5 min bei 100°C inkubiert. Die Gesamtproteinkonzentration im Lysat wurde mittels Bradford-Test bestimmt (vgl. 7.5.3.1), wofür eine Eichgerade mit BSA-Lösungen von 0,1 – 1,0 mg/ml erstellt wurde.

### 7.5.1.3 Interaktionstest mittels mbp-Affinitätspräzipitation

Für die mbp-Affinitätspräzipitation wurde BL21C+ mit entsprechenden Expressionsplasmiden in 250 ml LB<sub>amp,chl</sub> mit 0,2% Rhamnose bei 25°C kultiviert und die Zellen in 7 ml MBP-Puffer in der French Press aufgeschlossen (vgl. 7.1.1 + 7.5.1.2). Je Probe wurde 0,5 ml Amylose Resin (NEB) eingesetzt. Die Amylosematrix wurde einmal mit 5 ml H<sub>2</sub>O und zweimal mit 5 ml MBP-Puffer gewaschen (3000 Upm 2 min). Dann wurde die Amylosematrix entsprechend der Zahl der Ansätze auf 15 ml-Falconröhren verteilt. Von den Lysaten wurden gleiche Gesamtproteinmengen zugegeben, in der Regel 80 mg. Die Proben wurden 2 h bei 4°C gerollert und abzentrifugiert (3000 Upm 2 min). Die Amylosematrix wurde mehrmals (meist viermal) mit je 5 ml MBP-Puffer gewaschen, bis im Bradford-Schnelltest des Überstandes (200 µl Bradford-Reagenz + 5 µl Überstand, vgl. 7.5.3.2) keine Blaufärbung mehr eintrat. Anschließend wurde die Amylosematrix in 500 µl MBP-Puffer aufgenommen und davon 50 µl mit der gleichen Menge 2x LSB aufgekocht.

Alternativ wurde die Reinigung in kleinerem Maßstab durchgeführt: Dafür wurden 10 mg Protein und 100 µl Amyloresin eingesetzt. Bei den Waschschritten wurde 1 ml Puffer verwendet, am Ende wurde das Präzipitat in 50 µl MBP-Puffer und 100 µl 2x LSB aufgenommen.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden im Allgemeinen 10 µl des Präzipitats eingesetzt.

#### **7.5.1.4 Reinigung von mbp-Fusionsproteinen**

Für die Affinitätsreinigung der  $\alpha$ -Cdc123- und  $\alpha$ -Gcd11-Antiseren (vgl. 9.3.2-3) wurden mbp-Cdc123 bzw. mbp-Gcd11 über Amylosesäulen aufgereinigt. Dazu wurden die mbp-Fusionen in *E. coli* BL21C+ exprimiert (Kulturvolumen 500 ml) und die Zellen mittels French Press aufgeschlossen (vgl. 7.1.1 + 7.5.1.2). Für die Reinigung wurden 2 ml Amylosematrix in eine Säule gefüllt und mit MBP-Puffer äquilibriert. Nach dem Auftrag des Lysats wurde die Säule mit MBP-Puffer gewaschen. Währenddessen wurden 2 ml-Faktionen gesammelt und mittels Bradford-Schnelltest untersucht. Wenn im Bradford-Schnelltest keine Blaufärbung mehr eintrat, wurde das Waschen beendet und das mbp-Fusionsprotein eluiert. Für die Elution wurde MBP-Puffer mit 10 mM Maltose eingesetzt. Das Eluat wurde in 1 ml-Faktionen gesammelt und mittels Bradford-Schnelltest die Faktionen bestimmt, welche das gereinigte Protein enthalten. Diese wurden mit 0,02% Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Amylosesäule wurde durch sukzessives Waschen mit je 5 – 10 ml MBP-Puffer, H<sub>2</sub>O, 0,1% SDS, H<sub>2</sub>O und 40% Methanol regeneriert und bei 4°C gelagert.

#### **7.5.1.5 Reinigung von his6-Fusionsproteinen**

Für die Herstellung eines Antiserums gegen Cdc123 (vgl. 9.3.1) wurde his6-Cdc123 in *E. coli* BL21C+ exprimiert (Kulturvolumen 500 ml) und nach Aufschluss der Zellen in der French Press über eine HIS-Select™ Cartridge (1,25 ml Column von Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Nach mehreren Versuchen zur Bestimmung geeigneter Bedingungen wurde die Reinigung folgendermaßen durchgeführt: Die Säule wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 10 ml HIS-Puffer äquilibriert. Nach dem Auftrag des Lysats wurde die Säule zuerst mit 10 ml HIS-Puffer, dann mit 10 ml denaturierendem Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaPi pH 8,0) und schließlich nochmals mit 10 ml HIS-Puffer gewaschen. Währenddessen wurden 2 ml-Faktionen gesammelt und der Proteingehalt mittels Bradford-Schnelltest untersucht. Zur Elution von his6-Cdc123 wurde HIS-Puffer mit 250 mM Imidazol eingesetzt. Das Eluat wurde in 1 ml-Faktionen gesammelt und mittels Bradford-Schnelltest die Faktionen bestimmt, welche das gereinigte Protein enthalten. Die Säule wurde durch sukzessives Waschen mit je 5 – 10 ml H<sub>2</sub>O, Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M pH 7,5), H<sub>2</sub>O und 30% Ethanol regeneriert und bei 4°C gelagert.

### **7.5.2 Proteinlysate aus Hefen**

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Hefen wurden die Zellen mit Hilfe von Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Hierfür wurden ca. 10 OD<sub>600</sub> Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur geerntet (2000 Upm 3 min) und in 1 ml kaltem H<sub>2</sub>O in ein Schraubdeckelgefäß mit Glasperlen (ca. 0,3 g) überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben auf Eis gehalten. Die Zellen wurden auf die Glasperlen zentrifugiert (13200 Upm 10 sec) und der Überstand abgenommen. Gegebenenfalls

wurden die Proben bei -20°C oder -70°C eingefroren und gelagert. Eingefrorene Proben wurden für den Zellaufschluss auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 120 µl Puffer 3 mit Glycerolphosphat (60 mM), welcher Protease- und Phosphataseinhibitoren enthält, wurden die Zellen für 5 min in der Retsch-Mühle bei 4°C und maximaler Frequenz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13200 Upm 3 min 4°C). Ein Aliquot des Überstands (meist 50 µl) wurde mit dem gleichen Volumen 2 x LSB versetzt und unverzüglich bei 100°C für 5 min aufgekocht. Außerdem wurden 5 µl des Überstands für den Bradford-Test entnommen (vgl. 7.5.3.1). Die Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

### 7.5.3 Bradford-Tests

Der Bradford-Test ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von Proteinen und beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Blau bei der Bindung an Proteine.

#### 7.5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Nach der Gewinnung von Proteinextrakten aus Bakterien (vgl. 7.5.1.2) oder Hefen (vgl. 7.5.2) wurden 5 µl des Proteinlysats 1:10 in Wasser verdünnt und 5 µl dieser Verdünnung mit 495 µl H<sub>2</sub>O und 500 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm („OD<sub>595</sub>“) am Photometer gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz aus 500 µl H<sub>2</sub>O und 500 µl Bradford-Reagenz. Bei der Messung von Bakterienlysaten, welche für die mbp-Affinitätspräzipitation eingesetzt werden sollten, wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration eine Eichgerade erstellt: Dazu wurden BSA-Lösungen der Konzentrationen 100, 250, 500 und 1000 µg/ml verwendet, welche analog zu den Proteinlysaten verdünnt und im Bradford-Test gemessen wurden. Bei der Messung von Hefelysaten wurde in der Regel auf die Erstellung einer Eichgerade verzichtet und stattdessen der Kehrwert der gemessenen OD<sub>595</sub> herangezogen, um von verschiedenen Proben gleiche Proteinmengen für die SDS-Gelelektrophorese oder Immunpräzipitation einzusetzen.

#### 7.5.3.2 Verfolgung von Proteinreinigungen mittels Bradford-Schnelltest

Der Bradford-Schnelltest wurde verwendet, um während der Reinigung von Proteinen verfolgen zu können, welche Wasch- und Elutionsfraktionen Protein enthalten (vgl. 7.5.1.3-5). Dazu wurde in einer Mikrotiterplatte 100 µl Bradford-Reagenz vorgelegt und mit 5 µl Probe versetzt. Sind in der Probe Proteine in hoher Konzentration vorhanden, so kommt es zur Blaufärbung des Bradford-Reagenz.

#### 7.5.4 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) können einzelne Proteine aus einem Zelllysat gereinigt werden. Dafür wird ein Antikörper eingesetzt, der gegen das Protein oder ein mit diesem Protein fusioniertes Epitop gerichtet ist. Die schwere Kette des Antikörpers wird ihrerseits von dem Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden, welches an eine Agarose-Matrix gebunden ist. Durch Sedimentation der Agarose-Matrix kann somit das gewünschte Protein präzipitiert werden. Die Reinigung eines Proteins durch Immunpräzipitation erlaubt die Analyse von Interaktionspartnern (Co-Immunpräzipitation oder Co-IP, vgl. 7.5.4.1) oder die Untersuchung der Phosphorylierung des Proteins (z.B. durch Behandlung mit  $\lambda$ -Phosphatase, vgl. 7.5.4.2).

Für die Immunpräzipitation wurden je nach Experiment 50 – 100 OD<sub>600</sub> Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur (OD<sub>600</sub> 0,5-1,0) geerntet und in 2 – 4 ml kaltem H<sub>2</sub>O auf mehrere Schraubdeckelgefäße mit je 0,3 g Glasperlen verteilt (ca. 25 OD Zellen je Gefäß). Die Zellen wurden auf die Glasperlen zentrifugiert (13200 Upm, 10 sec) und der Überstand abgenommen. Gegebenenfalls wurden die Proben bei -70°C eingefroren und später auf Eis wieder aufgetaut. Um die Degradation von Proteinen durch Proteasen zu vermeiden, wurde während der Immunpräzipitation stets auf Eis gearbeitet und alle Gefäße und Geräte wurden (soweit möglich) vorgekühlt. Zu den Proben wurde 200 µl Puffer 3 mit 60 mM Glycerolphosphat zugegeben und die Zellen für 5 min in der Retsch-Mühle bei 4°C und maximaler Frequenz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13200 Upm 10 min 4°C), die Überstände in einem neuen Reagiergefäß vereinigt und nochmals zentrifugiert. Vom Überstand (Lysat) wurden 5 µl abgenommen und ein Bradford-Test (vgl. 7.5.3.1) durchgeführt. Außerdem wurden 30 – 50 µl Lysat mit dem gleichen Volumen 2x LSB versetzt und 5 min aufgekocht.

Für die IP wurden anhand des Bradford-Tests von allen Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt, in der Regel 100 OD<sub>595</sub> (d.h. 100/gemessene OD<sub>595</sub> = einzusetzendes Volumen in µl). Zu den Proben wurde nun ein geeigneter Antikörper zugegeben, z.B. 80 µl 12CA5 ( $\alpha$ -ha), 80 µl 9E10 ( $\alpha$ -myc), 80 µl 1:100 in Puffer 3 verdünnter oder 1 µl unverdünnter M2-Antikörper ( $\alpha$ -flag) oder 10 µl affinitätsgereinigter  $\alpha$ -Cdc123-Antikörper. Die Proben wurden mit Puffer 3 (mit 60 mM Glycerolphosphat) auf 500 µl aufgefüllt und für ca. 2 h bei 4°C inkubiert. Von der ProteinA-Agarose wurden 40 µl je Ansatz verwendet und 2x mit 1 ml Puffer 3 gewaschen. Anschließend wurde die ProteinA-Agarose in Puffer 3 mit 60 mM Glycerolphosphat aufgenommen und auf die IP-Ansätze verteilt, welche danach 2 h bei 4°C gerollert wurden. Die Agarose-Matrix und die daran gebundenen Proteine wurden kurz abzentrifugiert (13200 Upm 5 – 10 s) und der Überstand abgenommen. Die Weiterverarbeitung unterschied sich je nach Anwendung.

#### 7.5.4.1 Co-Immunpräzipitation

Für die Analyse von Protein-Interaktionen wurde die präzipitierte ProteinA-Agarose dreimal mit 1 ml Puffer 3 gewaschen. Anschließend wurde der Überstand mit einer Hamilton-Spritze vollständig entfernt. Das Präzipitat wurde in 30 – 40 µl 1x LSB aufgenommen und für 5 min bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Für die Detektion des präzipitierten Proteins wurden 1 – 3 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen, für den Nachweis von Interaktionspartnern wurden je nach untersuchten Proteinen 2 – 10 µl eingesetzt.

#### 7.5.4.2 Behandlung mit $\lambda$ -Phosphatase

Für die Analyse der Phosphorylierung wurde die präzipitierte ProteinA-Agarose zunächst zweimal mit 1 ml Puffer 3 (ohne Glycerolphosphat), dann zweimal mit 1 ml  $\lambda$ -Phosphatase-Puffer gewaschen. Beim letzten Waschschritt wurde die Probe auf zwei Ansätze verteilt und der Überstand nach der Zentrifugation vollständig mit einer Hamilton-Spritze abgenommen. Bei einem Ansatz wurden 50 µl  $\lambda$ -Phosphatase-Puffer zugegeben (Kontrolle), beim anderen Ansatz 49 µl  $\lambda$ -Phosphatase-Puffer und 1 µl  $\lambda$ -Phosphatase (400 U/µl). Beide Ansätze wurden für 1 h bei 30°C im Heizblock inkubiert und gelegentlich durch Anschnipsen resuspendiert. Danach wurde die ProteinA-Agarose kurz abzentrifugiert (13200 Upm 5 – 10 s) und zweimal mit 0,5 – 1 ml  $\lambda$ -Phosphatase-Puffer gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand mit einer Hamilton-Spritze vollständig entfernt, das Präzipitat wurde in 45 µl 1x LSB aufgenommen und für 5 min bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Dafür wurden meist SDS-Gele mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 29:1 verwendet und 1 – 3 µl Probe aufgetragen.

### 7.5.5 Reinigung von Proteinen für die Massenspektrometrie

Zur Reinigung von Cdc123 mit N- oder C-terminalem flag3-Epitop wurden die Stämme W6890 (*leu2::pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2*) bzw. W7474 (*leu2::pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1-LEU2*) in 1000 ml XYR bei 25°C kultiviert und der *GAL1*-Promotor für ca. 3 h mit 2% Galaktose induziert. Die Zellen wurden in GSA-Bechern geerntet (2500 Upm 10 min 4°C), mit H<sub>2</sub>O in eine 50 ml-Falconröhre überführt und erneut pelletiert. Die Zellen wurden in 14 ml Puffer 3 mit 60 mM Glycerolphosphat resuspendiert und in der French Press aufgeschlossen (große Zelle, 1000 psig = ca. 70 bar, 4 Durchgänge). Nach der Zentrifugation in SS34-Röhrchen (15000 Upm 15 min 4°C) wurde der Überstand sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration im Lysat wurde über einen Bradford-Test mit Eichgerade (vgl. 7.5.3.1) bestimmt.

Für die Reinigung von flag-Cdc123 wurden 400 µl  $\alpha$ -flag-Gelsuspension zweimal mit 500 µl Puffer 3 gewaschen und auf 4 Ansätze aufgeteilt. Zu jedem Ansatz wurden 500 µl Puffer 3 und 500 µl W6890-Lysat (ca. 400 OD<sub>595</sub> bzw. 8 mg) zugegeben und die Proben 2 h bei 4°C gerollert. Nach der

Zentrifugation (4000 g 1 min) wurde die α-flag-Matrix dreimal mit 500 µl Puffer 3 gewaschen und der Überstand beim letzten Mal mit der Hamilton-Spritze komplett abgenommen. Die Elution von flag-Cdc123 von der Matrix erfolgte durch Inkubation in 250 µl 4 M MgCl<sub>2</sub> für 15 min. Die Eluate der vier Ansätze wurden vereinigt und über eine Säule (Biomax-10 NMWL Membrane von Millipore) umgepuffert und konzentriert. Dafür wurde das Säulchen mit 500 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen (12000 g 5 min 4°C) und das Eluat portionsweise auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation bei 12000 g und 4°C auf ca. 100 µl konzentriert. Anschließend wurden dreimal 500 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zugegeben und wieder durch Zentrifugation bei 12000 g und 4°C auf ca. 100 µl konzentriert. So wurden am Ende 100 µl konzentrierte Proteinlösung erhalten.

Für die Reinigung von Cdc123-flag wurde die Methode geringfügig modifiziert: Es wurden 250 µl α-flag-Gelsuspension eingesetzt und nach dem Waschen auf 5 Ansätze aufgeteilt. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml W7474-Lysat (ca. 550 OD<sub>595</sub> bzw. 15 mg) zugegeben. Die Elution erfolgte mit 50 µl 4 M MgCl<sub>2</sub> je Ansatz. Der Pufferwechsel und die Konzentration der Eluate über eine Säule erfolgten wie oben beschrieben.

### 7.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt (Ausubel et al., 2005). Durch die Anlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen wandern die Proteine im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung zur Anode, wobei sich kleinere Proteine im Polyacrylamidgel schneller bewegen als große. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE durchlaufen die Proben zwei Abschnitte (Sammelgel und Trenngel), die sich hinsichtlich der Polyacrylamid-Konzentration, der Ionenstärke und des pH-Wertes unterscheiden. Dies bewirkt eine Konzentrierung der Proben beim Eintritt in das Trenngel und erleichtert so die anschließende Auftrennung der Proteine in distinkte Banden.

Für die Herstellung eines Gels wurden folgende Ansätze verwendet:

Trenngel	Sammelgel		
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	H <sub>2</sub> O	1,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	625 µl
Acrylamid-Mix	1,8 ml	Acrylamid-Mix	335 µl
10% SDS	60 µl	10% SDS	25 µl
10% APS	36,5 µl	10% APS	25 µl
TEMED	3,65 µl	TEMED	2,5 µl

Als Acrylamid-Mix wurden 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösungen verwendet. Für Standard-Anwendungen wurde eine Lösung mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 37,5:1 eingesetzt, zur besseren Auftrennung verschiedener Phosphoformen von Cdc123 wurde ein Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 29:1 bevorzugt. APS und TEMED wurden jeweils unmittelbar

vor dem Gießen zum Starten der Polymerisation zugegeben. Zunächst wurde das Trengel zwischen die mit einem Gummi abgedichteten Glasplatten gegossen und ca. 6 cm hoch eingefüllt. Das Trengel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und das Austrocknen während der Polymerisation zu vermeiden. Nach ca. 20 min war das Trengel fest, woraufhin das Isopropanol entfernt wurde und das Sammelgel eingefüllt wurde. Dabei wurde ein Kamm zur Aussparung von Taschen für den Probenauftrag eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels konnten die SDS-Gele für einige Tage im Kühlschrank gelagert werden, wobei sie zum Schutz vor Austrocknung in feuchtes Küchenpapier gewickelt und in einer Tüte verschlossen wurden.

Um bei Hefelysaten gleiche Proteinmengen aufzutragen, wurde der Bradford-Test herangezogen. Das aufzutragende Volumen in  $\mu\text{l}$  wurde als  $1/\text{OD}_{595}$  berechnet. Dieses Vorgehen wurde als „Auftrag von 1  $\text{OD}_{595}$ “ bezeichnet. Bei Bedarf wurde die Auftragsmenge von 0,5 – 2  $\text{OD}_{595}$  variiert. Als Größenstandard wurde der ColourPlus Proteinmarker von NEB verwendet.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 – 30 mA je Gel in einer Minigel Twin G42-Apparatur (Biometra) mit 1x Turbo-LRB als Laufpuffer und wurde in der Regel beendet, sobald die blaue Bande des Ladepuffers (LSB) das Gel verlassen hatte. Nach der Elektrophorese wurde in der Regel nur das Trengel weiter verwendet. Die Proteine wurden entweder im Gel gefärbt (7.5.7) oder mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und einzelne Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen (7.5.8).

