

# Die Funktion des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Hub1 in *S. cerevisiae*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Mathias Dahlmann  
aus Leisnig

Dezember 2008

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden von  
Dezember 2003 bis Dezember 2008  
in der Arbeitsgruppe „Posttranslationale Modifikationen“  
unter der Leitung von  
Dr. Gunnar Dittmar  
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
durchgeführt.

1. Gutachter: Professor Dr. Volker Haucke
2. Gutachter: Dr. Shiao Li Oei

Disputation am:      Donnerstag, den 19. März 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Genexpression.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Prozessierung der prä-mRNS.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Modifikationen am 5'- und am 3'-Ende.....	7
1.2.2. Modifikation durch Splicing.....	8
1.2.3. prä-mRNS Splicing.....	9
1.2.4. Aufbau und Reaktionszyklus des Spliceosoms.....	10
1.2.5. Regulation des Splicings in der Meiose.....	11
1.2.6. prä-mRNS Retention und NMD.....	12
<b>1.3. Ubiquitin und das Ubiquitin-Proteasomsystem.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Ubiquitin-ähnliche Proteine.....</b>	<b>15</b>
1.4.1. Interferon-Stimulated Gene-15.....	16
1.4.2. Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated-8.....	16
1.4.3. Small Ubiquitin-Related Modifier.....	17
1.4.4. Ubiquitin-Fold Modifier-1.....	17
1.4.5. Atg8 und Atg12.....	18
1.4.6. Ubiquitin-Related Modifier-1.....	18
1.4.7. Ubiquitin-Like Protein-5 / Homologous to Ubiquitin 1.....	19
<b>1.5. Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Genetische Interaktion von Hub1 mit einer Prp8-Mutante .....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Suche nach Genen mit synthetischer Letalität.....	21
2.1.2. Charakterisierung der Prp8-Mutante.....	22
<b>2.2. Interaktion mit dem Splicing-Faktor Snu66.....</b>	<b>25</b>
2.2.1. Interaktion von Hub1 und Snu66.....	25
2.2.2. Letalität der Überexpression eines N-terminalen Snu66-Fragments.....	26

<b>2.3. Einfluss von <math>\Delta hub1</math> und <math>prp8(P1384L)</math> auf das Splicing.....</b>	<b>27</b>
2.3.1. Genetische Interaktionen von Hub1 mit Faktoren des ersten Splicing-Schritts .....	27
2.3.2. Splicing von veränderten Konsensussequenzen: Kupfersensitivität.....	30
2.3.3. Splicing von veränderten Konsensussequenzen: $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	32
2.3.4. Splicing von veränderten Konsensussequenzen: RT-PCR.....	33
<b>2.4. Einfluss von <math>\Delta hub1</math> auf die prä-mRNS-Retention.....</b>	<b>34</b>
2.4.1. Genetische Interaktion von Hub1 mit Faktoren des RES.....	35
2.4.2. prä-mRNS-Retention: Kupfersensitivität und $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	35
<b>2.5. Störung der Hub1-Funktion durch C-terminale Verlängerung .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6. Charakterisierung funktionaler Aminosäurereste von Hub1.....</b>	<b>39</b>
2.6.1. Mutagenese von Hub1 und Selektion funktionsloser Mutanten.....	40
2.6.2. Expressionsgrad und Stabilität der Hub1-Mutanten.....	41
2.6.3. Interaktion der Hub1-Mutanten mit Snu66.....	43
2.6.4. Funktionstest der Mutanten durch genetische Interaktion.....	46
<b>3. Auswertung.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Synthetische Letalität nach EMS-Mutagenese .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2. Die Mutation P1384L in Prp8.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3. Einfluss von <math>\Delta hub1</math> auf die prä-mRNS-Prozessierung.....</b>	<b>52</b>
3.3.1. Genetische Interaktionen.....	52
3.3.2. prä-mRNS-Retention.....	53
<b>3.4. Charakterisierung der Hub1-Mutanten.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5. Ausblick.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Bakterienstämme.....	59
4.1.2. Hefestämme.....	59
4.1.3. Plasmide.....	61
4.1.4. Oligonukleotide.....	62
<b>4.2. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>64</b>
4.2.1. Allgemeine Methoden.....	64
4.2.2. Klassische Klonierung.....	64
4.2.3. Gateway®-System.....	64