### 7.5.7 Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung der Proteine nach der Gelelektrophorese wurde dazu verwendet, um durch Vergleich von induzierten und nicht-induzierten Proben den Erfolg einer Überexpression in *E. coli* einzuschätzen (vgl. 7.5.1.1) oder nach der Säulenreinigung von Proteinen die Reinheit der Präparation zu beurteilen (vgl. 7.5.1.4-5 und 7.5.5).

#### 7.5.7.1 Rapid Stain-Färbung

Um Proteine mit Rapid Stain zu färben, wurde das (Trenn-)Gel dreimal für 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und für 1 h unter Schwenken mit dem Färbemittel RAPID Stain™ (G-Biosciences) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, bis die Proteinbanden erkennbar waren. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

#### 7.5.7.2 Silbernitrat-Färbung

Ein sensitiverer Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen ist durch Silbernitrat möglich. Diese Methode wurde bei der Reinigung von Cdc123 für die Massenspektrometrie verwendet, um die Qualität der Präparation und die Menge des gereinigten Proteins abzuschätzen. Nach der Elektrophorese wurde

das Gel unter Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: zunächst 20 min in 5% Methanol 5% Essigsäure, dann 10 min in 50% Methanol und 10 min in H<sub>2</sub>O. Nach 1 min in 0,02% Natriumthiosulfat (entspricht 0,03% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O) wurde das Gel zweimal für 1 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 20 min in vorgekühltem 0,1% AgNO<sub>3</sub> im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal für 1 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und unter Schütteln in einer Lösung von 0,04% Formalin in 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> entwickelt (Formalin = 37% Formaldehyd). Sobald die Färbung der Proteine deutlich sichtbar war, wurde das Gel in 5% Essigsäure fixiert und schließlich in 1% Essigsäure aufbewahrt. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

### 7.5.8 Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Western Blot dient zum Transfer von Proteinen aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran, wodurch anschließend die spezifische Detektion einzelner Proteine über Antikörper möglich ist. Zur Übertragung der Proteine wurde auf die Anode der Elektroblotting-Apparatur zunächst ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (GB005) aufgelegt. Darauf folgten die Nitrocellulosemembran, welche in H<sub>2</sub>O und Transferpuffer gewaschen wurde, und das Trenngel. Den Abschluss bildete ein weiteres in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier. Nach dem Entfernen von Luftblasen mit einem Trigalski-Spatel wurde die Apparatur geschlossen. Der Transfer erfolgte über 70 min bei 40 mA je Blot. Danach wurde die Membran zur Färbung der Proteine 5 min in Ponceau S geschwenkt, mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt. Die Färbung mit Ponceau S erlaubte neben der Kontrolle des Proteintransfers auch einen Vergleich der aufgetragenen Proben hinsichtlich ihrer Proteinmenge und Qualität.

Um beim immunologischen Nachweis eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu vermeiden, wurden die Bindungsstellen der Membran durch Inkubation für ca. 1 h in Milchpulver-Lösung (5% Magermilchpulver in TBS-T) gesättigt. Danach wurde der primäre Antikörper in 7 ml Milchpulver-Lösung zugegeben und die Membran für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper in 7 ml Milchpulver-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran wieder dreimal für 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Detektionsmethoden, Chemilumineszenz und Fluoreszenz, eingesetzt: Im Fall des Chemilumineszenz-Nachweis war der sekundäre Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase (horse-radish peroxidase, HRP) gekoppelt. Die Membran wurde in einem abgedunkelten Raum gleichmäßig mit einer HRP-Substrat-Lösung (Chemiluminescence Blotting Substrate von Roche: 10 µl Reagenz A und 990 µl Reagenz B) bedeckt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Röntgenfilme aufgelegt und anschließend entwickelt.

In späteren Versuchen wurden sekundäre Antikörper verwendet, welche mit einem Fluorophor gekoppelt sind (LI-COR). Mit Hilfe des LI-COR Odyssey Imagers wurden die Fluorophore angeregt und die Fluoreszenz bei 700 nm oder 800 nm (je nach verwendetem sekundärem Antikörper) detektiert. Mit Hilfe der Firmensoftware war auch eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale möglich.

## 7.6 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H)

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-two-hybrid, Y2H) dient zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (Ausubel et al., 2005). Es nutzt den Umstand, dass Transkriptionsfaktoren meist getrennte Domänen zur Bindung an die DNA und zur Aktivierung der Transkription besitzen. Zur Analyse von Interaktionspartnern im Y2H werden zwei Fusionsproteine exprimiert: Das eine der beiden zu testenden Proteine wird mit einer DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert, das andere mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Wenn die zu testenden Proteine miteinander interagieren, so bilden die Fusionsproteine einen Komplex, welcher durch die Kombination von BD und AD als Transkriptionsfaktor wirkt. Die Transkriptionsaktivierung lässt sich über geeignete Reportergene verfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt, um den Einfluss von Mutationen auf die Interaktion von Gcd11 mit Sui2, Sui3 und Cdc123 zu testen. Außerdem wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System für die Identifikation von Cdc123-Interaktionspartnern verwendet. Dieser Screen, der in Zusammenarbeit mit Adelheid Weissgerber durchgeführt wurde, wich in einigen Punkten von den hier beschriebenen Experimenten ab und ist in Anhang 9.2.4 näher erläutert.

Für die Versuche wurden von den Vektoren pEG202 und pJG4-5 abgeleitete Plasmide und der Reporterstamm W276 verwendet. Der Vektor pEG202 ( $2\mu$ , *HIS3*) dient zur konstitutiven Expression von Fusionen mit der LexA-DNA-Bindedomäne. Der Vektor pJG4-5 ( $2\mu$ , *TRP1*) ermöglicht die Expression von AD-Fusionen unter Kontrolle eines regulierbaren *GAL*-Promotors. Der Stamm W276 enthält zwei Reportergene unter Kontrolle des lexA-Operators (*ura3-52::lexAop-lacZ-URA3 leu2::lexAop-LEU2*). Die Expression von *lacZ* kann durch den Einsatz chromogener Substrate der  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen werden, die Expression von *LEU2* durch Wachstum auf Selektivmedium ohne Leucin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *lacZ*-Reporter verwendet: Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Um die Interaktion von zwei Proteinen zu testen, wurde der Stamm W276 mit geeigneten pEG202- und pJG4-5-Derivaten co-transformiert und die Transformanden auf SD-HT selektiert. Jeweils sechs Transformanden wurden in einer Mikrotiterplatte in 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit dem Frogger auf SD-HT (Vorratsplatte) und SRG-HT (Testplatte) gestempelt. Die Platten wurden 2 – 3 Tage bei 25°C inkubiert. Beim Wachstum der Hefen auf der Testplatte (SRG-HT) wird der *GAL*-Promotor der pJG4-5-Plasmide induziert und somit werden beide Fusionsproteine exprimiert. Um ihre Interaktion

zu analysieren, wurde die Testplatte nach dem Wachstum der Hefen mit X-Gal-Agar überschichtet (Rupp, 2002) und für mehrere Stunden oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Blaufärbung wurde fotografisch dokumentiert.

X-Gal-Agar:	5 ml	1% Agar (aufgekocht und auf 60°C abgekühlt)
	5 ml	1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
	600 µl	DMFA
	100 µl	10% SDS
	100 µl	X-Gal (20 mg/ml in DMFA)

## 7.7 Analyse der Expression des *GCN4-lacZ*-Reporters: ONPG-Test

Zur Analyse der *GCN4*-Expression wurde ein *GCN4-lacZ*-Reporter verwendet und die β-Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des chromogenen Substrats ONPG (2- oder ortho-Nitrophenyl-β-D-Galakto-pyranosid) nachgewiesen (Ausubel et al., 2005). In der Regel wurde das etablierte Reporterplasmid p180 (Hinnebusch, 1985) verwendet, welches einen *URA3*-Marker enthält. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Reporterplasmide pWS3395 und pWS3396 mit *TRP1*- bzw. *LEU2*-Marker kloniert.

Die Hefestämme wurden mit einem geeigneten Reporterplasmid transformiert. Für den ONPG-Test wurden die Transformanden in der Regel in Selektivmedium kultiviert, um den Verlust des Reporterplasmids zu vermeiden. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden 1 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet (13200 Upm 3 min) und in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden entnommen und zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> eingesetzt. Die verbliebenen 900 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl SDS (0,25%) und 50 µl Chloroform versetzt; ebenso wurde mit der Referenz (900 µl Z-Puffer) verfahren. Proben und Referenz wurden für 15 min bei 37°C geschüttelt. Nach der Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0) wurde die Inkubation bei 37°C im Schüttelheizblock fortgesetzt. Bei Auftreten einer schwachen Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und die Zeit seit der ONPG-Zugabe notiert. Nach der Zentrifugation (13200 Upm 1 min) wurde 1 ml des Überstands in eine Küvette pipettiert und die Absorption bei 420 nm (A<sub>420</sub>) photometrisch bestimmt, wobei die Referenz als Nullabgleich verwendet wurde. Die β-Galaktosidase-Aktivität (in U) wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{1000 \times A_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

Hierbei stellen A<sub>420</sub> die Absorption des Überstands, OD<sub>600</sub> die optische Dichte der Zellsuspension, t die Reaktionszeit in Minuten und V das eingesetzte Volumen an Zellsuspension in ml (in der Regel 0,9 ml) dar.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberghina L., Rossi R. L., Querin L., Wanke V., Vanoni M. (2004). A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol* 167, 433-43.
- Algire M. A., Maag D., Lorsch J. R. (2005). Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell* 20, 251-62.
- Alone P. V., Dever T. E. (2006). Direct binding of translation initiation factor eIF2gamma-G domain to its GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors eIF5 and eIF2B epsilon. *J Biol Chem* 281, 12636-44.
- Alting-Mees M. A., Short J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 17, 9494.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (2005). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Berghammer H., Auer B. (1993). "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14, 524, 528.
- Bieganowski P., Shilinski K., Tsichlis P. N., Brenner C. (2004). Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance. *J Biol Chem* 279, 44656-66.
- Bodenmiller B., Campbell D., Gerrits B., Lam H., Jovanovic M., Picotti P., Schlapbach R., Aebersold R. (2008). PhosphoPep--a database of protein phosphorylation sites in model organisms. *Nat Biotechnol* 26, 1339-40.
- Branzei D., Foiani M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 208-19.
- Campbell S. G., Hoyle N. P., Ashe M. P. (2005). Dynamic cycling of eIF2 through a large eIF2B-containing cytoplasmic body: implications for translation control. *J Cell Biol* 170, 925-34.
- Castillo A. R., Meehl J. B., Morgan G., Schutz-Geschwender A., Winey M. (2002). The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol* 156, 453-65.
- Chen S. J., Lin G., Chang K. J., Yeh L. S., Wang C. C. (2008). Translational efficiency of a non-AUG initiation codon is significantly affected by its sequence context in yeast. *J Biol Chem* 283, 3173-80.
- Cherkasova V., Qiu H., Hinnebusch A. G. (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol Cell Biol* 30, 2862-73.
- Cherkasova V. A., Hinnebusch A. G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev* 17, 859-72.
- Cigan A. M., Pabich E. K., Feng L., Donahue T. F. (1989). Yeast translation initiation suppressor sui2 encodes the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2784-8.
- Cohen P., Frame S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-76.
- Conte M. R., Kelly G., Babon J., Sanfelice D., Youell J., Smerdon S. J., Proud C. G. (2006). Structure of the eukaryotic initiation factor (eIF) 5 reveals a fold common to several translation factors. *Biochemistry* 45, 4550-8.
- Cyert M. S. (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 35, 647-72.
- D'Amours D., Amon A. (2004). At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* 18, 2581-95.
- Dar A. C., Dever T. E., Sicheri F. (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122, 887-900.
- Das S., Ghosh R., Maitra U. (2001). Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 276, 6720-6.
- Delepine M., Nicolino M., Barrett T., Golamally M., Lathrop G. M., Julier C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25, 406-9.
- Dev K., Qiu H., Dong J., Zhang F., Barthlme D., Hinnebusch A. G. (2010). The beta/Gcd7 subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B), a guanine nucleotide exchange factor, is crucial for binding eIF2 in vivo. *Mol Cell Biol* 30, 5218-33.
- Dever T. E., Dar A. C., Sicheri F. (2007). The eIF2alpha kinases. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 48, pp. 319-344.

- Dey M., Trieselmann B., Locke E. G., Lu J., Cao C., Dar A. C., Krishnamoorthy T., Dong J., Sicheri F., Dever T. E. (2005). PKR and GCN2 kinases and guanine nucleotide exchange factor eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B) recognize overlapping surfaces on eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 25, 3063-75.
- Dhaliwal S., Hoffman D. W. (2003). The crystal structure of the N-terminal region of the alpha subunit of translation initiation factor 2 (eIF2alpha) from *Saccharomyces cerevisiae* provides a view of the loop containing serine 51, the target of the eIF2alpha-specific kinases. *J Mol Biol* 334, 187-95.
- Donahue T. F. (2000). Genetic approaches to translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Sonenberg N., Hershey J. W., Mathews M. B., Translational Control of Gene Expression, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 39, pp. 487-502.
- Dorris D. R., Erickson F. L., Hannig E. M. (1995). Mutations in GCD11, the structural gene for eIF-2 gamma in yeast, alter translational regulation of GCN4 and the selection of the start site for protein synthesis. *Embo J* 14, 2239-49.
- Elroy-Stein O., Merrick W. C. (2007). Translation initiation via cellular internal ribosome entry sites. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 48, pp. 155-172.
- Enserink J. M., Kolodner R. D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5, 11.
- Erickson F. L., Nika J., Rippel S., Hannig E. M. (2001). Minimum requirements for the function of eukaryotic translation initiation factor 2. *Genetics* 158, 123-32.
- Evan G. I., Lewis G. K., Ramsay G., Bishop J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.
- Field J., Nikawa J., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I. A., Lerner R. A., Wigler M. (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-65.
- Fogli A., Boespflug-Tanguy O. (2006). The large spectrum of eIF2B-related diseases. *Biochem Soc Trans* 34, 22-9.
- Fribourg S., Romier C., Werten S., Gangloff Y. G., Poterszman A., Moras D. (2001). Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of subunits in *E. coli*. *J Mol Biol* 306, 363-73.
- Fu Y., Pastushok L., Xiao W. (2008). DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 32, 908-26.
- Fujimura H., Sakuma Y. (1993). Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques* 14, 538-40.
- Gavin A. C., Aloy P., Grandi P., Krause R., Boesche M., Marzioch M., Rau C., Jensen L. J., Bastuck S., Dumpelfeld B., Edelmann A., Heurtier M. A., Hoffman V., Hoefer C., Klein K., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-6.
- Gebauer F., Hentze M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 827-35.
- Gietz R. D., Woods R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Goldstein A. L., McCusker J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-53.
- Grarup N., Andersen G., Krarup N. T., Albrechtsen A., Schmitz O., Jorgensen T., Borch-Johnsen K., Hansen T., Pedersen O. (2008). Association testing of novel type 2 diabetes risk alleles in the JAZF1, CDC123/CAMK1D, TSPAN8, THADA, ADAMTS9, and NOTCH2 loci with insulin release, insulin sensitivity, and obesity in a population-based sample of 4,516 glucose-tolerant middle-aged Danes. *Diabetes* 57, 2534-40.
- Haase S. B., Reed S. I. (2002). Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* 1, 132-6.
- Hanks S. K., Hunter T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9, 576-96.
- Hannig E. M., Cigan A. M., Freeman B. A., Kinzy T. G. (1993). GCD11, a negative regulator of GCN4 expression, encodes the gamma subunit of eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 506-20.
- Harding H. P., Zeng H., Zhang Y., Jungries R., Chung P., Plesken H., Sabatini D. D., Ron D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7, 1153-63.
- Harding H. P., Ron D. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 51 Suppl 3, S455-61.
- Hartwell L. H., Culotti J., Reid B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 352-9.

- Hartwell L. H., Mortimer R. K., Culotti J., Culotti M. (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics* 74, 267-86.
- Hashimoto N. N., Carnevalli L. S., Castilho B. A. (2002). Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. *Biochem J* 367, 359-68.
- Heigl U. (2007). Funktionsanalyse des Zellproliferationsproteins Cdc123. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie; Lehrstuhl für Genetik.
- Hentze M. W., Gebauer F., Preiss T. (2007). cis-regulatory sequences and trans-acting factors in translational control. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 48, pp. 269-296.
- Hicke L., Zanolari B., Riezman H. (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 141, 349-58.
- Hinnebusch A. G. (1984). Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 6442-6.
- Hinnebusch A. G. (1985). A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5, 2349-60.
- Hinnebusch A. G. (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: Sonenberg N., Hershey J. W., Mathews M. B., Translational Control of Gene Expression, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 39, pp. 185-244.
- Hinnebusch A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-50.
- Hinnebusch A. G., Dever T. E., Asano K. (2007). Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 48, pp. 225-268.
- Hinnebusch A. G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 434-67, first page of table of contents.
- Hirmer S. (2009). Genetische Studien zur Kopplung von Proteinsynthese und Zellteilung in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik.
- Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G. D., Moore L., Adams S. L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-3.
- Hoja M. R., Wahlestedt C., Hoog C. (2000). A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins. *Exp Cell Res* 259, 239-46.
- Holcik M., Sonenberg N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-27.
- Huang D., Friesen H., Andrews B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* 66, 303-14.
- Humphrey T., Pearce A. (2005). Cell cycle molecules and mechanisms of the budding and fission yeasts. *Methods Mol Biol* 296, 3-29.
- Hunter T., Plowman G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22, 18-22.
- Huxley C., Green E. D., Dunham I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6, 236.
- Irniger S., Braus G. H. (2003). Controlling transcription by destruction: the regulation of yeast Gcn4p stability. *Curr Genet* 44, 8-18.
- Ito T., Marinchev A., Wagner G. (2004). Solution structure of human initiation factor eIF2alpha reveals homology to the elongation factor eEF1B. *Structure* 12, 1693-704.
- Jackson R. J., Kaminski A., Pöyry T. A. (2007). Coupled termination-reinitiation events in mRNA translation. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 48, pp. 197-224.
- Jackson R. J., Hellen C. U., Pestova T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-27.
- Janke C., Magiera M. M., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H., Moreno-Borchart A., Doenges G., Schwob E., Schiebel E., Knop M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-62.
- Jennings M. D., Pavitt G. D. (2010a). eIF5 is a dual function GAP and GDI for eukaryotic translational control. *Small Gtpases* 1, 118-123.
- Jennings M. D., Pavitt G. D. (2010b). eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation. *Nature* 465, 378-81.

- Jorgensen P., Tyers M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14, R1014-27.
- Kapp L. D., Lorsch J. R. (2004). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol* 335, 923-36.
- Kozak M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1-34.
- Krishnamoorthy T., Pavitt G. D., Zhang F., Dever T. E., Hinnebusch A. G. (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol* 21, 5018-30.
- Krogan N. J., Cagney G., Yu H., Zhong G., Guo X., Ignatchenko A., Li J., Pu S., Datta N., Tikuisis A. P., Punna T., Peregrin-Alvarez J. M., Shales M., Zhang X., Davey M., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-43.
- Küpper M. (2007). Wechselwirkung des Zellproliferationsfaktors Cdc123 mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF2. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie; Lehrstuhl für Genetik.
- Lee M. W., Kim B. J., Choi H. K., Ryu M. J., Kim S. B., Kang K. M., Cho E. J., Youn H. D., Huh W. K., Kim S. T. (2007). Global protein expression profiling of budding yeast in response to DNA damage. *Yeast* 24, 145-54.
- Longtine M. S., McKenzie A., 3rd, Demarini D. J., Shah N. G., Wach A., Brachat A., Philippsen P., Pringle J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-61.
- Loscar M. (2009). Genetische Charakterisierung des CDC123-Promotors. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik.
- Marchal C., Haguenuer-Tsapis R., Urban-Grimal D. (2000). Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* 275, 23608-14.
- Meijer H. A., Thomas A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J* 367, 1-11.
- Meimoun A., Holtzman T., Weissman Z., McBride H. J., Stillman D. J., Fink G. R., Kornitzer D. (2000). Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* 11, 915-27.
- Meitinger F. (2007). Genetische Analyse der Interaktion des Translationsinitiationsfaktors Gcd11 mit Cdc123. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik.
- Menssen R., Neutzner A., Seufert W. (2001). Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. *Curr Biol* 11, 345-50.
- Merrick W. C., Nyborg J. (2000). The protein biosynthesis elongation cycle. In: Sonenberg N., Hershey J. W., Mathews M. B., Translational Control of Gene Expression, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, monograph 39, pp. 89-126.
- Mitchell D. A., Marshall T. K., Deschenes R. J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, 715-22.
- Mitchell S. F., Lorsch J. R. (2008). Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition. *J Biol Chem* 283, 27345-9.
- Mohammad-Qureshi S. S., Haddad R., Hemingway E. J., Richardson J. P., Pavitt G. D. (2007). Critical contacts between the eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) catalytic domain and both eIF2beta and -2gamma mediate guanine nucleotide exchange. *Mol Cell Biol* 27, 5225-34.
- Morgan D. O. (2007). The Cell Cycle - Principles of Control. *New Science Press Ltd*.
- Morgenthaler C. (2009). Genetische Funktionsanalyse des Zellproliferationsproteins Cdc123 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik.
- Moriya H., Johnston M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1572-7.
- Mullen J. R., Kaliraman V., Ibrahim S. S., Brill S. J. (2001). Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157, 103-18.
- Mullis K., Falloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.
- Munzarova V., Panek J., Gunisova S., Danyi I., Szamecz B., Valasek L. S. (2011). Translation Reinitiation Relies on the Interaction between eIF3a/TIF32 and Progressively Folded cis-Acting mRNA Elements Preceding Short uORFs. *PLoS Genet* 7, e1002137.

- Musacchio A., Salmon E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-93.
- Nachtsheim C. (2002). Characterization of Cdc123 and its interaction with Rbx8 and Rbx9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik.
- Naveau M., Lazennec-Schurdevin C., Panvert M., Mechulam Y., Schmitt E. (2010). tRNA binding properties of eukaryotic translation initiation factor 2 from *Encephalitozoon cuniculi*. *Biochemistry* 49, 8680-8.
- Nikonov O., Stolboushkina E., Nikulin A., Hasenohrl D., Blasi U., Manstein D. J., Fedorov R., Garber M., Nikonov S. (2007). New insights into the interactions of the translation initiation factor 2 from archaea with guanine nucleotides and initiator tRNA. *J Mol Biol* 373, 328-36.
- Noree C., Sato B. K., Broyer R. M., Wilhelm J. E. (2010). Identification of novel filament-forming proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 190, 541-51.
- Ohno K., Kimura G. (1984). Genetic analysis of control of proliferation in fibroblastic cells in culture. II. Alteration in proliferative and survival phenotypes in a set of temperature-sensitive mutants of rat 3Y1 cells after infection or transformation with simian virus 40. *Somat Cell Mol Genet* 10, 29-36.
- Ohno K., Okuda A., Ohtsu M., Kimura G. (1984). Genetic analysis of control of proliferation in fibroblastic cells in culture. I. Isolation and characterization of mutants temperature-sensitive for proliferation or survival of untransformed diploid rat cell line 3Y1. *Somat Cell Mol Genet* 10, 17-28.
- Ohya Y., Kawasaki H., Suzuki K., Londesborough J., Anraku Y. (1991). Two yeast genes encoding calmodulin-dependent protein kinases. Isolation, sequencing and bacterial expressions of CMK1 and CMK2. *J Biol Chem* 266, 12784-94.
- Okuda A., Kimura G. (1996). An amino acid change in novel protein D123 is responsible for temperature-sensitive G1-phase arrest in a mutant of rat fibroblast line 3Y1. *Exp Cell Res* 223, 242-9.
- Okuda A., Ohtsu M., Kimura G. (1999). Extensive degradation of mutant-type D123 protein is responsible for temperature-sensitive proliferation inhibition in 3Y1tsD123 cells. *Cell Struct Funct* 24, 443-9.
- Okuda A., Ohtsu M., Kimura G. (2001). Reversion of temperature-sensitive mutation by inhibition of proteasome-mediated degradation of mutated D123 protein. *Cell Struct Funct* 26, 205-14.
- Onisto M., Zeilante P., Scannapieco P., Pellati D., Pozza M., Caenazzo C., Negro A., Garbisa S. (1998). Expression study on D123 gene product: evidence for high positivity in testis. *Exp Cell Res* 242, 451-9.
- Pal G., Paraz M. T., Kellogg D. R. (2008). Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *J Cell Biol* 180, 931-45.
- Paquin N., Chartrand P. (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol* 18, 105-11.
- Park M. H., Nishimura K., Zanelli C. F., Valentini S. R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38, 491-500.
- Pavitt G. D., Ramaiah K. V., Kimball S. R., Hinnebusch A. G. (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* 12, 514-26.
- Pavitt G. D. (2005). eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans* 33, 1487-92.
- Pestka S. (1971). Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol* 25, 487-562.
- Pestova T. V., Lorsch J. R., Hellen C. U. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W., Translational Control in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, monograph 48, pp. 87-128.
- Polekhina G., Thirup S., Kjeldgaard M., Nissen P., Lippmann C., Nyborg J. (1996). Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure* 4, 1141-51.
- Polymenis M., Schmidt E. V. (1997). Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev* 11, 2522-31.
- Pries R., Bomeke K., Irniger S., Grundmann O., Braus G. H. (2002). Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus. *Eukaryot Cell* 1, 663-72.
- Proud C. G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.
- Proud C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 403, 217-34.
- Ptacek J., Devgan G., Michaud G., Zhu H., Zhu X., Fasolo J., Guo H., Jona G., Breitkreutz A., Sopko R., McCartney R. R., Schmidt M. C., Rachidi N., Lee S. J., Mah A. S., et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-84.
- Pyronnet S., Sonenberg N. (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev* 11, 13-8.
- Reinhardt H. C., Yaffe M. B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 21, 245-55.

- Richter F. (2006). Das konservierte Zellproliferationsgen CDC123 kodiert für einen Initiationsfaktor der Translation: 2gamma-AP. *Doktorarbeit*, Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik.
- Robinson L. C., Bradley C., Bryan J. D., Jerome A., Kweon Y., Panek H. R. (1999). The Yck2 yeast casein kinase 1 isoform shows cell cycle-specific localization to sites of polarized growth and is required for proper septin organization. *Mol Biol Cell* 10, 1077-92.
- Rodnina M. V., Wintermeyer W. (2009). Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 21, 435-43.
- Roll-Mecak A., Alone P., Cao C., Dever T. E., Burley S. K. (2004). X-ray structure of translation initiation factor eIF2gamma: implications for tRNA and eIF2alpha binding. *J Biol Chem* 279, 10634-42.
- Rouse J. (2009). Control of genome stability by SLX protein complexes. *Biochem Soc Trans* 37, 495-510.
- Rubenstein E. M., Schmidt M. C. (2007). Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 6, 571-83.
- Rupes I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet* 18, 479-85.
- Rupp S. (2002). LacZ assays in yeast. *Methods Enzymol* 350, 112-31.
- Santangelo G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 253-82.
- Scheper G. C., van der Knaap M. S., Proud C. G. (2007). Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet* 8, 711-23.
- Scheuner D., Song B., McEwen E., Liu C., Laybutt R., Gillespie P., Saunders T., Bonner-Weir S., Kaufman R. J. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7, 1165-76.
- Scheuner D., Vander Mierde D., Song B., Flamez D., Creemers J. W., Tsukamoto K., Ribick M., Schuit F. C., Kaufman R. J. (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11, 757-64.
- Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. (2002). The large subunit of initiation factor eIF2 is a close structural homologue of elongation factors. *Embo J* 21, 1821-32.
- Schmitt E., Naveau M., Mechulam Y. (2010). Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Lett* 584, 405-12.
- Segurado M., Tercero J. A. (2009). The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* 101, 617-27.
- Shi Y., Taylor S. I., Tan S. L., Sonenberg N. (2003). When translation meets metabolism: multiple links to diabetes. *Endocr Rev* 24, 91-101.
- Sikorski R. S., 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.
- Simonis-Bik A. M., Nijpels G., van Haften T. W., Houwing-Duistermaat J. J., Boomsma D. I., Reiling E., van Hove E. C., Diamant M., Kramer M. H., Heine R. J., Maassen J. A., Slagboom P. E., Willemse G., Dekker J. M., Eekhoff E. M., et al. (2010). Gene variants in the novel type 2 diabetes loci CDC123/CAMK1D, THADA, ADAMTS9, BCL11A, and MTNR1B affect different aspects of pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 59, 293-301.
- Singh C. R., Lee B., Udagawa T., Mohammad-Qureshi S. S., Yamamoto Y., Pavitt G. D., Asano K. (2006). An eIF5/eIF2 complex antagonizes guanine nucleotide exchange by eIF2B during translation initiation. *Embo J* 25, 4537-46.
- Singh C. R., Udagawa T., Lee B., Wassink S., He H., Yamamoto Y., Anderson J. T., Pavitt G. D., Asano K. (2007). Change in nutritional status modulates the abundance of critical pre-initiation intermediate complexes during translation initiation in vivo. *J Mol Biol* 370, 315-30.
- Sokabe M., Yao M., Sakai N., Toya S., Tanaka I. (2006). Structure of archaeal translational initiation factor 2 betagamma-GDP reveals significant conformational change of the beta-subunit and switch 1 region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13016-21.
- Sonenberg N., Hinnebusch A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-45.
- Spence J., Gali R. R., Dittmar G., Sherman F., Karin M., Finley D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76.
- Stegmeier F., Amon A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203-32.
- Stolboushkina E., Nikonov S., Nikulin A., Blasi U., Manstein D. J., Fedorov R., Garber M., Nikonov O. (2008). Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the alpha- and beta-subunits. *J Mol Biol* 382, 680-91.
- Suragani R. N., Kamindla R., Ehtesham N. Z., Ramaiah K. V. (2005). Interaction of recombinant human eIF2 subunits with eIF2B and eIF2alpha kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1766-72.

- Suragani R. N., Ghosh S., Ehtesham N. Z., Ramaiah K. V. (2006). Expression and purification of the subunits of human translational initiation factor 2 (eIF2): phosphorylation of eIF2 alpha and beta. *Protein Expr Purif* 47, 225-33.
- Tan S. (2001). A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 21, 224-34.
- Thompson G. M., Pacheco E., Melo E. O., Castilho B. A. (2000). Conserved sequences in the beta subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2gamma. *Biochem J* 347 Pt 3, 703-9.
- Van Der Kelen K., Beyaert R., Inze D., De Veylder L. (2009). Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 143-68.
- von der Haar T., McCarthy J. E. (2002). Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Mol Microbiol* 46, 531-44.
- Wang X., Proud C. G. (2008). A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B. *Mol Cell Biol* 28, 1429-42.
- Wegerer A., Sun T., Altenbuchner J. (2008). Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol* 8, 2.
- Weinzierl S. (2011). Genetische Studien zur Kopplung von Proteinsynthese und Zellteilung in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie; Lehrstuhl für Genetik.
- Wiese A., Wilms B., Syldatk C., Mattes R., Altenbuchner J. (2001). Cloning, nucleotide sequence and expression of a hydantoinase and carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in *Escherichia coli* and comparison with the corresponding genes from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 750-7.
- Winey M., Huneycutt B. J. (2002). Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene* 21, 6161-9.
- Yatime L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. (2004). Functional molecular mapping of archaeal translation initiation factor 2. *J Biol Chem* 279, 15984-93.
- Yatime L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. (2005). Structure-function relationships of the intact aIF2alpha subunit from the archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Biochemistry* 44, 8749-56.
- Yatime L., Mechulam Y., Blanquet S., Schmitt E. (2006). Structural switch of the gamma subunit in an archaeal aIF2 alpha gamma heterodimer. *Structure* 14, 119-28.
- Yatime L., Mechulam Y., Blanquet S., Schmitt E. (2007). Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18445-50.
- Yu H., Braun P., Yildirim M. A., Lemmens I., Venkatesan K., Sahalie J., Hirozane-Kishikawa T., Gebreab F., Li N., Simonis N., Hao T., Rual J. F., Dricot A., Vazquez A., Murray R. R., et al. (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322, 104-10.
- Zaman S., Lippman S. I., Zhao X., Broach J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27-81.
- Zeggini E., Scott L. J., Saxena R., Voight B. F., Marchini J. L., Hu T., de Bakker P. I., Abecasis G. R., Almgren P., Andersen G., Ardlie K., Bostrom K. B., Bergman R. N., Bonnycastle L. L., Borch-Johnsen K., et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 40, 638-45.
- Zhu H., Klemic J. F., Chang S., Bertone P., Casamayor A., Klemic K. G., Smith D., Gerstein M., Reed M. A., Snyder M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 26, 283-9.

## 9. ANHANG

### 9.1 Translationsinitiationsfaktoren

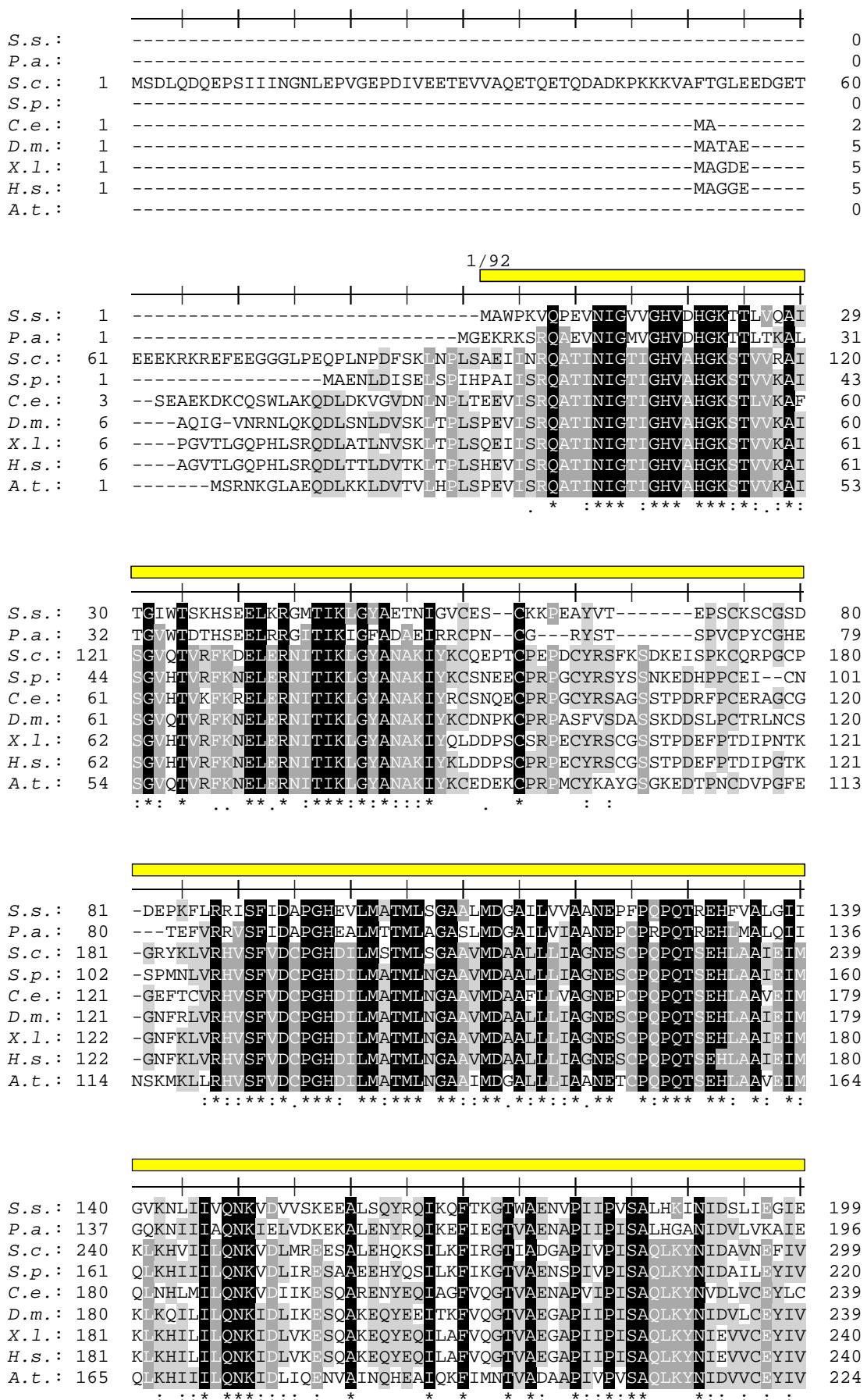
#### 9.1.1 Translationsinitiationsfaktoren in *S. cerevisiae*

Faktor	UE	Gen	essentiell	Funktion
Ded1		<i>DED1</i>	ja	RNA-Helikase der DEAD-Box-Familie; möglicherweise an der Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen beim Scanning beteiligt
elf1		<i>SUI1</i>	ja	fördert offene Konformation des 43S-PIC und damit das Scanning; verhindert Freisetzung von P <sub>i</sub> vor der Startcodon-Erkennung
elf1A		<i>TIF11</i>	ja	beeinflusst offene und geschlossene Konformation des 43S-PIC
elf2	α	<i>SUI2</i>	ja	G-Protein; rekrutiert in GTP-gebundener Form die Initiator-tRNA; Phosphorylierung der α-Untereinheit dient zur Regulation der Translationsinitiation
	β	<i>SUI3</i>	ja	
	γ	<i>GCD11</i>	ja	
elf2A		YGR054W	nein	fördert die Bindung von Initiator-tRNA an das 40S Ribosom, genaue Rolle für die Translationsinitiation unklar
elf2B	α	<i>GCN3</i>	nein	GEF für elf2; wird durch phosphoryliertes elf2 inhibiert; regulatorischer Subkomplex (α, β, δ) und katalytischer Subkomplex (γ, ε)
	β	<i>GCD7</i>	ja	
	γ	<i>GCD1</i>	ja	
	δ	<i>GCD2</i>	ja	
	ε	<i>GCD6</i>	ja	
elf3	a	<i>RPG1</i>	ja	Adapterprotein; bildet mit elf1, elf5, elf2-GTP und der Initiator-tRNA den Multi-Faktor-Komplex (MFC); bindet an das 40S Ribosom
	b	<i>PRT1</i>	ja	
	c	<i>NIP1</i>	ja	
	g	<i>TIF35</i>	ja	
	i	<i>TIF34</i>	ja	
	j	<i>HCR1</i>	nein	
elf4A		<i>TIF1</i>	nein	RNA-Helikase der DEAD-Box-Familie; an der Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen (zur Bindung des 43S-PIC an die mRNA und zum Scanning) beteiligt
		<i>TIF2</i>	nein	
elf4B		<i>TIF3</i>	nein	stimuliert elf4A
elf4E		<i>CDC33</i>	ja	bindet an die Cap-Struktur am 5'Ende der mRNA
elf4F				Komplex aus elf4A, elf4E und elf4G
elf4G		<i>TIF4631</i>	nein	bindet an elf4A, elf4E und PABP
		<i>TIF4632</i>	nein	
elf5		<i>TIF5</i>	ja	GAP und GDI für elf2
elf5A		<i>ANB1</i>	nein	vermutlich nicht an der Initiation, sondern an der Elongation der Translation beteiligt
		<i>HYP2</i>	ja	
elf5B		<i>FUN12</i>	nein	G-Protein; stimuliert die Anlagerung des 60S Ribosoms
elf6		<i>TIF6</i>	ja	vermutlich nicht an der Translationsinitiation, sondern an der Biogenese und/oder Stabilität von 60S Ribosomen beteiligt
PABP		<i>PAB1</i>	ja	bindet an PolyA-Schwanz am 3'Ende der mRNA und an elf4G

**Tabelle 9.1: Liste der Translationsinitiationsfaktoren in *S. cerevisiae***

UE = Untereinheit; wenn mehrere Gene, aber keine Untereinheiten angegeben sind, so handelt es sich um Paraloge mit zumindest partiell redundanten Funktion.