4.2.4. SDS-PAGE / Western Blot / Immundetektion.....	65
<b>4.3. E. coli-Methoden.....</b>	<b>65</b>
4.3.1. Medien.....	65
4.3.2. Elektrokompente Zellen und DNS-Transformation.....	65
4.3.3. Plasmidpräparation.....	66
4.3.4. Proteinexpression.....	66
<b>4.4. Hefe-Methoden.....</b>	<b>66</b>
4.4.1. Medien.....	66
4.4.2. Kreuzen, Sporulation und Tetradenanalyse.....	67
4.4.3. Tüpfeltest zur Wachstumsanalyse .....	68
4.4.4. Kompetente Zellen und DNS-Transformation.....	68
4.4.5. Präparation von genomischer DNS / Plasmiden.....	68
4.4.6. Präparation von RNS.....	69
4.4.7. Lyse von Hefezellen.....	69
<b>4.5. Suche nach genetischen Interaktionen mit Hub1.....</b>	<b>69</b>
4.5.1. Mutagenese der Zellen.....	69
4.5.2. Suche nach komplementierenden genomischen Fragmenten.....	70
4.5.3. Bestimmung der Mutation in genomischer DNA.....	70
4.5.4. Suche nach genetischen Interaktionen von Deletionsstämmen.....	70
<b>4.6. Wachstumskurve.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7. Reverse-Transkriptase (RT) – PCR.....</b>	<b>71</b>
4.7.1. DNS-Verdau und RT-Reaktion.....	71
4.7.2. PCR nach RT-Reaktion:.....	71
<b>4.8. Wachstum auf Kupferplatten.....</b>	<b>71</b>
<b>4.9. <math>\beta</math>-Galaktosidase-Assay.....</b>	<b>72</b>
<b>4.10. N- und C-terminale Erweiterungen von Hub1.....</b>	<b>73</b>
<b>4.11. Mutagenese von HUB1 und Charakterisierung der Mutanten.....</b>	<b>73</b>
4.11.1. Mutagenese und Isolation der Mutanten.....	73
4.11.2. Vergleich der zellulären Hub1-Proteinlevel.....	74
4.11.3. Vergleich der Hub1-Halbwertszeiten.....	74
4.11.4. Bindung der Mutanten an Snu66 im Two-Hybrid-System.....	75
4.11.5. in-vitro Bindung der Mutanten an Snu66(1-107).....	75
4.11.6. Komplementation der genetischen Interaktionen.....	76

<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>94</b>
6.1. Abkürzungen.....	94
6.2. Erklärung.....	95
6.3. Danksagung.....	95

## Zusammenfassung der Dissertation:

### Die Funktion des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Hub1 in *S. cerevisiae*

Die Steuerung biochemischer Reaktionen und die Lokalisierung von Proteinen erfolgt in der Zelle oft über Signalmoleküle. Neben Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung von Aminosäureresten, werden zelluläre Prozesse durch eine Modifikation der beteiligten Faktoren mit Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Proteinen reguliert. Die gemeinsame Grundlage dieser Proteinfamilie stellt die Faltung des gesamten Proteins oder einer seiner Domänen dar. Ubl5 ist ein Mitglied dieser Familie, dessen Homologe in eukaryontischen Lebewesen stark konserviert sind. Abgesehen von der strukturellen Ähnlichkeit mit Ubiquitin besitzt es wenig Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und wird, soweit bekannt, nicht kovalent an Zielproteine gebunden. In dieser Arbeit wurde das homologe Protein der Bäckerhefe Hub1, auf dessen Interaktionspartner sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene untersucht. So konnten eine synthetisch letale Interaktion zwischen Hub1 und einer P1484L-Mutation im Splicing-Faktor *PRP8*, sowie weitere genetische Interaktionen nicht-essentieller Komponenten des Spliceosoms und des prä-mRNS-Retentionsystems charakterisiert werden. Sowohl die *Prp8*-Mutante, als auch die Deletion von Hub1 führen zu Splicing-Defekten von Introns mit ungewöhnlichen 5'-Spleißstellen. In Zellen ohne Hub1 wurde zusätzlich ein Anstieg der aus dem Kern exportierten, ungespleißten prä-mRNS festgestellt.