### 9.1.2 Sequenzvergleich und Domänen von Gcd11



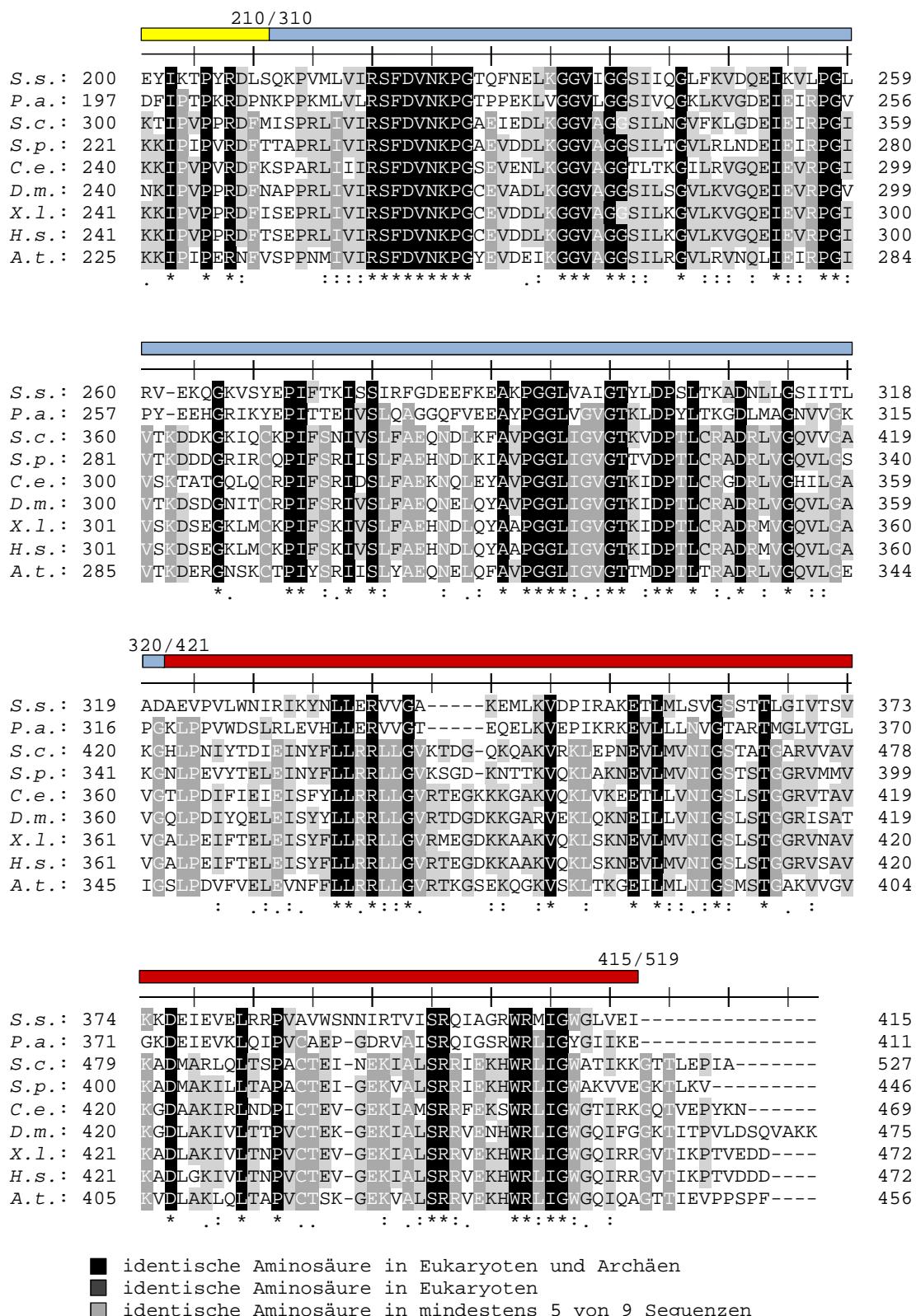


Abbildung 9.1: Sequenzvergleich von eIF2y-Homologen aus verschiedenen Spezies

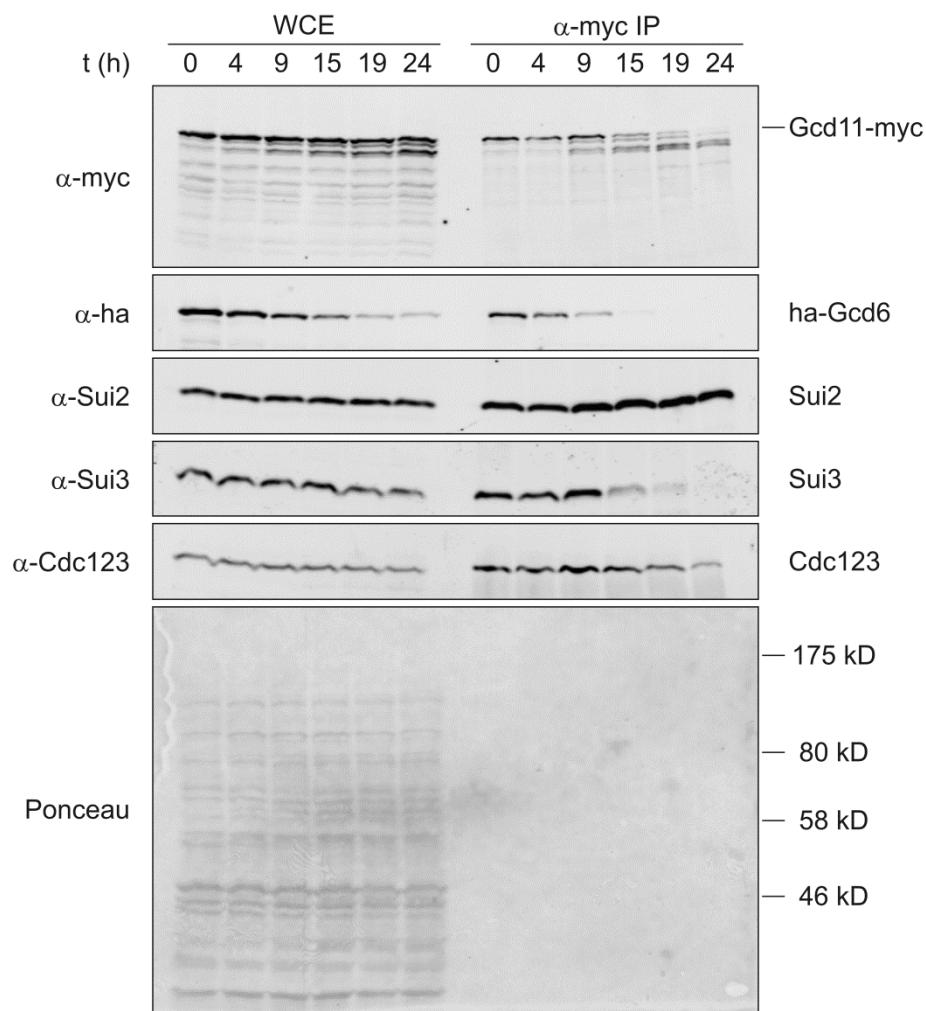
Das Alignment von eIF2y-Homologen aus den Archäen *Sulfolobus solfataricus* (S.s.) und *Pyrococcus abyssi* (P.a.) und den Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.), *Schizosaccharomyces pombe* (S.p.), *Caenorhabditis elegans* (C.e.), *Drosophila melanogaster* (D.m.), *Xenopus laevis* (X.l.), *Homo sapiens* (H.s.) und *Arabidopsis thaliana* (A.t.) wurde mit Clustal-Omega erstellt. (Fortsetzung der Beschreibung siehe nächste Seite)

**Fortsetzung der Beschreibung zu Abbildung 9.1 (vgl. vorige Seite):**

Der Balken über den Sequenzen markiert jede fünfte Aminosäure des Alignments. Die farbigen Balken markieren die Domänen von eIF2 $\gamma$  aus *Sulfolobus solfataricus* (gelb: Domäne I, blau: Domäne II, rot: Domäne III; Yatime et al., 2006). Darüber sind die Domänengrenzen in *Sulfolobus solfataricus*, sowie die entsprechenden Positionen in *Saccharomyces cerevisiae* angegeben. Die Konservierung der Sequenz ist zum einen durch die Clustal-Bewertung unterhalb der Sequenzen, zum anderen durch die Hervorhebung identischer Aminosäuren in den Sequenzen in verschiedenen Graustufen dargestellt.

## 9.2 Ergänzungen zu den Ergebnissen

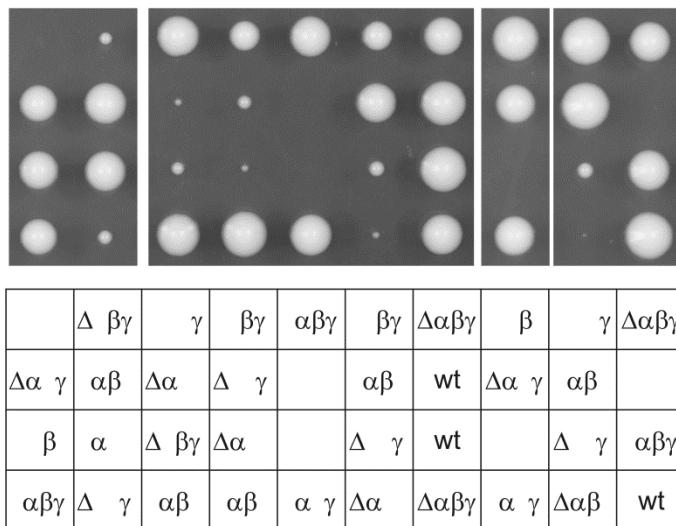
### 9.2.1 Zeitreihen zur Depletion von eIF2B und Immunpräzipitation von Gcd11-myc



**Abbildung 9.2: Bei Depletion von ha-Gcd6 tritt verstärkte Degradation von Gcd11-myc auf.**

Der Stamm W9486 (*natNT2-pGALL-ha3-GCD6 GCD11-myc13-HIS3MX6*) wurde in XYRG bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase in XYD umgesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben für die Immunpräzipitation genommen. Während der Zeitreihe wurde die Kultur fortwährend verdünnt, um eine Zelldichte von  $OD_{600} < 1$  zu gewährleisten. Aus Proteinlysaten wurde Gcd11-myc mittels 9E10-Antikörper immunpräzipitiert. Lysate (WCE) und Präzipitate ( $\alpha$ -myc IP) wurden im Western Blot analysiert, wobei die Antikörper 9E10 und 12CA5, Antiseren für Sui2 und Sui3 und affinitätsgereinigtes Antiserum für Cdc123 verwendet wurden.

## 9.2.2 Suppression der *CDC123*-Deletion durch Überexpression von eIF2-Untereinheiten

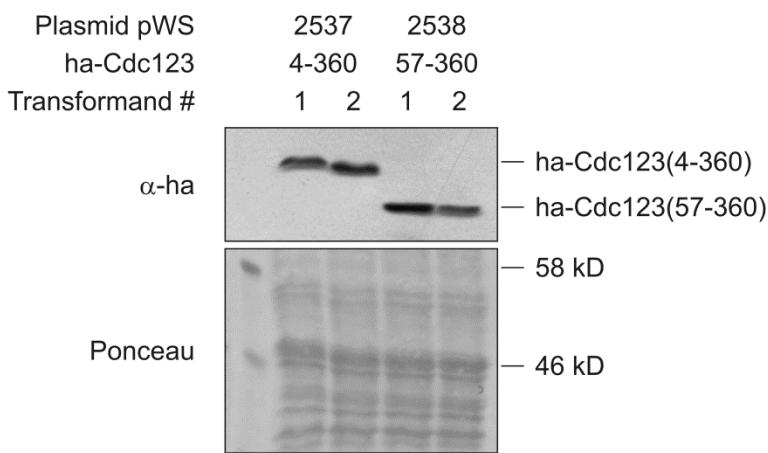


**Abbildung 9.3: Suppression von *cdc123Δ* durch Überexpression von eIF2-Untereinheiten**

Der heterozygot diploide Stamm W10493 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 trp1/trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 his3/his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3 leu2/leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) wurde sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Die Tetradenplatten (XYD) wurden für 4 Tage bei 25°C inkubiert.

Abkürzung der Genotypen: wt = Wildtyp,  $\Delta$  = *cdc123Δ::kanMX4*,  $\alpha$  = *trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*,  $\beta$  = *his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3*,  $\gamma$  = *leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*

## 9.2.3 N-terminale Verkürzungen von Cdc123: Proteinmengen



**Abbildung 9.4: Vergleich der Proteinmengen von N-terminalen Verkürzungen von Cdc123**

Die Plasmide pWS2537 und pWS2538 enthalten *pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1*-Kassetten zur Expression der N-terminalen Verkürzungen 4-360 und 57-360 (Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuren). Zur Integration in den *LEU2*-Marker wurden die Plasmide mit *Bst*XI linearisiert. Nach der Transformation von W4443 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4*) wurden je zwei Transformanden in XYD bei 25°C angezogen und die Proteinlysate im Western Blot mit 12CA5-Antikörper analysiert.

## 9.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zur Identifizierung von Cdc123-Interaktionspartnern

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Cdc123 wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) verwendet (vgl. 7.6). Für den Screen wurde eine Genbank von genomischer S288c-DNA in dem Y2H-Vektor pJG4-5 herangezogen (Ausubel et al., 2005). Der Vektor pJG4-5 ( $2\mu$ , *TRP1*) erlaubt die Galaktose-induzierbare Expression von Fusionen aus einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) und dem Genbank-Fragment. Der verwendete Stamm W276 enthält zwei Reportergene unter Kontrolle des *lexA*-Operators (*ura3-52::lexAop-lacZ-URA3 leu2::lexAop-LEU2*). Für die Isolierung von potentiellen Cdc123-Interaktionspartnern wurde zunächst die Aktivierung des *LEU2*-Reporters eingesetzt, indem die Transformanden auf Wachstum auf Platten ohne Leucin (SRG-HTL) selektiert wurden. In Vorversuchen hatte sich allerdings gezeigt, dass die Expression von LexA-Cdc123 durch den etablierten Y2H-Vektor pEG202 ( $2\mu$ , *HIS3*) auch ohne Interaktionspartner zur Aktivierung des *LEU2*-Reporters führt. Deshalb wurde der neue Expressionsvektor pWS2615 kloniert: Zum einen handelt es sich im Gegensatz zu pEG202 um ein centromeres Plasmid, zum anderen wurde statt des *ADH1*-Promotors der schwächere *MET25*-Promotor verwendet. Diese Veränderungen sollten zu einer geringeren Expression von LexA-Cdc123 durch dieses Plasmid führen. In der Tat vermittelte pWS2541 (pWS2615-*CDC123*) alleine kein Wachstum auf Platten ohne Leucin und eignete sich daher für die Identifizierung von Cdc123-Interaktionspartnern.

Der Stamm W276 wurde mit pWS2541 und der pJG4-5-Genbank transformiert und die Transformanden zunächst auf SD-HTL auf Aufnahme der beiden Plasmide selektiert. Die Transformanden wurden auf SRG-HTL replattiert, um mit Hilfe der Aktivierung des *LEU2*-Reporters potentielle Cdc123-Interaktionspartner zu isolieren. Die angewachsenen Kandidaten wurden zusätzlich auf die Aktivierung des zweiten Reportergens (*lacZ*) getestet (vgl. 7.6), welches jedoch weniger sensitiv ist als der *LEU2*-Reporter. Beim X-Gal-Assay der Kandidaten zeigten sich große Unterschiede in der Blau-Färbung.

Zunächst wurden die Kandidaten mit starker Blau-Färbung (und demnach starker Interaktion der AD-Fusionen mit LexA-Cdc123) untersucht. Dazu wurden die Genbank-Plasmide isoliert und durch Verdau mit EcoRI die Größe des Genbank-Fragments im pJG4-5-Vektor bestimmt. Bei allen Plasmiden zeigte sich dabei ein Fragment von ca. 800 bp. Die Sequenzierung von drei Plasmiden ergab, dass sie alle ein Fragment von *GCD11* enthalten. Gcd11 war bereits als Cdc123-Interaktionspartner bekannt, allerdings codierten die isolierten Plasmide nur den C-terminalen Abschnitt ab Aminosäure 410 (Anmerkung: Durch die Fusion von Linker- und *GCD11*-Sequenzen bei der Herstellung der Genbank entstand ein CCT-Codon, so dass der Aminosäure 410 ein Prolin vorangeht.) Zur Untersuchung dieses *GCD11*-Fragments vgl. Abschnitt 4.5.1.

Anschließend wurden die Kandidaten untersucht, welche im X-Gal-Assay nur eine schwache Blau-Färbung aufwiesen. Bei der Isolierung der Plasmide zeigten sich im EcoRI-Verdau verschiedene Fragmentgrößen und Bandenmuster. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden 23 der isolierten Plasmide in den Y2H-Reporterstamm retransformiert und die Interaktion mittels X-Gal-Assay und Wachstum auf SRG-HTL überprüft. Als Kontrolle diente pWS1513 (pJG4-5-GCD11) und es wurden sechs Transformanden je Plasmid getestet. Während die Kontrolle mit pWS1513 positiv ausfiel, führte von den 23 Plasmiden nur eines zu einer leichten Blau-Färbung im X-Gal-Assay. Dieses und fünf weitere Plasmide erlaubten ein sehr schwaches Wachstum auf Platten ohne Leucin. Die Sequenzierung der sechs Kandidaten zeigte, dass es sich um drei verschiedene Plasmide handelte.