Da bisher keine Informationen über funktionale Aminosäurereste von Hub1 bekannt waren, wurden durch PCR-basierte Mutagenese Hub1-Mutanten generiert und deren Funktion durch die charakterisierten genetischen Interaktionen (*in vivo*), als auch durch die Bindung an Snu66 (*in vitro*) überprüft. Dabei konnten Bereiche von Hub1 festgestellt werden, bei denen Mutationen entweder die Bindung an Snu66 störten, aber für die Komplementation der genetischen Interaktion nicht essentiell waren, und umgekehrt.

Hub1 beeinflusst demnach die Effizienz, mit der bestimmte Transkripte gespleißt und im Zellkern zurückgehalten werden. Beide Mechanismen sind auf die korrekte Erkennung der 5'-Spleißstelle angewiesen, wodurch eine Funktion von Hub1 bei diesem Prozess vermutet werden kann.

Abstract of the PhD-thesis:

### **Cellular function of the ubiquitin-like protein Hub1 in *S. cerevisiae***

Biochemical reactions and localization of proteins or other cellular factors are often regulated by signaling molecules. In addition to phosphorylation, methylation or acetylation of amino acid residues, modification of proteins with ubiquitin or ubiquitin-like modifiers is a key process of regulation. This protein family is characterized by a similar structural fold of either the whole protein or one of their domains. Ubl5 is a member of this protein family, that is highly conserved within eucaryotes. Aside from its tertiary structure, it shares only weak similarity with ubiquitin and seems not to be attached covalently to other proteins. The focus of this work was the *S. cerevisiae* homologue Hub1 and its physical and genetic interactions.

The deletion of Hub1 leads to genetic interactions with several splicing factors, including a P1384L mutation in Prp8 and members of the U4/U6.U5 tri-snRNP and the complexes containing Prp19 and Cef1. Moreover, the deletion of Hub1 also leads to an increased leakage of unspliced pre-mRNA to the cytoplasm.

Since there was no information available, which amino acid residues of Hub1 were essential for its function, a set of Hub1 mutants with substitutions of single amino acids was generated and tested for their protein stability, their ability to bind the only known direct interaction partner Snu66 and their function to complement the genetic interactions. Distinct areas at the surface of Hub1 were found, that showed reduced binding of Snu66 *in vitro*, but kept their function to complement the genetic interactions, and vice versa.

The deletion of Hub1 showed a decrease in the splicing efficiency of certain transcripts and their retention in the nucleus. Both mechanisms depend on the correct identification of the 5'-splice site and Hub1 may have a distinct function in this process.

# 1 Einleitung

## 1.1 Genexpression

Durch die Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) als Träger der genetischen Information (Avery et al. 1995) und der Bestimmung deren struktureller Eigenschaften (Watson and Crick 1953), wurde es möglich, die molekularen Mechanismen zu erforschen, die zur Umsetzung der vererbten genetischen Informationen in Organismen führt, und wie diese reguliert wird. Beobachtungen, dass DNS zunächst in Ribonukleinsäure (RNS) umgeschrieben wird, die als Vorlage zur Synthese von Proteinen dient (Zubay 1958; Weiss and Nakamoto 1961), führte zur Formulierung des „zentralen Dogmas der Molekularbiologie“ (Crick 1958, 1970), das die Übertragung von Sequenzinformationen von Nukleinsäuren auf Nukleinsäuren oder Proteine postuliert, aber den Transfer der Information von Proteinen auf Proteine oder auf Nukleinsäuren ausschließt. Das Muster, mit dem die genetische Information einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übergeht, wird als der genetische Code bezeichnet, bei dem eine Triplet-Seqenz der Boten-RNS (mRNS) die translatierte Aminosäure bestimmt (Crick et al. 1961; Lengyel 1966), und in fast allen Organismen universell gilt. Die Transkription und die Translation eines Gens findet in Bakterien nahezu gleichzeitig statt (Imamoto and Ito 1968), da beide Reaktionen im selben Kompartiment ablaufen können und durch ihre Kopplung eine schnellere Regulation der Genexpression ermöglichen. In eukaryontischen Zellen verläuft die Transkription dagegen im Zellkern, während die Translation außerhalb des Kerns erfolgt. Die Entkopplung der beiden Reaktionen erfordert dabei zusätzliche zelluläre Mechanismen, bei der die zu translatierende RNS modifiziert und schließlich durch die Kernpore exportiert wird.

## 1.2 Prozessierung der prä-mRNS

### 1.2.1 Modifikationen am 5'- und am 3'-Ende

Bereits während der Transkription eines Gens durch eine DNS-abhängige RNS-Polymerase wird das entstehende freie 5'-Ende der prä-mRNS durch eine „Cap“-Struktur modifiziert. Ein 7-Methylguanin bindet über eine ungewöhnliche 5'-5'-Triphosphatbindung an die Ribose des 5'-Endes der prä-mRNS (Shatkin 1976), und wird von Faktoren des „Cap“-bindenden Komplexes (CBC) gebunden (Moteki and Price 2002; Lewis et al. 1996). Das „Capping“ stabilisiert die mRNS, ermöglicht durch den gebundenen CBC den effizienten Export durch die Kernpore und ist not-

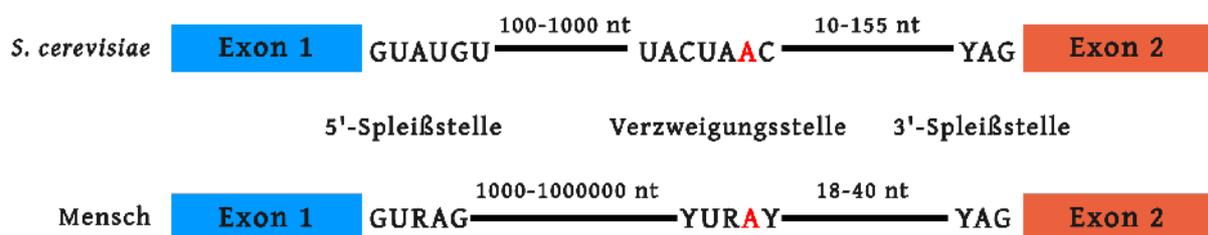
wendig für die spätere Translationsinitiation (McCracken et al. 1997). Das 3'-Ende der prä-mRNS wird durch Polyadenylierung um etwa 100 bis 200 Adenosinreste verlängert (Colgan and Manley 1997; Wahle and Rügsegger 1999), die zur Stabilisierung der RNS gegenüber zytoplasmatischen Exonukleasen führt. Die mRNS wird durch die Bindung weiterer Faktoren in mRNS-Proteinkomplexe (mRNP) verpackt, die sowohl eine Qualitätskontrolle der mRNS ermöglichen, als auch durch Interaktionen mit Exportkomplexen und der Kernpore den Transfer der Partikel ins Zytoplasma erleichtern (Jensen et al. 2003). Im Zytoplasma wird die in den mRNS-Partikeln enthaltene genetische Information in Proteine translatiert, während gleichzeitig die Qualität der mRNS/mRNP geprüft und die Menge an verfügbarer mRNS reguliert wird (Parker and Song 2004).

### 1.2.2 Modifikation durch Splicing

Bei Experimenten zur Transkription und Translation viraler Gene in eukaryontischen Zellen wurden RNS-Moleküle gefunden, die je nach ihrer Verteilung im Kern oder im Zytoplasma eine unterschiedliche Länge und Stabilität aufwiesen und bei denen bestimmte Sequenzbereiche innerhalb des Moleküls fehlen (Bachenheimer and Darnell 1975; Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). Später wurden auch eukaryontischen Gene gefunden, bei denen ein Teil der genetischen Information vor der Translation entfernt wurde. Dieser Vorgang, das Splicing, bezeichnet das Herausschneiden interner, nicht-codierender Sequenzbereiche (Introns) und das Zusammenfügen der verbleibenden codierenden Sequenzbereiche (Exons). Durch Ähnlichkeiten der Introns in ihrer Sequenz, der Struktur und der Mechanismen des Splicings können sie in mindestens vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden. In allen Organismen enthalten Transfer-RNS (tRNS) Introns, die in Bakterien ohne beteiligte Proteine von der tRNS selbst entfernt werden (self-splicing). In eukaryontischen Zellen werden tRNS-Introns durch drei verschiedene ATP-abhängige Enzyme gespleißt (Kuhnel et al. 1990; Abelson et al. 1998). Introns der Gruppe I (Westhof 2001; Haugen et al. 2005) und II (Michel et al. 1989; Lambowitz and Belfort 2003) werden intramolekular in zwei Transesterifikationsschritten, ohne die Beteiligung von Proteinen oder anderen Kofaktoren entfernt, wobei letztere eine lassoartige Struktur (Lariat) ausbilden (Peebles et al. 1993).