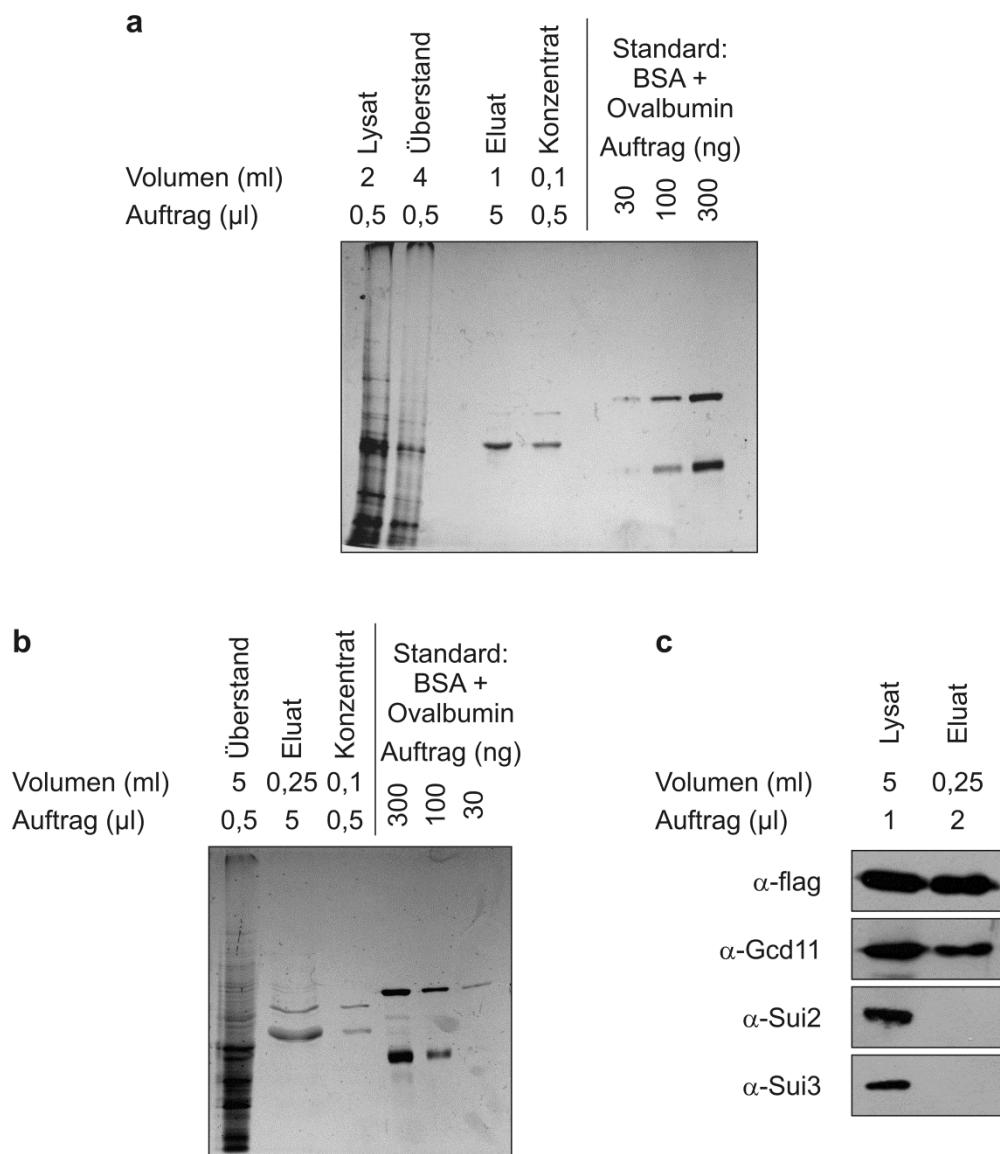
- Das Plasmid, welches im X-Gal-Assay zu einer schwachen Blau-Färbung führte, enthielt ein internes Fragment von *SEC16* (bp 3455 – 3750). Da dieses nicht mit einem Stop-Codon endet, besteht das exprimierte Fusionsprotein aus der AD, 86 Aminosäuren von Sec16 (1153 – 1237) und weiteren 58 Aminosäuren. Um einen Einfluss der 58 zusätzlichen Aminosäuren auszuschließen, wurde das entsprechende *SEC16*-Fragment mit Stopcodon in pJG4-5 kloniert und getestet. In diesem Fall war weder im X-Gal-Assay noch auf SRG-HTL eine Interaktion mit Cdc123 nachweisbar (Sabine Weinzierl, Schwerpunktpraktikum 2009).
- Ein weiteres Plasmid enthielt ein Fragment von *CHD1* ab bp 2431, welches jedoch nicht im gleichen Leserahmen wie das Gen der Transkriptionsaktivierungsdomäne liegt. Somit folgt auf die AD ein artifizielles Protein, welches jedoch bereits nach 8 Aminosäuren endet.
- Die anderen 4 Plasmide enthielten dasselbe DNA-Fragment, welches jedoch nicht aus einer codierenden Region, sondern aus dem Promotorbereich der Gene *HXT15* und *HXT16* stammt. In diesem Fall folgen auf die AD nur 16 Aminosäuren.

Alle Plasmide, welche ein schwaches Wachstum auf Platten ohne Leucin ermöglichten, verursachten also die Expression von artifiziellen Peptiden.

Somit konnten im Hefe-Zwei-Hybrid-System keine neuen Interaktionspartner von Cdc123 identifiziert werden. Dies schließt weitere Interaktionen von Cdc123 jedoch nicht aus: Die Tatsache, dass die bekannten Bindungspartner Chf1 und Chf2 (Bieganowski et al., 2004) in diesem Screen nicht isoliert wurden, zeigt die Einschränkungen der Analyse: Möglicherweise war die Zahl der untersuchten Transformanden zu gering für eine vollständige Abdeckung des Genoms. Insbesondere bei großen Proteinen könnte auch die Größe der Genbank-Fragmente von 0,8 – 4,0 kb (Ausubel et al., 2005) limitierend sein. Schließlich sind auch die Begrenzungen des Y2H-Systems, wie die Verwendung von Fusionsproteinen und die Notwendigkeit der Lokalisation im Zellkern, zu bedenken.

### 9.2.5 Reinigung von flag-Cdc123 und Cdc123-flag für die Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse von Phosphorylierungen wurde Cdc123 mit N- oder C-terminalem flag3-Epitop in Hefe überexprimiert und über eine anti-flag-Matrix affinitätsgereinigt. Zur Expression wurden die Stämme W6890 (*leu2::pGAL1-flag3-CDC123-tCYC1-LEU2*) bzw. W7474 (*leu2::pGAL1-CDC123-flag3-tCYC1-LEU2*) verwendet. Zellkultur, -aufschluss und Affinitätsreinigung des flag-markierten Cdc123 sind in Abschnitt 7.5.5 beschrieben.



**Abbildung 9.5: Aufreinigung von flag-Cdc123 und Cdc123-flag für die Massenspektrometrie**

Nach der Affinitätsreinigung von flag-Cdc123 (aus W6890) bzw. Cdc123-flag (aus W7474) wurden das Lysat, der Überstand nach Inkubation mit der Affinitätsmatrix, das Eluat und die Lösung nach Konzentration über eine Biomax-Säule (Konzentrat) mittels SDS-PAGE analysiert. Es sind jeweils das Gesamtvolumen der Fraktionen und das aufgetragene Volumen angegeben.

**a-b,** Die Reinigung von flag-Cdc123 (**a**) bzw. Cdc123-flag (**b**) wurde durch Silberfärbung des SDS-Gels verfolgt. Für die Mengenabschätzung wurden die angegebenen Mengen an BSA und Ovalbumin eingesetzt.

**c,** Das Lysat und das Eluat der Reinigung von Cdc123-flag wurden im Western Blot mit α-flag-Antikörper und Antisera gegen Gcd11, Sui2 und Sui3 analysiert.

Reinheit und Menge des isolierten Proteins wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert (Abb. 9.5), wobei eine Lösung aus BSA und Ovalbumin mit definierter Konzentration zur Abschätzung der Proteinmenge verwendet wurde. Für flag-Cdc123 wurde die Bande im Gel als mindestens 50 ng eingestuft, was mindestens 10 mg im gesamten Konzentrat (100 µl) entspricht. Für Cdc123-flag wurden knapp 30 ng im Gel und damit etwa 5 mg im Konzentrat (100 µl) geschätzt. In den Eluaten war neben der deutlichen Bande von flag-Cdc123 bzw. Cdc123-flag bei etwa 45 kD noch eine schwächere Bande bei knapp 60 kD sichtbar. Diese konnte im Western Blot als Gcd11 identifiziert werden (Abb. 9.5c). Die anderen beiden eIF2-Untereinheiten (Sui2 und Sui3) waren in den Eluaten jedoch nicht nachweisbar.

## 9.2.6 Überexpression von Kinasen

### 9.2.6.1 Ergebnisse des Screens

Zur Identifizierung von Cdc123-Kinasen wurde ein Set von Stämmen zur Kinaseüberexpression verwendet (Zhu et al., 2000). Diese Stämme enthalten ein 2µ-Plasmid, welches die Galaktose-induzierbare Expression einer GST-Kinase-Fusion erlaubt. Nach Kreuzung der Stämme mit W6098 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) wurde die Expression von ha-Cdc123 und der GST-Kinase mit Galaktose induziert. Anschließend wurden die Expression der GST-Kinase und die Mobilität von ha-Cdc123 im Western Blot analysiert. In Zusammenarbeit mit Adelheid Weissgerber konnten insgesamt 66 Stämme untersucht werden, welche in Tabelle 9.2 anhand der Klassifizierung der Kinasen durch Rubenstein und Schmidt (2007) geordnet sind.

Gen	ORF	Gruppe	Familie	Sub-familie	MW (kD) GST-Kinase		GST-Kinase vorhanden	Doppelbande ha-Cdc123
					erwartet	beobachtet		
<i>CBK1</i>	YNL161W	AGC	NDR		114	27	-	-
<i>DBF20</i>	YPR111W	AGC	NDR		83	83	+	-
<i>PKH1</i>	YDR490C	AGC	PDK1		113	27	-	-
<i>PKH2</i>	YOL100W	AGC	PDK1		149	27	-	-
<i>PKH3</i>	YDR466W	AGC	PDK1		128	-	-	-
<i>TPK2</i>	YPL203W	AGC	PKA		71	71	+	-
	YBR028C	AGC	RSK	p70	87	60	-	-
<i>KIN82</i>	YCR091W	AGC	RSK		109	70	-	-
	YNR047W	AGC	RSK		128	128	+	-
<i>CMK1</i>	YFR014C	CaMK	CaMK1		77	77	+	-
<i>SNF1</i>	YDR477W	CaMK	CaMKL	AMPK	99	-	-	-
<i>CHK1</i>	YBR274W	CaMK	CaMKL	CHK1	87	70-80	?	-
<i>GIN4</i>	YDR507C	CaMK	CaMKL	NMR	157	70	-	-
<i>KIN4</i>	YOR233W	CaMK	CaMKL	Kin4	117	117	+	-
	YPL150W	CaMK	CaMKL	MARK	128	40	-	-
<i>PSK1</i>	YAL017W	CaMK	CaMKL	PASK	179	80-100	-	-
<i>PSK2</i>	YOL045W	CaMK	CaMKL	PASK	151	151	+	-
	YKL171W	CaMK	Unique		131	60-70	-	-
<i>PRR1</i>	YKL116C	CaMK	Unique		86	86	+	-
<i>DUN1</i>	YDL101C	CaMK	RAD53		86	70-80	?	-

Gen	ORF	Gruppe	Familie	Sub-familie	MW (kD) GST-Kinase		GST-Kinase vorhanden	Doppelbande ha-Cdc123
					erwartet	beobachtet		
RAD53	YPL153C	CaMK	RAD53		119	119	+	-
YCK3	YER123W	CK1	CK1	CK1-G	87	27	-	-
YCK1	YHR135C	CK1	CK1	CK1-G	89	89	+	+
CDC28	YBR160W	CMGC	CDK	CDC2	61	61	+	-
PHO85	YPL031C	CMGC	CDK	CDK5	62	62	+	-
KIN28	YDL108W	CMGC	CDK	CDK7	62	27	-	-
SRB10	YPL042C	CMGC	CDK	CDK8	90	90	+	-
CTK1	YKL139W	CMGC	CDK	CRK7	88	27	-	-
CAK1	YFL029C	CMGC	CDK		69	27	-	-
BUR1	YPR161C	CMGC	CDK		101	70-80	-	-
CKA1	YIL035C	CMGC	CK2		72	72	+	-
CKA2	YOR061W	CMGC	CK2		66	27	-	-
MCK1	YNL307C	CMGC	GSK		70	70	+	-
MRK1	YDL079C	CMGC	GSK		85	85	+	-
RIM11	YMR139W	CMGC	GSK		61	47	-	-
FUS3	YBL016W	CMGC	MAPK	ERK	68	68	+	-
HOG1	YLR113W	CMGC	MAPK	ERK	75	75	+	-
	YKL161C	CMGC	MAPK	ERK	77	77	+	-
SKY1	YMR216C	CMGC	SRPK		110	70	-	-
IPL1	YPL209C	Other	AUR		70	70	+	-
ELM1	YKL048C	Other	CaMKK	ELM	99	99	+	-
SAK1	YER129W	Other	CaMKK	ELM	154	27	-	-
CDC7	YDL017W	Other	CDC7		85	85	+	-
PTK1	YKL198C	Other	HAL		99	80-99	+	-
HRK1	YOR267C	Other	HAL		113	32	-	-
HAL5	YJL165C	Other	HAL		123	60-80	-	-
KKQ8	YKL168C	Other	HAL		110	110	+	-
PRR2	YDL214C	Other	HAL		106	32	-	-
SAT4	YCR008W	Other	HAL		94	60	-	-
	YDL025C	Other	HAL		97	97	+	-
AKL1	YBR059C	Other	NAK		151	83	-	-
	YPL236C	Other	NAK		68	68	+	-
KIN3	YAR018C	Other	NEK		78	78	+	-
ISR1	YPR106W	Other	Unique		77	27	-	-
VHS1	YDR247W	Other	RAN		79	79	+	-
MPS1	YDL028C	Other	TTK		114	114	+	+
VPS15	YBR097W	Other	VPS15		194	100	-	-
SWE1	YJL187C	Other	WEE		120	32	-	-
CDC15	YAR019C	STE	STE20	MST	137	137	+	+
SKM1	YOL113W	STE	STE20	PAK	102	50	-	-
MKK2	YPL140C	STE	STE7		84	27	-	-
STE7	YDL159W	STE	STE7		85	27	-	-
SLN1	YIL147C	Atypical	HisK		161	27	-	-
	YGL059W	Atypical	PDHK		84	84	+	-
MEC1	YBR136W	Atypical	PIKK	ATR	300	80-90	-	-
TOR2	YKL203C	Atypical	PIKK	FRAP	309	175	-	-

Tabelle 9.2: Analyse der Überexpression von Kinasen und ihres Einflusses auf ha-Cdc123

(Beschreibung siehe nächste Seite)

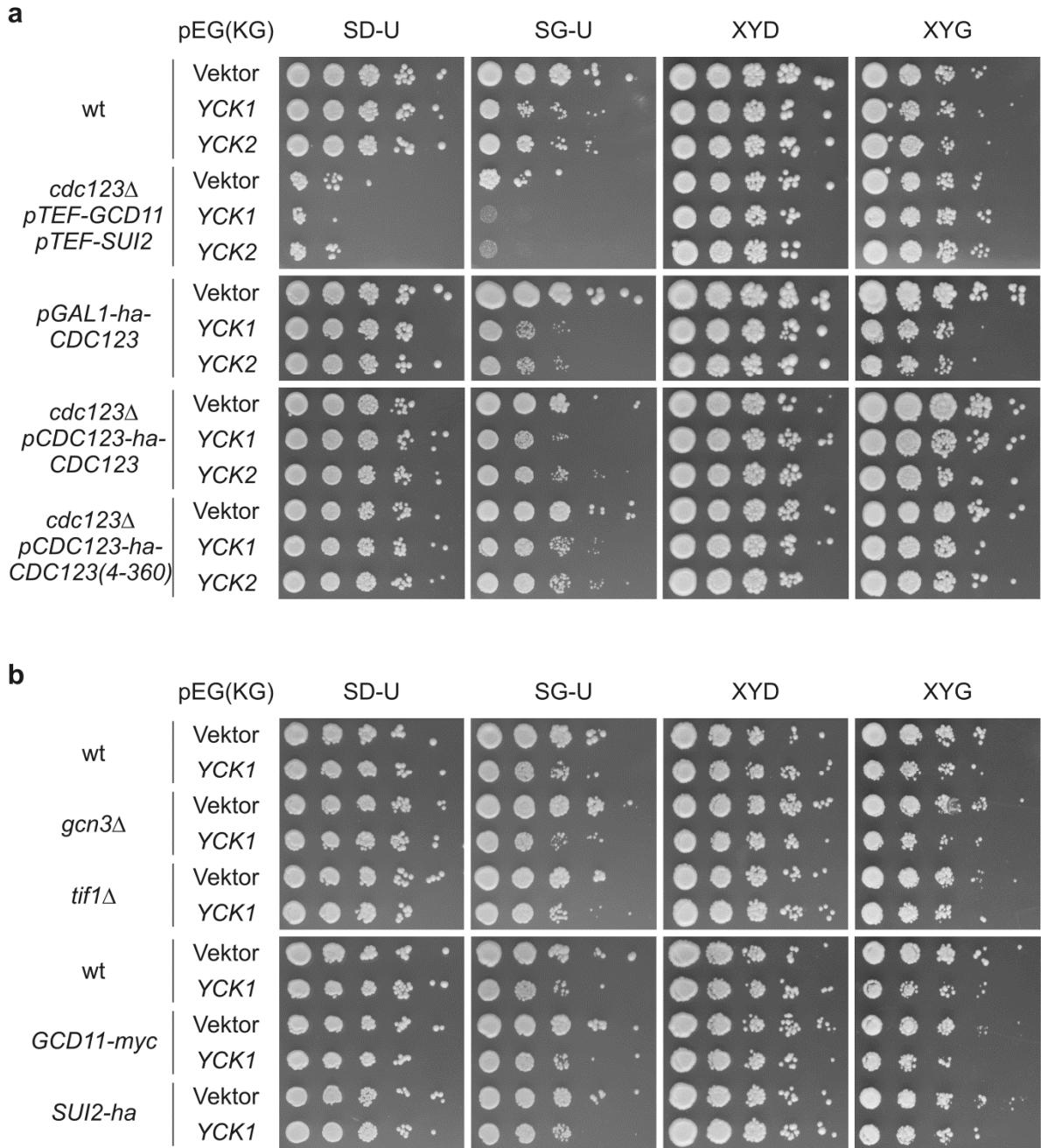
**Tabelle 9.2: Analyse der Überexpression von Kinasen und ihres Einflusses auf ha-Cdc123 (s. vorige Seite)**

Zu den untersuchten Kinasen sind die Gennamen und ORFs in *Saccharomyces cerevisiae*, sowie ihre Klassifizierung (Rubenstein und Schmidt, 2007) angegeben. Für Erläuterungen zu den Gruppen und ihren Abkürzungen siehe (Hanks und Hunter, 1995; Hunter und Plowman, 1997; Rubenstein und Schmidt, 2007). Für die GST-Kinasen wurde aufgeführt, welches Molekulargewicht jeweils erwartet und im Western Blot mit  $\alpha$ -GST-Antikörper beobachtet wurde. Stimmen die Werte überein, wurde die GST-Kinase als „vorhanden“ gewertet. Die letzte Spalte gibt an, ob die Kinase-Überexpression einen Einfluss auf die Mobilität von ha-Cdc123 hatte (Nachweis im Western Blot mit 12CA5-Antikörper).

#### 9.2.6.2 Einfluss der Kinase-Überexpression auf das Wachstum

Die Überexpression der Kinasen Yck1, Yck2, Cdc15 und Mps1, welche zur Hyperphosphorylierung von ha-Cdc123 führt, verursacht Wachstumsprobleme. Ob diese jedoch auf die Hyperphosphorylierung (und mögliche Inaktivierung) von Cdc123 zurückzuführen sind, ließ sich nicht eindeutig klären: Die Untersuchung wurde dadurch erschwert, dass die Deletion von *CDC123* letal ist. Suppressorstämmen, welche auf Grund der Überexpression von *GCD11* und *SUI2* trotz Deletion von *CDC123* lebensfähig sind, zeigten kaum Wachstum auf SD-U und SG-U, was auf eine schlechte Vererbung der verwendeten 2 $\mu$ -Plasmide (zur Kinaseexpression) schließen lässt (Abb. 9.6a).