### 1.2.3 prä-mRNS Splicing

Die in der Sequenz von Introns eukaryontischer prä-mRNS gefundenen konservierten Bereiche wiesen auf einen gemeinsamen Splicing-Mechanismus in diesen Zellen hin (Padgett et al. 2003). Und obwohl diese Introns passgenau aus dem Transkript herausgeschnitten werden müssen, um Fehler im Leserahmen zu vermeiden, enthielten sie nur relativ kleine konservierte Bereiche, die zudem mehrfach in der Sequenz zu finden waren. Eine dieser konservierten Sequenzen, die 5'-Spleißstelle (5-SS), definiert den Anfang eines Introns, wobei sich die Konsensussequenz zwischen den Organismen leicht unterscheidet: /GURAG für Säugetiere und /GUAUGU für Hefen. Die Position der Verzweigungsstelle (branch site; BS) hängt von der Länge des Introns ab, liegt aber innerhalb von 20 – 100 Basenpaaren vor der 3'-Spleißstelle (3'-SS) und wird in Säugetieren durch die Konsensussequenz YURAY, in Hefen durch UACUAAC definiert. Die 3'-Spleißstelle markiert das Ende des Introns und trägt die Sequenzen YAG/ in Säugetieren und Hefen (/ bezeichnet die Grenze zwischen Exon und Intron; R = Purinbase; Y = Pyrimidinbase; Senapathy et al. 1990; Lopez and Séraphin 1999).



**Abbildung 1.1:** Schema der konservierten Sequenzen innerhalb der Introns von *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten. Das bei der Bildung des Lariats beteiligte Adenosin der Verzweigungsstelle ist rot gekennzeichnet.

nt = Nucleotide; Y = Pyrimidinbase; R = Purinbase

Durch *in vitro* Experimente, bzw. der Analyse der Zwischenprodukte und daran beteiligter Faktoren konnten die grundlegenden Mechanismen des Splicings formuliert werden (Hernandez and Keller 1983; Hardy et al. 1984). Die Faktoren der Splicing-Komplexe binden bereits während der Transkription an die entstehende prä-mRNS und leiten das Entfernen des Introns ein. Die Reaktion findet durch zwei Transesterifizierungen statt (Moore and Sharp 1993). Der erste Schritt besteht aus einem nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des konservierten Adenosins der Verzweigungsstelle auf die Phosphodiesterbindung des ersten Nucleotids der 5'-Spleißstelle.

Durch diese Reaktion wird das 5'-Exon abgetrennt und eine Lariatstruktur generiert. Im zweiten Schritt greift die 3'-Hydroxylgruppe des freien Exons aus dem ersten Schritt die Bindung des letzten Nukleotids der 3'-Spleißstelle an und fusioniert mit dem nachfolgenden Exon (Grabowski et al. 1984; Ruskin et al. 1984). Das freiwerdende Lariat wird im Zellkern hydrolysiert und die reife mRNA ins Zytoplasma transportiert (Arenas and Hurwitz 1987).

#### 1.2.4 Aufbau und Reaktionszyklus des Spliceosoms

Die Nukleinsäure-Proteinkomplexe im Zellkern, die das Ausschneiden des Introns und das Ligieren der Exons katalysieren, wurden zuerst anhand ihrer Sedimentation in Glyzeringradienten aufgetrennt und analysiert und als Spliceosom bezeichnet (Brody and Abelson 1985; Frendewey and Keller 1985). Durch die Reinigung und Analyse der verschiedenen Stufen des Spliceosoms konnten viele Splicing-Faktoren den einzelnen Schritten zugeordnet werden, bei denen insgesamt mehr als 200 verschiedene Proteine beteiligt sind (Bennett et al. 1992; Gozani et al. 1994; Jurica and Moore 2003). Das Spliceosom wird durch die aufeinander folgende Bindung mehrerer Unterkomplexe (U1, U2, U4, U5, U6) gebildet, die neben Proteinen auch kleine konservierte Ribonukleinsäuren enthalten und als snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles) bezeichnet werden (Krämer 2003). Die Nukleinsäuren der snRNPs besitzen zu den Spleißstellen des Introns komplementäre Sequenzen und führen durch Basenpaarung mit dem Intron zur Erkennung der korrekten Spleißstellen. Die Zusammenlagerung der Komplexe zum Spliceosom beginnt mit der ATP-abhängigen Interaktion des U1 snRNP mit der 5'-Spleißstelle des Introns, bei dem beide Ribonukleinsäuren über einen kleinen Bereich durch Basenpaarung verbunden sind. Dieser frühe Komplex E des Spliceosoms wird in der Hefe als „commitment complex“ (CC) bezeichnet (Seraphin and Rosbash 1989; Michaud and Reed 1991). In einem weiteren energieabhängigen Schritt wird der U2 snRNP an die Verzweigungsstelle des Introns gebunden. In der Basenpaarung der U2 snRNS mit der Intronsequenz bleibt das aktive Adenosin ungebunden und kann bei der ersten Transesterifikation den nukleophilen Angriff durchführen (Zhuang and Weiner 1989; Wu and Manley 1991). Dieser Komplex wird als prä-Spliceosom oder Komplex A bezeichnet. Durch die Interaktion mit dem bereits vorher gebildeten U4/U6.U5 tri-snRNP, in dem die U4 und U6 snRNS durch Basenpaarung miteinander verbunden sind, wird der Komplex B geformt (Pikielny and Rosbash 1986; Konarska and Sharp 1987). Bei der Aktivierung des Komplex B für die erste Splicing-Reaktion finden weitreichende strukturelle Umlagerungen der Untereinheiten statt (Kandels-Lewis and Séraphin 1993; Lesser and Guthrie 1993a). Durch Helikasen werden die Basenpaarungen der U4/U6 snRNS und der U1 snRNS mit dem 5'-Ende des Introns gelöst. Die U6 snRNS interagiert

dann über Basenpaarungen sowohl mit der U2 snRNS, als auch mit der freiwerdenden 5'-Spleißstelle (Madhani and Guthrie 1992), wobei die U1 snRNS für die weitere Funktion des Spliceosoms nicht mehr benötigt wird (Konforti et al. 1993; Crispino et al. 1994). Auch der U4 snRNP wird durch diese Umlagerungen destabilisiert und verlässt den Komplex. Durch die Interaktion der U6 snRNS mit der U2 snRNS werden die gebundenen 5'- und 3'-Spleißstellen des Introns in räumliche Nähe zueinander gebracht und bilden damit einen Teil des katalytischen Zentrums. Ein Proteinkomplex um den Splicing-Faktor Prp19 (nineteen complex; NTC) bindet an das aktivierte Spliceosom, nachdem die snRNPs U1 und U4 den aktivierten Komplex B\* verlassen haben und stabilisiert sowohl die Bindung des 3'-Endes der U6 snRNS an das Intron, als auch die Bindung der U5 snRNS an die 5'-Spleißstelle (Chan et al. 2003; Chan and Cheng 2005).

Mit dem Verlassen der Faktoren für den ersten Splicing-Schritt binden Faktoren an das Spliceosom, die für die zweite Reaktion benötigt werden und formen den Komplex C. Nachdem im zweiten Splicing-Schritt beide Exons fusioniert sind, verlässt die mRNA den post-spliceosomalen Komplex. Die verbleibenden snRNPs dissoziieren und werden für eine neue Splicing-Reaktion vorbereitet (Brow 2002). Dieser Prozess wird durch den Splicing-Faktor Prp24 vermittelt, beginnt mit der Basenpaarung der U4 und U6 snRNS im neu entstehenden U4/U6 di-snRNP und endet mit der Interaktion des U5 snRNPs als neuer U4/U6.U5 tri-snRNP (Rader and Guthrie 2002; Raghunathan and Guthrie 1998).