Die meisten Studien wurden mit den Casein-Kinasen Yck1 und Yck2 durchgeführt, da diese zuerst als potentielle Cdc123-Kinasen identifiziert wurden. Die Überexpression der Casein-Kinasen in Wildtyp-Stämmen führt auf SG-U zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums (Abb. 9.6a). Auf XYG ist der Effekt weniger stark, möglicherweise auf Grund von Plasmidverlust. Die Wachstumsprobleme traten sowohl bei Wildtyp-Cdc123, als auch bei ha-Cdc123 und der N-terminalen Verkürzung ha-Cdc123(4-360) auf. Die Überexpression von ha-Cdc123 verstärkt die Wachstumsprobleme geringfügig. Auf Grund der schlechten Vererbung von pEG(KG)-Plasmiden in *cdc123Δ*-Stämmen (s.o.) konnte die Rolle von Cdc123 für die Beeinträchtigung des Wachstums nicht eindeutig geklärt werden. In einem weiteren Versuch wurden synthetische genetische Interaktionen eingesetzt: *cdc123*-Allele wie z.B. *cdc123-1* oder *cdc123Δ327*, führen in Kombination mit verschiedenen Veränderungen von Translationsinitiationsfaktoren zu Wachstumsproblemen. Dies wurde unter anderem mit der Deletion von *GCN3* oder *TIF1* oder den Epitopmarkierungen Gcd11-myc und Sui2-ha beobachtet (Richter, 2006). Wenn die Hyperphosphorylierung von Cdc123 nach Kinase-Überexpression die Funktionalität von Cdc123 reduziert, sollten bei Kombination von *YCK1*-Überexpression und den erwähnten Veränderungen von Translationsinitiationsfaktoren synthetische Wachstumseffekte auftreten. Wie in Abbildung 9.6b dargestellt, verursachte die Überexpression in allen untersuchten Stämmen (einschließlich des Wildtyps) ein langsameres Wachstum, eine Verstärkung durch die Deletion oder Epitopmarkierung von Translationsinitiationsfaktoren war jedoch nicht beobachtbar. Insgesamt ergaben die Studien keinen Hinweis darauf, dass das langsame Wachstum bei Kinase-Überexpression eine Folge der Cdc123-Hyperphosphorylierung ist.



**Abbildung 9.6: Die Rolle von Cdc123 für die Beeinträchtigung des Wachstums bei Kinase-Überexpression**

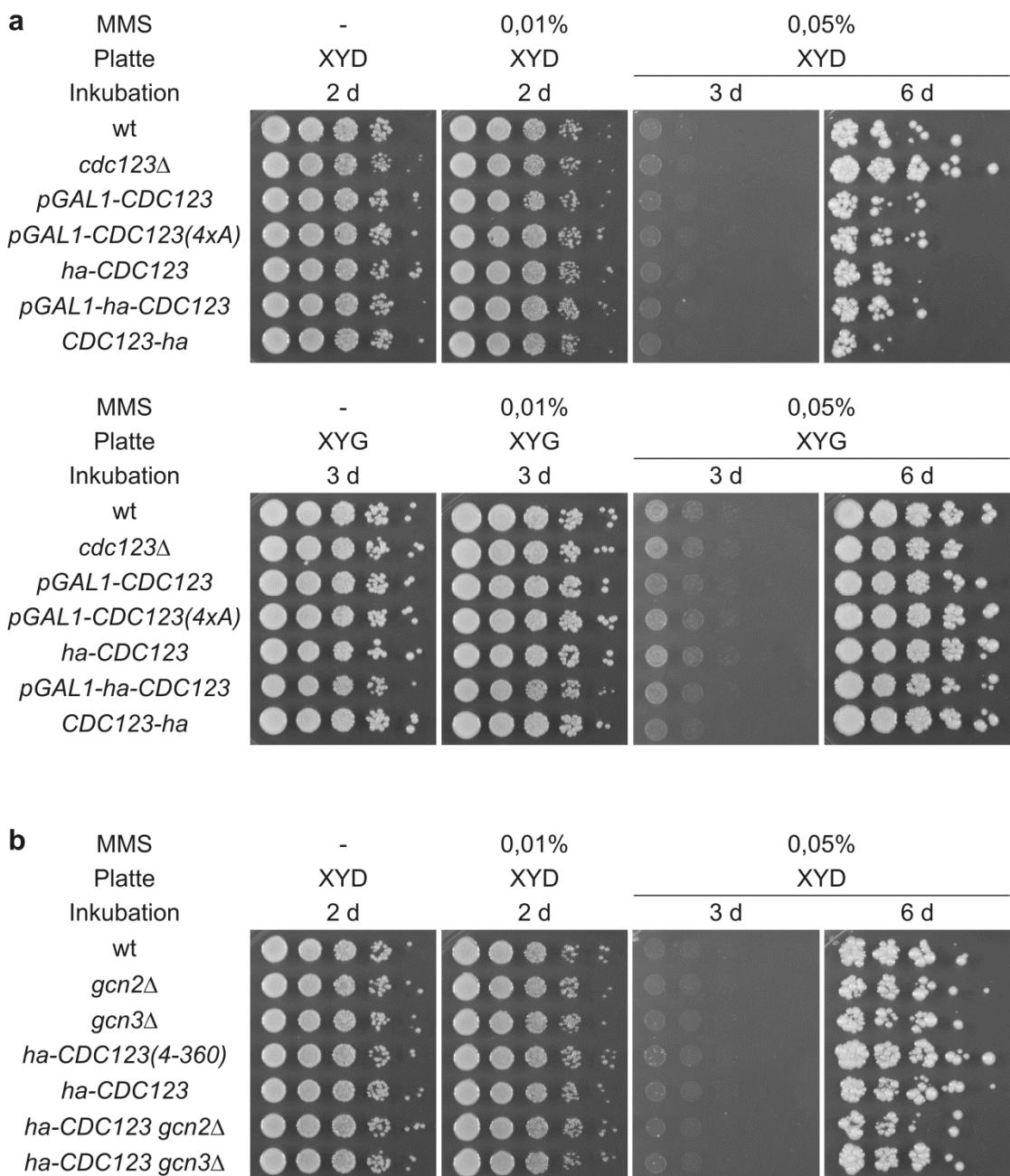
**a**, Die Stämme K700 (Wildtyp), W7239 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP2 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W6098 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W7506 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*) wurden mit den Plasmiden pEG(KG), pWS2401 und pWS2342 transformiert. Die Transformanden wurden in SR-U angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in Verdünnungsreihen auf die angegebenen Platten (SD-U, SG-U, XYD und XYG) gestempelt. Die Platten wurden bei 25°C inkubiert und das Wachstum über 2-4 Tage fotografisch dokumentiert.

**b**, Die Stämme BY4741 (Wildtyp), W3975 (*gcn3Δ::natMX4*), W6933 (*tif1Δ::kanMX4*), W4177 (*GCD11-myc13-kanMX6*) und W5290 (*SUI2-ha3-HIS3MX6*) wurden mit den Plasmiden pEG(KG) und pWS2401 transformiert und das Wachstum der Transformanden wie unter **a** beschrieben getestet.

### 9.2.7 Wachstumstest zur MMS-Sensitivität

Zur Beurteilung der MMS-Sensitivität wurde ein Wachstumstest auf Platten mit 0,01% und 0,05% MMS, sowie Kontrollplatten ohne MMS durchgeführt (Abb. 9.7). Weder die Deletion, noch die Überexpression von *CDC123*, noch der Einsatz verschiedener *Cdc123*-Varianten zeigte einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum auf Platten mit 0,01% oder 0,05% MMS. Auch die Deletion von *GCN2* oder *GCN3*, welche die Derepression der *GCN4*-Expression bei Behandlung mit MMS verhindert (vgl. Abb. 4.25), beeinflusste die MMS-Sensitivität nicht. Insgesamt war zu beobachten, dass die Stämme auf Platten mit 0,01% MMS gut wuchsen. Auf Platten mit 0,05% MMS wuchsen hingegen alle Stämme sehr schlecht und nur nach längerer Inkubation wuchsen einige Einzelkolonien heran. Unter diesen Bedingungen war offenbar ein langsames Wachstum von Vorteil, da eine langsamere Zellzyklusprogression vermutlich mehr Zeit zur Reparatur von DNA-Schäden erlaubt: Zum einen wuchsen alle Stämme auf XYG-Platten mit 0,05% MMS besser als auf den entsprechenden XYD-Platten. Zum anderen bildete der *cdc123Δ*-Stamm (W7328), welcher auf der XYD-Kontrollplatte ohne MMS etwas langsamer wuchs als die anderen Stämme, mehr Kolonien auf XYD + 0,05% MMS als die anderen Stämme.

Die Wachstumstests ergaben, dass die untersuchten Faktoren aus dem Kontext der Translationsinitiation (*Cdc123*, *Gcn2* und *Gcn3*) keinen wesentlichen Einfluss auf die MMS-Sensitivität haben.



**Abbildung 9.7: Einfluss verschiedener *Cdc123*-Varianten und der Deletionen von *GCN2* und *GCN3* auf die MMS-Sensitivität**

**a**, Die Stämme K699 (Wildtyp), W7328 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP2 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W8715 (*trp1::pGAL1-CDC123-tCYC1-TRP1*), W8719 (*trp1::pGAL1-CDC123(4xA)-tCYC1-TRP1*), W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W6098 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) und W5482 (*CDC123-ha3-HIS3MX6*) wurden in XYR bei 25°C angezogen und in Verdünnungsreihen auf XYD- bzw. XYG-Platten gestempelt, welche 0,01%, 0,05% oder kein MMS enthielten. Die Platten wurden bei 25°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten fotografisch dokumentiert.

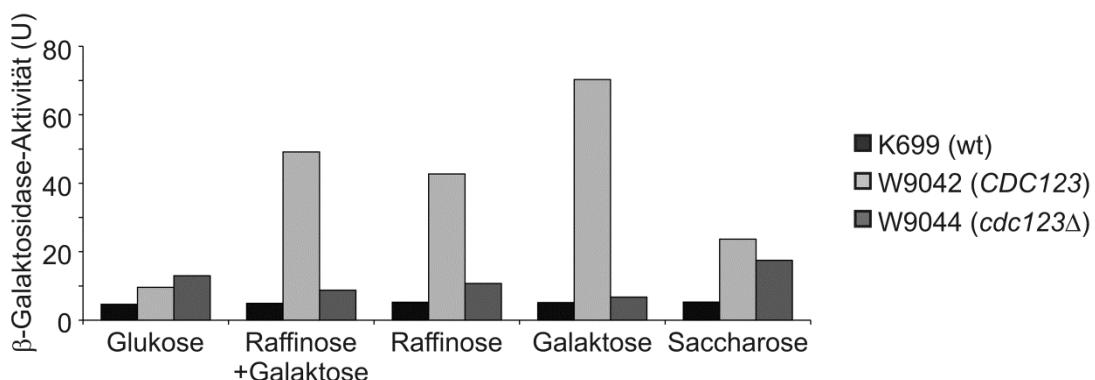
**b**, Für diesen Wachstumstest wurden die Stämme K699 (Wildtyp), W8765 (*gcn2Δ::natNT2*), W8766 (*gcn3Δ::natNT2*), W7506 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*), W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W8788 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 gcn2Δ::natNT2*) und W8792 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2 gcn3Δ::natNT2*) wie in Abschnitt **a** beschrieben behandelt. Da keiner der Stämme ein relevantes Konstrukt mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor aufweist, sind nur die XYD-Platten gezeigt.

## 9.2.8 Cdc123, eIF2 und der Einfluss der Kohlenstoffquelle

Wie in Abschnitt 4.9.2 beschrieben, führt die Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von Cdc123 zu einer stark erhöhten *GCN4*-Expression in XYRG, aber nicht in XYD. In diesem Zusammenhang wurden einige weitere Versuche durchgeführt.

### 9.2.8.1 Analyse weiterer Kohlenstoffquellen

Neben XY-Medium mit Glukose (D) oder Raffinose und Galaktose (RG) wurde in einem Versuch auch Medium mit Raffinose (R), Galaktose (G) oder Saccharose (S) eingesetzt. Sowohl in XYR, als auch in XYG kam es beim Stamm W9042 zu einer ähnlich starken Derepression der *GCN4*-Expression wie in XYRG. Dieser Effekt war wiederum spezifisch für die Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von Cdc123, denn er trat weder bei einem entsprechenden *cdc123Δ*-Stamm noch beim Wildtyp auf. In XYS fiel der Anstieg der *GCN4*-Expression in W9042 geringer aus; dies könnte auf eine geringe Menge an Glukose im Medium zurückzuführen sein, da Hefen das Enzym Invertase sezernieren, welches Saccharose in Glukose und Fruktose spaltet. Die Abwesenheit von Glukose scheint also das entscheidende Kriterium für den Anstieg der *GCN4*-Expression in W9042 zu sein.



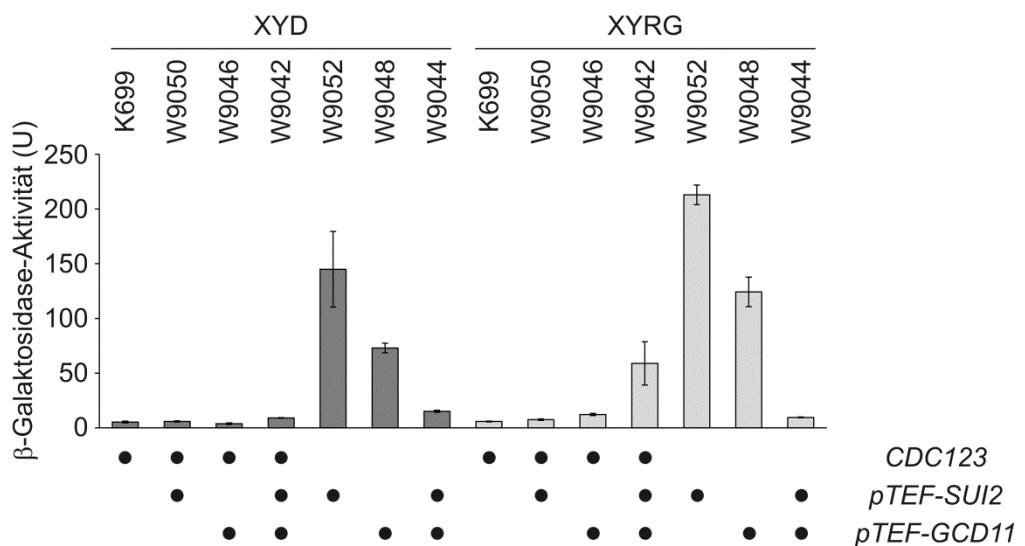
**Abbildung 9.8: Einfluss des Zuckers auf die *GCN4*-Expression**

Die Stämme K699 (Wildtyp), W9042 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) und W9044 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Die Transformanden wurden in XYD angezogen, in H<sub>2</sub>O gewaschen und in XY-Medium mit folgenden Zuckern überimpft: 2% Glukose, 1% Raffinose + 2% Galaktose, 2% Raffinose, 2% Galaktose und 2% Saccharose. Nach Inkubation für ca. 18 h bei 25°C wurde die β-Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

### 9.2.8.2 Getrennte Überexpression von *GCD11* und *SUI2*

Als nächster Schritt wurde überprüft, ob die Überexpression von *SUI2* oder *GCD11* alleine einen Einfluss auf die *GCN4*-Expression hat. In XYD verhalten sich alle Stämme, wie dies anhand ihres Wachstums in der Tetradenanalyse (vgl. 9.2.2) erwartet wurde: Die Überexpression von *SUI2* und / oder *GCD11* hatte bei Anwesenheit von Cdc123 keinen Einfluss auf die *GCN4*-Expression. *cdc123Δ*-Stämme, welche durch Überexpression von *SUI2* oder *GCD11* gerettet wurden, wuchsen sehr

langsam und zeigten eine sehr hohe *GCN4*-Expression. Dagegen wiesen *cdc123Δ*-Stämme, welche durch die gemeinsame Überexpression von *SUI2* und *GCD11* gerettet wurden, nur ein geringfügig langsameres Wachstum und eine moderat erhöhte *GCN4*-Expression im Vergleich zum Wildtyp auf. In XYRG führte die Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von Cdc123, wie gemäß der Versuche von Abschnitt 4.9.2 erwartet, zu einem deutlichen Anstieg der *GCN4*-Expression. Die Überexpression von *SUI2* alleine hatte keinen Einfluss und die Überexpression von *GCD11* alleine bewirkte nur einen geringfügigen Anstieg der *GCN4*-Expression. Der starke Anstieg der *GCN4*-Expression in XYRG tritt also nur bei kombinierter Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von Cdc123 auf.

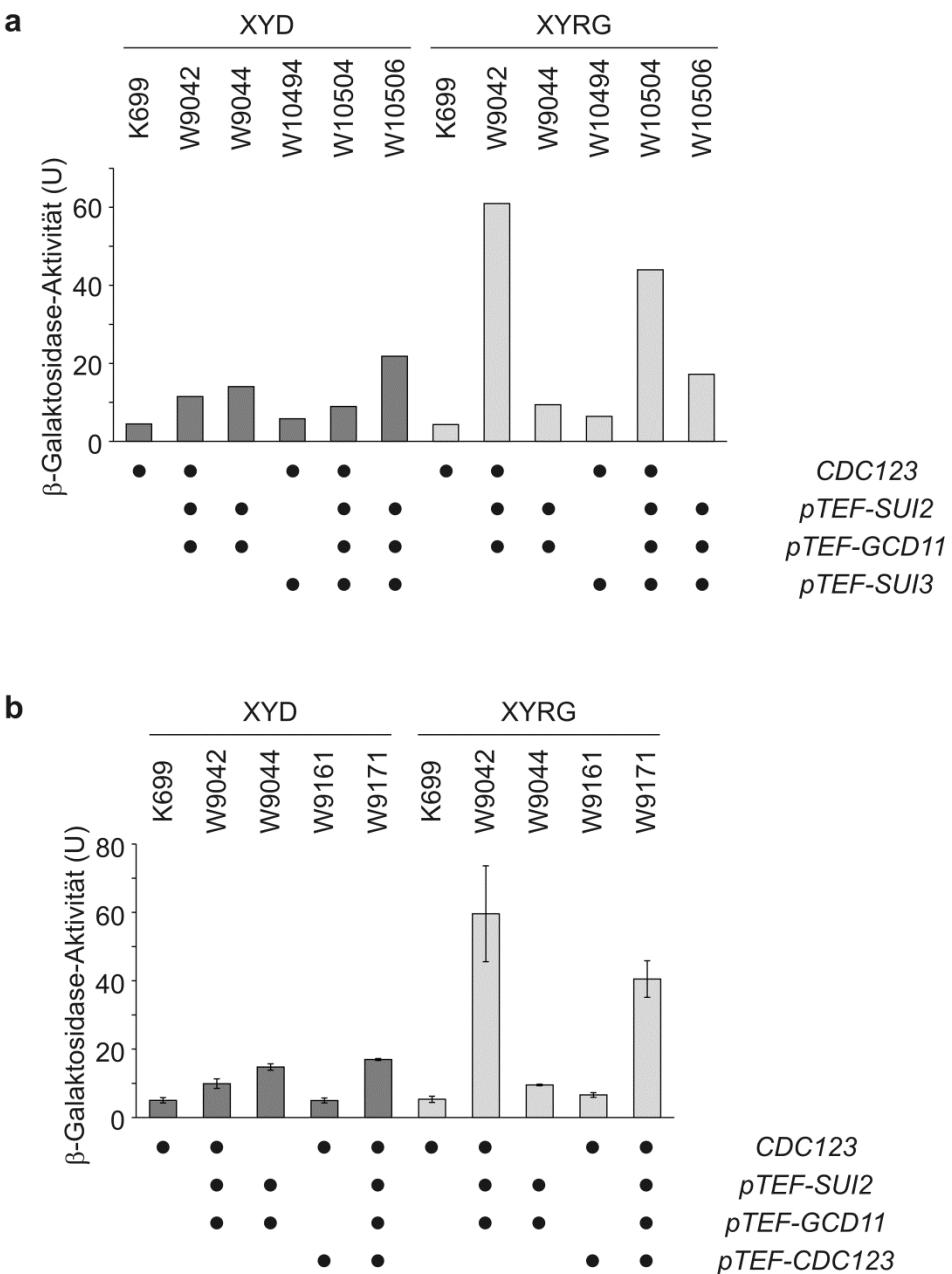


**Abbildung 9.9: Nur die gemeinsame Überexpression von *GCD11* und *SUI2* führt bei Anwesenheit von Cdc123 zu einer Derepression der *GCN4*-Expression in XYRG.**

Die Stämme K699 (Wildtyp), W9050 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*), W9046 (*CDC123 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W9042 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W9052 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1*), W9048 (*cdc123Δ:kanMX4 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) und W9044 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Je 2 Transformanden wurden in XYD angezogen, in H<sub>2</sub>O gewaschen und in XYD bzw. XYRG überimpft. Nach Inkubation für ca. 18 h bei 25°C wurde die β-Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des ONPG-Tests gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte.