### 1.2.5 Regulation des Splicings in der Meiose

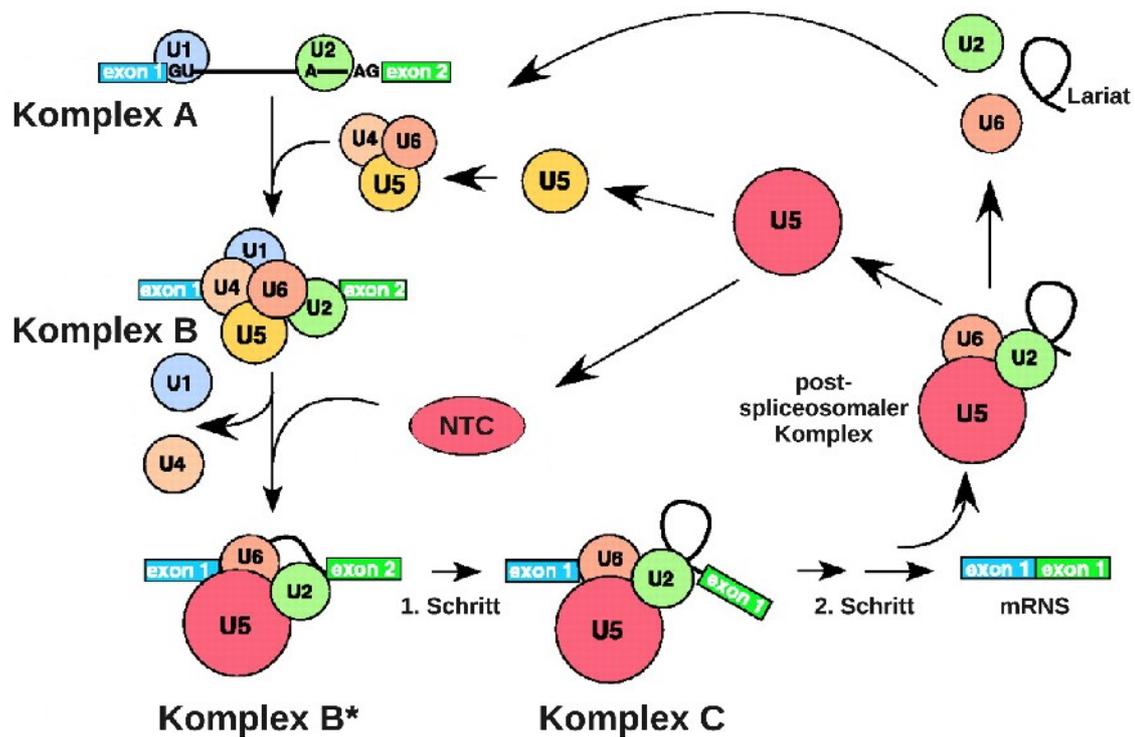
Die sexuelle Fortpflanzung erlaubt es eukaryontischen Organismen ihre Erbanlagen zu kombinieren. Dafür werden in der Meiose die Chromosomen aneinander gelagert, einzelne Abschnitte durch homologe Rekombination ausgetauscht und die Schwesterchromatide wieder getrennt. So entstehen haploide Zellen mit leicht unterschiedlichem Erbgut (Baker et al. 1976; von Wettstein et al. 1984). Die meisten beteiligten Gene in *S. cerevisiae* werden dabei in der Zelle durch die Kontrolle der Transkription durch Ime1 und Ime2 reguliert (Kassir et al. 1988; Smith and Mitchell 1989). Andere Gene werden in der Zelle erst nach der Transkription reguliert. Mer1 ist ein Splicing-Faktor der mit dem U1 snRNP interagiert und eine konservierte Sequenz innerhalb der Introns von *MER2*, *MER3* und *AMA1* erkennt (Spingola and Ares 2000). Die Expression von *MER1* wird durch meiosespezifische Transkriptionsfaktoren reguliert, während *MER2*, *MER3* und *AMA1* konstitutiv translatiert werden. Ohne Mer1 werden die Transkripte der anderen Gene nicht in den Splicing-Prozess eingebunden, sondern aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma abgebaut (Scherrer and Spingola 2006). Die Funktion von Mer1 im Splicing ist abhängig von Nam8, Ist3, Bud13 und Snu56

und überlappt mit dem prä-mRNS Export und Retentionssystem RES (Spingola et al. 2000; Scherrer et al. 2006; Balzer and Henry 2008)