### 9.2.8.3 Überexpression von *SUI3* und *CDC123*

Bei Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von endogenen Mengen an Cdc123 trat in XYRG eine Derepression der *GCN4*-Expression ein. Wie aus Abbildung 9.10 ersichtlich ist, konnte der Anstieg der *GCN4*-Expression unter diesen Bedingungen weder durch die Überexpression der dritten eIF2-Untereinheit (*SUI3*) noch durch die Überexpression von *CDC123* verhindert werden, allerdings fiel der Anstieg in beiden Fällen etwas geringer aus.



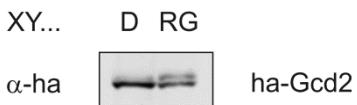
**Abbildung 9.10: Auch bei zusätzlicher Überexpression von *SUI3* oder *CDC123* führt die Überexpression von *SUI2* und *GCD11* in Anwesenheit von *Cdc123* zur Derepression der *GCN4*-Expression in XYRG.**

**a,** Die Stämme K699 (Wildtyp), W9042 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W9044 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W10494 (*his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3*), W10504 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3*) und W10506 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 his3::pTEF2-SUI3-tCYC1-HIS3*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporter pWS1429 transformiert. Die Transformanden wurden in XYD angezogen, in H<sub>2</sub>O gewaschen und in XYD bzw. XYRG überimpft. Nach Inkubation für ca. 18 h bei 25°C wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mittels des ONPG-Tests bestimmt.

**b,** Die Stämme K699 (Wildtyp), W9042 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W9044 (*cdc123Δ:kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W9161 (*his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3*) und W9171 (*CDC123 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2 his3::pTEF2-CDC123-tCYC1-HIS3*) wurden mit dem *GCN4-lacZ*-Reporterplasmid pWS1429 transformiert. Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden die Transformanden wie in Teil a beschrieben kultiviert und gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Messung von je drei Transformanden.

#### 9.2.8.4 Effekt der Kohlenstoffquelle auf die Mobilität der eIF2B-Untereinheit Gcd2

Für Versuche zur Depletion von Translationsinitiationsfaktoren wurde die Expression der δ-Untereinheit von eIF2B (Gcd2) unter die Kontrolle des *GALL*-Promotors gestellt und ein N-terminales ha-Epitop eingeführt (Weinzierl, 2011). Nach Expression in XYRG wurde daraufhin eine Doppelbande von ha-Gcd2 beobachtet. Mittels Immunpräzipitation und Phosphatase-Behandlung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der langsamer laufenden Bande um eine phosphorylierte Form von ha-Gcd2 handelt (Weinzierl, 2011). Bei den Depletionsexperimenten fiel auf, dass der Shift von XYRG in XYD möglicherweise das Laufverhalten von ha-Gcd2 in SDS-PAGE und Western Blot beeinflusst. Allerdings erschwerte die Abnahme der ha-Gcd2-Menge nach Repression des *GALL*-Promotors den Vergleich von Proben aus XYRG und XYD und verhinderte so eine eindeutige Aussage zum Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Mobilität von ha-Gcd2 (Weinzierl, 2011). Deshalb wurde nun der konstitutive *TEF1*-Promotor für die Expression gewählt und über PCR und homologe Rekombination am *GCD2*-Lokus der Stamm W10052 (*natNT2-pTEF1-ha3-GCD2*) hergestellt. Nach Kultivierung in XYD bzw. XYRG wurde das Laufverhalten von ha-Gcd2 in SDS-PAGE und Western Blot verglichen (Abb. 9.11). In der Tat zeigte sich in XYRG eine deutliche Doppelbande, in XYD hingegen nicht. Die δ-Untereinheit von eIF2B unterscheidet sich also in XYD und XYRG hinsichtlich ihrer Phosphorylierung. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Regulation der eIF2B-Aktivität in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle.



**Abbildung 9.11: Vergleich der Mobilität von ha-Gcd2 nach Kultivierung in XYD bzw. XYRG**

Der Stamm W10052 (*natNT2-pTEF1-ha3-GCD2*) wurde in XYD bzw. XYRG bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In den Proteinlysaten wurde ha-Gcd2 mittels Western-Blot-Analyse mit dem 12CA5-Antikörper untersucht.

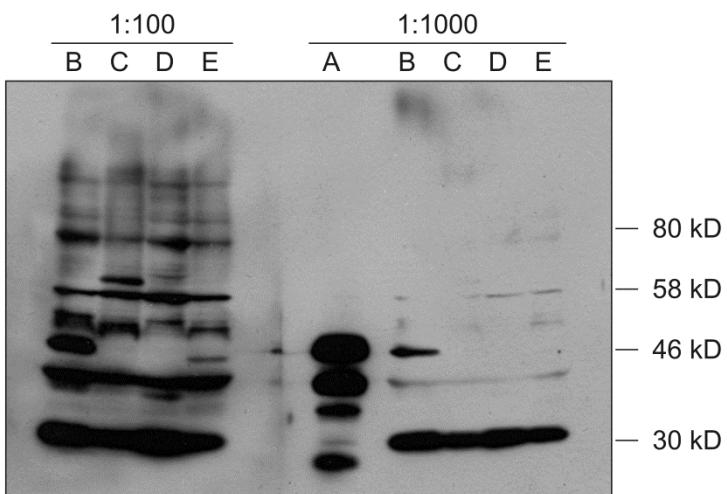
## 9.3 Produktion und Affinitätsreinigung von Antiseren

### 9.3.1 Produktion eines Antiserums gegen Cdc123

Zur Produktion eines Antiserums wurde zunächst his6-Cdc123 in *E. coli* exprimiert und über eine Affinitätssäule gereinigt: Der *E. coli*-Stamm BL21C+ wurde mit dem Plasmid pWS1389 transformiert, die Expression und Aufreinigung von his6-Cdc123 erfolgten wie unter den Methoden beschrieben (Abschnitte 7.1.1, 7.5.1.2 und 7.5.1.5). Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE und Rapid Stain-Färbung hinsichtlich der Menge und Reinheit von his-Cdc123 analysiert. Anschließend wurden die geeigneten Fraktionen vereinigt und über eine Säule (Biomax-10 NMWL Membrane von Millipore) umgepuffert und konzentriert. Dafür wurden zwei Säulchen zunächst mit 200 µl H<sub>2</sub>O gewaschen (12000 g 5 min 4°C), dann wurde die his6-Cdc123-Lösung portionsweise auf die Säulen gegeben und durch Zentrifugation bei 12000 g und 4°C auf jeweils ca. 100 µl konzentriert. Anschließend wurden dreimal 500 µl PBS zugegeben und wieder durch Zentrifugation bei 12000 g und 4°C auf ca. 150 µl konzentriert. So wurden am Ende 300 µl konzentrierte Proteinlösung erhalten. Die Konzentration an his-Cdc123 wurde durch SDS-PAGE und Rapid Stain-Färbung als etwa 15 µg/µl abgeschätzt, wofür eine Verdünnungsreihe des his-Cdc123-Konzentrats und Lösungen von BSA und Ovalbumin bekannter Konzentration als Referenz eingesetzt wurden.

Die Immunisierung eines Kaninchens und Gewinnung eines α-Cdc123-Antiserums wurde von Davids Biotechnologie (Regensburg) durchgeführt. Das Antiserum wurde in verschiedenen Verdünnungen im Western Blot getestet (exemplarisch sind die Ergebnisse von zwei Verdünnungen in Abb. 9.12 dargestellt). Bei starker Verdünnung waren endogene Cdc123-Mengen in den Proteinlysaten schlecht detektierbar, bei geringerer Verdünnung traten hingegen zahlreiche Kreuzreaktionen auf. Deshalb wurde eine Affinitätsreinigung des Antiserums durchgeführt.

#	Stamm	Genotyp	MW (kD)
A	W6098	<i>pGAL1-ha3-CDC123</i>	46,0
		<i>CDC123</i>	41,9
B	W6194	<i>pCDC123-ha3-CDC123</i>	46,0
C	W7089	<i>CDC123-flag12</i>	59,0
D	W7329	<i>cdc123Δ</i>	-
E	W7470	<i>pCDC123-ha3-CDC123(4-360)</i>	45,8
		<i>CDC123</i>	41,9



**Abbildung 9.12: Test des  $\alpha$ -Cdc123-Antiserums in verschiedenen Verdünnungen**

Für den Test wurden Proteinlysate der Stämme W6098 (*leu2::pGAL1-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*), W7089 (*CDC123-flag12-HIS3MX6*), W7329 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP2 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*) und W7470 (*CDC123/cdc123Δ::kanMX4 leu2/leu2::pCDC123-ha3-CDC123(4-360)-tCYC1-LEU2*) eingesetzt. W6098 wurde in XYRG kultiviert und 1 OD<sub>595</sub> des Proteinlysats auf das SDS-Gel aufgetragen, die anderen Stämme wurden in XYD angezogen und 2 OD<sub>595</sub> aufgetragen. Das erwartete Molekulargewicht der Cdc123-Varianten ist in der Tabelle angegeben. Die Detektion des Western Blots erfolgte mit  $\alpha$ -Cdc123-Antiserum in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 und  $\alpha$ -Kaninchen-HRP. Die ungefähre Position der Banden des Protein-Standards ist an der rechten Seite markiert.

### 9.3.2 Affinitätsreinigung von $\alpha$ -Cdc123

Für die Affinitätsreinigung des  $\alpha$ -Cdc123-Antiserums wurde mbp-Cdc123 in *E. coli* exprimiert, über eine Amylosesäule gereinigt und anschließend kovalent an eine AminoLink-Säule gekoppelt.

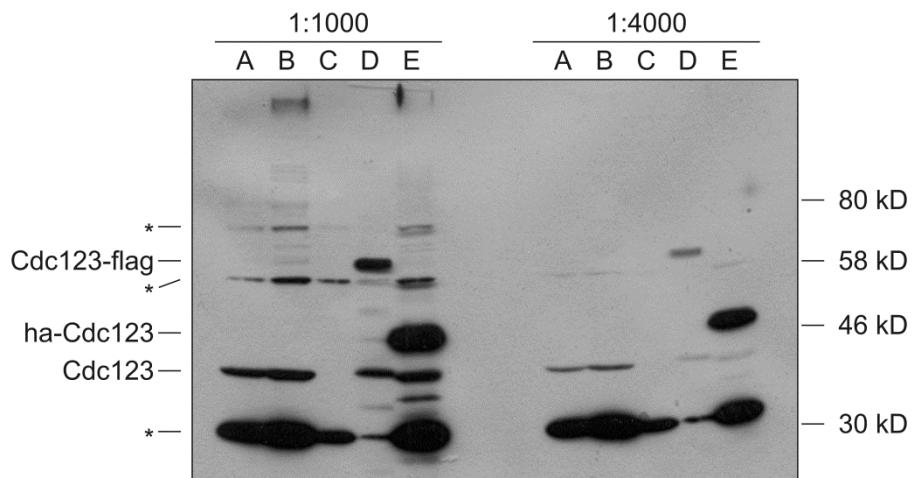
Zunächst wurde der *E. coli*-Stamm BL21C+ mit dem Plasmid pWS1193 transformiert. Die Expression und Aufreinigung von mbp-Cdc123 erfolgte wie unter den Methoden beschrieben (Abschnitte 7.1.1, 7.5.1.2 und 7.5.1.4). Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE und Rapid Stain-Färbung hinsichtlich der Menge und Reinheit von mbp-Cdc123 analysiert. Anschließend wurden die geeigneten Fraktionen vereinigt und über eine Biomax-10-Säule umgepuffert wie unter 9.3.1 beschrieben, allerdings wurde Coupling Buffer (100 mM Natriumcitrat, 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10) statt PBS zum Waschen verwendet und das Protein wurde am Ende in 2 ml Coupling Buffer aufgenommen.

Ein Bradford-Test mit einer BSA-Eichgerade ergab eine Proteinkonzentration von 1,6 mg/ml, d.h. insgesamt wurden etwa 3 mg mbp-Cdc123 aufgereinigt.

Für die kovalente Kopplung wurden 2 ml AminoLink Resin (Pierce; entspricht 4 ml Suspension) in eine Säule gefüllt und mit 6 ml Coupling Buffer gewaschen. Anschließend wurde die mbp-Cdc123-Lösung (in 2 ml Coupling Buffer) auf die Säule gegeben und die verschlossene Säule für etwa 4 h bei RT gerollert. Danach wurde die Säule mit 6 ml PBS gewaschen. Zur kovalenten Kopplung wurden 2 ml PBS und 40 µl NaCNBH<sub>3</sub> (Stammlösung: 5 M NaCNBH<sub>3</sub> in 1 M NaOH) zugegeben, die Säule fest verschlossen und über Nacht im Kühlraum gerollert. Danach wurde die Säule mit 4 ml Quenching Buffer (1 M Tris/HCl, pH 7,5) gewaschen. Zur Blockierung der restlichen Proteinbindungsstellen des AminoLink-Materials wurden 2 ml Quenching Buffer und 40 µl NaCNBH<sub>3</sub> zugegeben und die verschlossene Säule für 30 min bei RT gerollert. Danach wurde die Säule mit 10 ml 1 M NaCl gewaschen.

Mit dieser mbp-Cdc123-Säule wurden insgesamt drei Reinigungen von α-Cdc123-Antiserum durchgeführt, wobei folgendermaßen vorgegangen wurde: Zunächst wurde die Säule mit 6 ml PBS gewaschen. Danach wurden etwa 10 ml α-Cdc123-Antiserum portionsweise auf die Säule geladen, indem jeweils 2 ml Antiserum auf die Säule gegeben und für 1 h bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Säule mit 12 ml PBS gewaschen und die Waschfraktionen wurden mittels Bradford-Schnelltest auf Proteine getestet. Wenn in der Waschfraktion kein Protein enthalten war, wurde mit der Elution begonnen. Dafür wurden 8 ml Elution Buffer (160 mM Glycin/HCl, pH 2,8) auf die Säule gegeben und das Eluat in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden sofort mittels pH-Papier auf ihren pH-Wert getestet und bei Bedarf durch Zugabe von Natrium-Phosphat-Puffer neutralisiert (1 M NaPi pH 8,6, ca. 90 µl für die 1 ml-Fraktion benötigt). Mittels Bradford-Schnelltest wurde verfolgt, welche Elutionsfraktionen Protein enthielten. Diese wurden anschließend über eine Säule (Biomax-30 NMWL Membrane von Millipore) umgepuffert wie unter 9.3.1 beschrieben, allerdings wurde PBS mit 0,05% Natriumazid zum Waschen verwendet. Das gereinigte Antiserum wurde am Ende in 1 ml PBS mit 0,05% Natriumazid aufgenommen und bei 4°C gelagert. Nach Durchführung der drei Reinigungen wurden die gereinigten Antikörper vereinigt, mit 20% Glycerin versetzt und in 100µl-Aliquots bei -70°C gelagert. In der Western-Blot-Analyse des gereinigten Antiserums (Abb. 9.13) waren endogene Mengen verschiedener Cdc123-Varianten gut nachweisbar. Die Kreuzreaktionen waren geringer, allerdings tritt auch bei Verwendung des gereinigten Antiserums eine starke Kreuzreaktion bei etwa 30 kD und zwei schwächere Kreuzreaktionen bei etwa 60 kD und 80 kD auf. Der affinitätsgereinigte Antikörper ist auch zur Immunpräzipitation von Cdc123 einsetzbar (vgl. 4.7.1), wobei allerdings im Western Blot der Präzipitate eine sehr starke Bande der Immunglobuline auftritt.

#	Stamm	Genotyp	MW (kD)
A	BY4741	<i>CDC123</i>	41,9
B	K699	<i>CDC123</i>	41,9
C	W7329	<i>cdc123Δ</i>	-
D	W7110	<i>CDC123-flag12</i> <i>CDC123</i>	59,0 41,9
E	W6194	<i>pCDC123-ha3-CDC123</i>	46,0



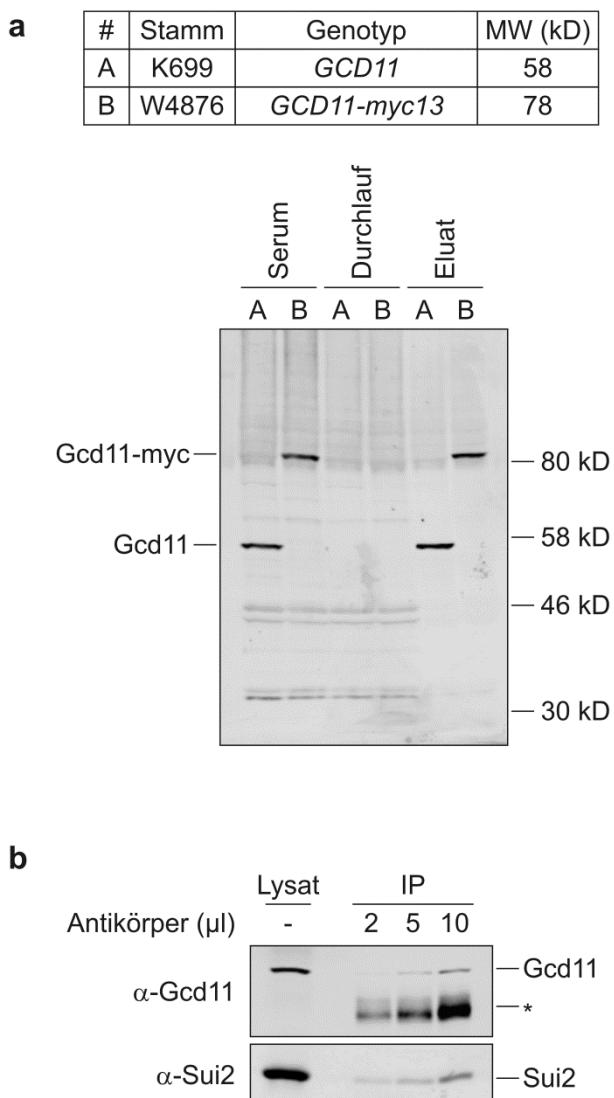
**Abbildung 9.13: Test des affinitätsgereinigten  $\alpha$ -Cdc123-Antiserums**

Für den Test wurden Proteinlysate der S288c- und W303-Wildtypen BY4741 und K699, sowie der Stämme W7329 (*cdc123Δ::kanMX4 trp1::pTEF2-SUI2-tCYC1-TRP2 leu2::pTEF2-GCD11-tCYC1-LEU2*), W7110 (*CDC123/CDC123-flag12-HIS3MX6 pWS2401*) und W6194 (*cdc123Δ::kanMX4 leu2::pCDC123-ha3-CDC123-tCYC1-LEU2*) eingesetzt. Die Stämme wurden in XYD (W7110: XYRG) kultiviert und 2 OD<sub>595</sub> des Proteinlysats auf das SDS-Gel aufgetragen. Das erwartete Molekulargewicht der Cdc123-Varianten ist in der Tabelle angegeben. Die Detektion des Western Blots erfolgte mit affinitätsgereigtem  $\alpha$ -Cdc123-Antiserum in den Verdünnungen 1:1000 und 1:4000 und  $\alpha$ -Kaninchchen-HRP. Die Banden sind an der linken Seite den verschiedenen Cdc123-Formen zugeordnet (\* = Kreuzreaktion). Die ungefähre Position der Standard-Banden ist an der rechten Seite markiert.

### 9.3.3 Affinitätsreinigung von $\alpha$ -Gcd11

Im Rahmen einer Bachelor-Arbeit wurde ein  $\alpha$ -Gcd11-Antiserum hergestellt, indem his6-Gcd11 aus *E. coli* gereinigt und zur Immunisierung eines Kaninchens (Davids Biotechnologie, Regensburg) eingesetzt wurde (Loscar, 2009). Um die Spezifität zu verbessern, wurde das  $\alpha$ -Gcd11-Antiserum über eine Affinitätsäule gereinigt. Dabei wurde analog zur Affinitätsreinigung des  $\alpha$ -Cdc123-Antiseraums vorgegangen, welche in Abschnitt 9.3.2 ausführlich beschrieben ist: Der *E. coli*-Stamm BL21C+ wurde zur Expression von mbp-Gcd11 mit dem Plasmid pWS1483 transformiert. mbp-Gcd11 wurde über eine Amylosesäule aufgereinigt, umgepuffert und kovalent an eine AminoLink-Säule gekoppelt. Mit Hilfe dieser Säule wurden zwei 10 ml-Portionen  $\alpha$ -Gcd11-Antiserum gereinigt und anschließend in jeweils 1 ml PBS + 0,05% Natriumazid aufgenommen. Die gereinigten Antikörper wurden vereinigt, mit 20% Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

In der Western-Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Kreuzreaktionen des Antiserums durch die Affinitätsreinigung reduziert wurden (Abb. 9.14a). Außerdem war es möglich, den gereinigten Antikörper für die Immunpräzipitation einzusetzen (Abb. 9.14b). Im Western Blot war sowohl die Präzipitation von Gcd11, als auch die Copräzipitation von Sui2 nachweisbar, allerdings trat auch eine sehr starke Bande der Immunglobuline auf.



**Abbildung 9.14: Test des affinitätsgereinigten  $\alpha$ -Gcd11-Antiserums**

**a**, Für den Test wurden die Stämme K699 (*GCD11*) und W4876 (*GCD11-myc13-HIS3MX6*) in XYD angezogen und je 1 OD<sub>595</sub> der Proteinlysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden das ursprüngliche Antiserum (Serum), sowie der Durchlauf und das Eluat der Säulenreinigung in der Verdünnung 1:2500 zur Detektion des Western Blots eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente  $\alpha$ -Kaninchen-IRDye800. Die ungefähre Position der Standard-Banden ist an der rechten Seite markiert.

**b**, Der Wildtypstamm K700 wurde in XYD kultiviert. Aus dem Proteinlysat wurde Gcd11 mit dem gereinigten Antiserum präzipitiert, wobei unterschiedliche Antikörper-Mengen getestet wurden. Die Analyse des Präzipitats im Western Blot erfolgte mit dem gereinigten  $\alpha$ -Gcd11-Antikörper und  $\alpha$ -Sui2-Antiserum. (\* = Immunglobulin-Bande)

## 9.4 Verzeichnisse

### 9.4.1 Nomenklatur, Einheiten und Abkürzungen

Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.

In dieser Arbeit wurden folgende gebräuchliche Einheiten und Präfixe verwendet:

$\Omega$	Ohm	M	Mega ( $10^6$ )
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	k	Kilo ( $10^3$ )
A	Ampere	c	centi ( $10^{-2}$ )
d	Tage	m	Milli ( $10^{-3}$ )
F	Farad	$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
g	Gramm	n	Nano ( $10^{-9}$ )
h	Stunden		
l	Liter		
M	molar (mol/l)		
m	Meter		
min	Minuten		
s	Sekunden		
V	Volt		

Bei der Zentrifugation wurden entweder die Umdrehungen pro Minute (Upm) oder die Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ) angegeben. Bei der French Press wurde der Druck in der angloamerikanischen Maßeinheit psig (pounds per square inch gauge) angezeigt: 1 psi entspricht etwa 69 mbar und „gauge“ bedeutet, dass es sich um die Angabe des Überdrucks handelt. Das Molekulargewicht von Proteinen wurde in Kilodalton (kD) angegeben und die Enzymaktivität in Units (U).

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Bei Selektivmedium (vgl. 6.7.2) wurden folgende Abkürzungen verwendet: A = Adenin, H = Histidin, L = Leucin, T = Tryptophan und U = Uracil. Alle weiteren verwendeten Abkürzungen sind im Folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt:

$\alpha$ -	anti- (bei Antikörpern)
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\Delta$	Deletion
$\Delta 327$ (bzw. $\Delta 514$ )	C-terminale Verkürzung des Proteins nach Aminosäure 327 (bzw. 514), auch für das entsprechende Gen verwendet
1C	einfacher DNA-Gehalt (vor Replikation der DNA)
2C	doppelter DNA-Gehalt (nach Replikation der DNA)
4E-BP	eIF4E-Bindeprotein
5'Cap	7-Methylguanyl-Kappenstruktur am 5'Ende eukaryotischer mRNA

**A**

A	Absorption
aa	Aminosäure(n) (amino acids)
Abb.	Abbildung
AD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
αIF	archäeller Translationsinitiationsfaktor
amp	Ampicillin
APC	anaphase promoting complex (eine Ubiquitin-Ligase)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A-Stelle	Aminoacyl-Bindestelle im Ribosom

**B**

bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin

**C**

CDK	Zyklin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
chl	Chloramphenicol
CKI	CDK-Inhibitor
clonNAT	Nourseothricin
C-terminal	carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette

**D**

D	Glukose (Dextrose)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEAD-Box	Asp-Glu-Ala-Asp-Motiv der DEAD-Box-RNA-Helikase Familie
DIC	Differentialinterferenzkontrast (differential interference contrast)
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

**E**

E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol

**F**

FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence assisted cell sorting)
FEAR	Cdc14 early anaphase release
F-Primer	Forward-Primer

**G**

G	Galaktose
G418	Kanamycin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (GTPase activating protein)
Gcd <sup>-</sup>	General amino acid control derepressed

Gcn <sup>-</sup>	General amino acid control nonderepressible
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
<b>H</b>	
ha	Hämaggglutinin-Epitop
his6	6x Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse-radish peroxidase)
HU	Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea)
<b>I</b>	
IP	Immunpräzipitation
IRES	internal ribosome entry site
<b>K</b>	
kb	Kilobasen
KOD-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
<b>L</b>	
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
<b>M</b>	
mbp	Maltosebindeprotein
MEN	mitotic exit network
Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup>	mit Methionin beladene Initiator-tRNA
MFC	Multi-Faktor-Komplex (multi factor complex)
miRNA	mikro-RNA
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
myc	c-myc-Epitop
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
<b>N</b>	
Noc	Nocodazol
N-terminal	amino-terminal
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
<b>O</b>	
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
<b>P</b>	
p	Promotor
PABP	PolyA-Bindeprotein (polyA binding protein)
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Präinitiationskomplex (preinitiation complex)
P-Stelle	Peptidyl-Bindestelle im Ribosom

**R**

R	Raffinose
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
R-Primer	Reverse-Primer

**S**

S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	Skp1-Cdc53(Cullin)-F-Box-Protein-Komplex (eine Ubiquitin-Ligase)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism)
SPB	Spindelpolkörper (spindle pole body)

**T**

t	Zeit
t	Terminator
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TB	Terrific Broth (Bakterienmedium)
TBS	Tris-gepufferte Saline
TC	ternärer Komplex (ternary complex) aus eIF2, GTP und Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOR	target of rapamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup>	Initiator-tRNA (für Methionin)
ts	temperatursensitiv

**U**

UE	Untereinheit
uORF	offener Leserahmen vor (5') dem Startcodon des eigentlichen ORFs (upstream open reading frame)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht-translatierte Region einer mRNA (untranslated region)
UV	ultraviolett

**W**

WCE	Gesamtzellextrakt (whole cell extract), Zelllysat
WT, wt	Wildtyp

**X**

X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid
XYZ	Hefe-Vollmedium mit Zucker Z

**Y**

Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (yeast-two-hybrid)
-----	-------------------------------------

## 9.4.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Der eukaryotische Zellteilungszyklus am Beispiel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Abb. 3.2:	Die Regulation der Zellzyklusprogression in G1- und S-Phase bzw. G2- und M-Phase	17
Abb. 3.3:	Der kanonische Mechanismus der Translationsinitiation	21
Abb. 3.4:	Der GTP/GDP-Zyklus von eIF2	27
Abb. 3.5:	Die Regulation der Translation der <i>GCN4</i> -mRNA	31
Abb. 3.6:	Sequenzvergleich von Cdc123-Orthologen aus verschiedenen Spezies	35
Abb. 4.1:	<i>cdc123</i> -Mutanten haben einen Gcd <sup>-</sup> -Phänotyp.	39
Abb. 4.2:	Die Überexpression von Cdc123(C144S) führt zu einem Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression und einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase.	41
Abb. 4.3:	Im Gegensatz zu eIF2B interagiert Cdc123 nur mit Gcd11, aber nicht mit Sui2 und Sui3.	43
Abb. 4.4:	Cdc123 interagiert mit Gcd11 und Sui2 bei Co-Expression in <i>E. coli</i> .	44
Abb. 4.5:	Die Depletion von Cdc123 führt zu einem Arrest der Zellen in G1.	46
Abb. 4.6:	Die Depletion von Cdc123 beeinträchtigt die Assoziation der drei eIF2-Untereinheiten und die Interaktion von eIF2 mit eIF2B.	47
Abb. 4.7:	Die Depletion von Cdc123, aber nicht die Depletion von Translationsinitiationsfaktoren beeinträchtigt die Interaktion von Gcd11 mit Sui2 und Sui3.	50
Abb. 4.8:	<i>cdc123Δ327</i> beeinträchtigt die Interaktion von eIF2 mit eIF2B.	52
Abb. 4.9:	Gcd11(N376T) zeigt eine verbesserte Interaktion mit Sui2.	54
Abb. 4.10:	Die N-terminale Verkürzung von Cdc123 um 56 Aminosäuren ist letal, die Verkürzung um drei Aminosäuren nicht.	55
Abb. 4.11:	Die Kombination von S157A mit S128A, T274A und S280A führt zu Temperatursensitivität.	57
Abb. 4.12:	Die Kombination von N- und C-terminalen Verkürzungen mit Aminosäure-substitutionen beeinträchtigt das Wachstum.	59
Abb. 4.13:	Der N-Terminus von Cdc123 ist wichtig für die Interaktion mit Gcd11.	61
Abb. 4.14:	Der C-Terminus von Gcd11 ist wichtig für die Interaktion mit Cdc123.	63
Abb. 4.15:	Die C-terminale Verkürzung von Gcd11 beeinträchtigt die Interaktion mit Cdc123, Sui2 und Sui3 und ist letal.	64
Abb. 4.16:	Die Interaktion von Cdc123 mit Gcd11 ist nicht auf neu synthetisiertes Gcd11 beschränkt.	67
Abb. 4.17:	Cdc123 ist ein Phosphoprotein.	69
Abb. 4.18:	Der C-Terminus von Cdc123 ist phosphoryliert.	71
Abb. 4.19:	Die Überexpression der Kinasen Yck1, Cdc15 und Mps1 beeinflusst die Mobilität von ha-Cdc123.	73
Abb. 4.20:	Die Überexpression von <i>YCK1</i> oder <i>YCK2</i> führt zur Phosphorylierung von Cdc123.	75
Abb. 4.21:	Auswirkungen der Überexpression von <i>YCK1</i> , <i>CDC15</i> oder <i>MPS1</i> auf Cdc123, Zellzyklusprogression und Wachstum	77
Abb. 4.22:	Die Überexpression von <i>YCK1</i> , <i>CDC15</i> oder <i>MPS1</i> zeigt keinen Einfluss auf eIF2.	78
Abb. 4.23:	Die Mobilität von ha-Cdc123 wird durch Deletionen, welche die Genomstabilität beeinträchtigen, und Behandlung mit MMS beeinflusst.	81

---

Abb. 4.24:	Die Behandlung von Zellen mit MMS führt zur Phosphorylierung von ha-Cdc123 und zum Arrest in der S-Phase.	84
Abb. 4.25:	Rolle von Gcn2, Gcn3 und verschiedenen Cdc123-Varianten bei MMS-Behandlung	85
Abb. 4.26:	<i>cdc123Δ327</i> und <i>gcn2Δ</i> beeinträchtigen die Bildung von eIF2-Foci bei Aminosäuremangel.	88
Abb. 4.27:	<i>cdc123Δ327</i> verringert die basale Phosphorylierung von Sui2, aber nicht den Anstieg der Phosphorylierung bei Aminosäuremangel.	89
Abb. 4.28:	Die Überexpression von <i>GCD11</i> und <i>SUI2</i> hat unterschiedliche Konsequenzen, abhängig von der Kohlenstoffquelle und dem Vorhandensein von Cdc123.	91
Abb. 4.29:	Die Zusammensetzung des eIF2-Komplexes in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und den Mengen an Gcd11, Sui2 und Cdc123	92
Abb. 4.30:	Der Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression in XYRG ist Gcn2-unabhängig.	93
Abb. 4.31:	Einfluss verschiedener Zellzyklusarrests auf die Mobilität von ha-Cdc123	94
Abb. 4.32:	Einfluss verschiedener Zellzyklusarrests auf die <i>GCN4</i> -Expression	95
Abb. 4.33:	Zellzyklusarrest und Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression bei α-Faktor-Behandlung sind Gcn2-unabhängig.	97
Abb. 4.34:	Einfluss der Überexpression von <i>CDC123</i> auf Zellzyklusarrest und Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression bei α-Faktor-Behandlung	99
Abb. 4.35:	Einfluss der Deletion von <i>CDC123</i> auf Zellzyklusarrest und Anstieg der <i>GCN4</i> -Expression bei α-Faktor-Behandlung	100
Abb. 5.1:	Modell zur eIF2-Assemblierung durch Cdc123	104
Abb. 9.1:	Sequenzvergleich von eIF2y-Homologen aus verschiedenen Spezies	175
Abb. 9.2:	Bei Depletion von ha-Gcd6 tritt verstärkte Degradation von Gcd11-myc auf.	177
Abb. 9.3:	Suppression von <i>cdc123Δ</i> durch Überexpression von eIF2-Untereinheiten	178
Abb. 9.4:	Vergleich der Proteinmengen von N-terminalen Verkürzungen von Cdc123	178
Abb. 9.5:	Aufreinigung von flag-Cdc123 und Cdc123-flag für die Massenspektrometrie	181
Abb. 9.6:	Die Rolle von Cdc123 für die Beeinträchtigung des Wachstums bei Kinase-Überexpression	185
Abb. 9.7:	Einfluss verschiedener Cdc123-Varianten und der Deletionen von <i>GCN2</i> und <i>GCN3</i> auf die MMS-Sensitivität	187
Abb. 9.8:	Einfluss des Zuckers auf die <i>GCN4</i> -Expression	188
Abb. 9.9:	Nur die gemeinsame Überexpression von <i>GCD11</i> und <i>SUI2</i> führt bei Anwesenheit von Cdc123 zu einer Derepression der <i>GCN4</i> -Expression in XYRG.	189
Abb. 9.10:	Auch bei zusätzlicher Überexpression von <i>SUI3</i> oder <i>CDC123</i> führt die Überexpression von <i>SUI2</i> und <i>GCD11</i> in Anwesenheit von Cdc123 zur Derepression der <i>GCN4</i> -Expression in XYRG.	190
Abb. 9.11:	Vergleich der Mobilität von ha-Gcd2 nach Kultivierung in XYD bzw. XYRG	191
Abb. 9.12:	Test des α-Cdc123-Antiserums in verschiedenen Verdünnungen	193
Abb. 9.13:	Test des affinitätsgereinigten α-Cdc123-Antiserums	195
Abb. 9.14:	Test des affinitätsgereinigten α-Gcd11-Antiserums	196

### 9.4.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 6.1:	Liste der verwendeten primären Antikörper	120
Tab. 6.2:	Liste der verwendeten sekundären Antikörper	120
Tab. 6.3:	Liste der verwendeten Oligonukleotide	132
Tab. 6.4:	Liste der verwendeten Plasmide	134
Tab. 6.5:	Liste der verwendeten Hefestämme	137
Tab. 9.1:	Liste der Translationsinitiationsfaktoren in <i>S. cerevisiae</i>	174
Tab. 9.2:	Analyse der Überexpression von Kinasen und ihres Einflusses auf ha-Cdc123	182

## 10. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

Name: Angelika Franziska Perzlmaier (geb. Batke)  
geboren am: 22.06.1983 in Augsburg  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Adresse: Bischof-Konrad-Str. 2, 93051 Regensburg

### Schulbildung

09/1989 – 07/1993 Eichendorff-Grundschule, Augsburg-Haunstetten  
09/1993 – 07/2002 Jakob-Fugger-Gymnasium, Augsburg  
Abschluss: Abitur

### Studium

10/2002 – 07/2007 Studium der Biochemie, Universität Regensburg  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin  
09/2005 – 02/2006 Auslandssemester an der Universidad de Zaragoza, Spanien  
11/2006 – 07/2007 Diplomarbeit, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Zellbiologie und  
Pflanzenphysiologie, PD Dr. Jürgen Stolz  
Titel: Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Put3p bei der  
Wahrnehmung von Riboflavin in *Saccharomyces cerevisiae*

### Promotion

10/2007 – 11/2011 Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Seufert  
Titel: Die Rolle des Zellproliferationsproteins Cdc123 bei der Initiation der  
Translation

## 11. DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit, für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen und seine Begeisterung für dieses Thema.

Ich danke Prof. Dr. Herbert Tschochner für die Begutachtung meiner Arbeit und Prof. Dr. Frank Sprenger, Prof. Dr. Reinhard Wirth und Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Bei Prof. Dr. Rainer Deutzmann bedanke ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie. Adelheid Weissgerber danke ich für ihre hervorragende Unterstützung bei den Screens zur Kinase-Überexpression und zur Identifizierung von Cdc123-Interaktionspartnern mittels Y2H. Mein besonderer Dank gilt Sabine Weinzierl für ihre Hilfe bei der Mikroskopie von GFP-Fusionen. Außerdem möchte ich allen Diplomanden, Bacheloranden und Praktikanten danken, die am Themengebiet von Cdc123 und der Translationsinitiation mitgewirkt haben.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Seufert, Sabine Weinzierl und Korbinian Perzlmaier bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen am Lehrstuhl für Genetik danke ich herzlich für ihre großartige Unterstützung und die angenehme Atmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Christoph Morgenthaler, Sabine Weinzierl und Katharina Hannig für die aufmunternden Diskussionen und die Versorgung mit Kaffee, Obstsalat, Süßigkeiten und Büchern.

Und zum Schluss ein großes Dankeschön an meinen Mann Korbinian und an meine ganze Familie für die Unterstützung, die ich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit erfahren durfte, und für ihre Geduld, wenn's im Labor mal wieder länger gedauert hat.