### 1.2.6 prä-mRNS Retention und NMD

Die Expression von Genen ist ein geordneter Prozess, der zeitlich und auch räumlich streng kontrolliert werden muss. In eukaryontischen Zellen wird das RNS-Transkript im Zellkern mehrfach prozessiert, bevor es ins Zytoplasma exportiert wird. Durch Splicing werden dabei Introns aus der prä-mRNS entfernt, die sonst durch Stopcodons oder der Verschiebung des Leserasters zu einer fehlerhaften Translation führen. Deshalb ist eine Kontrolle des Exports nötig, die ungespleißte prä-mRNS im Kern zurückhält. Die Zellen haben dafür ein System entwickelt, das Ribonukleinsäuren mit vorzeitigen Stopcodons erkennen und abbauen kann. Dieses System verhindert damit auch die Anreicherung von prä-mRNS mit Translationsstops im Intron, die vor dem Splicing ins Zytoplasma transportiert wurden (He et al. 1993). Dieser Prozess wird als NMD (nonsense mediated decay) bezeichnet und ist von der Hefe bis zum Menschen erhalten geblieben. Die Zelle muss dabei zwischen ungespleißter prä-mRNS, der gespleißten Form und mRNA ohne Intron unterscheiden können. Die Sequenzen der 5'-Spleißstelle und der Verzweigungsstelle des Introns sind für die Erkennung der Introns sowohl für das Splicing, als auch die Kontrolle des Exports ausschlaggebend (Legrain and Rosbash 1989).

Da mehrere Faktoren, die sehr früh am Aufbau des Spliceosoms beteiligt sind, auch die Exportkontrolle beeinflussen, wird angenommen, dass die Erkennung der Konsensussequenzen des Introns direkt als Signal zur Verbleib der prä-mRNS im Zellkern dient. In neueren Arbeiten wurden weitere Faktoren der Exportkontrolle ungespleißter RNS charakterisiert und der Prozess als prä-mRNS-Retention und Export-System (RES) bezeichnet. Die beteiligten Proteine sind sowohl mit Splicing-Komponenten verbunden (Dziembowski et al. 2004), als auch an der Kernpore lokalisiert (Palancade et al. 2005).



**Abbildung 1.2:** Schema des spliceosomalen Reaktionszyklus. Die Interaktionen der einzelnen Unterkomplexe des Spliceosoms sind in allen Organismen hoch konserviert. Das Schema ist eine Adaption aus Makarov et al. (2002) und wird im Text näher erläutert.

### 1.3 Ubiquitin und das Ubiquitin-Proteasomsystem

Ubiquitin wurde in den frühen 70'er Jahren als Signal zum Abbau intrazellulärer Proteine entdeckt. Der Multienzymkomplex, der die Hydrolyse der Ubiquitin-markierten Proteine katalysiert, wurde aufgrund seines Molekulargewichts als 26S Proteasom bezeichnet. Der Abbau markierter Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist in zwei unterschiedliche, aufeinander folgende Schritte unterteilt (Ciechanover 2005). Im ersten Schritt wird Ubiquitin unter ATP-Verbrauch aktiviert, auf Proteine transferiert, die eine Spezifität für unterschiedliche Substrate vermitteln und schließlich auf diese Substrate übertragen. Die an dieser Kaskade beteiligten Proteine werden nach ihrer Funktion für die Aktivierung, Konjugation oder dem Transfer auf Zielproteine als E1, E2 oder E3 klassifiziert. Das Verknüpfen mehrerer Ubiquitineinheiten untereinander führt zu Ubiquitinketten, die durch Faktoren der Klasse E4 stabilisiert und verlängert werden können (Hoppe 2005). Die Aktivierung von Ubiquitin erfolgt durch die Hydrolyse von ATP und der Adenylierung der Carboxylgruppe des C-terminalen Glyzins. Diese energiereiche Bindung wird auf die

freie SH-Gruppe eines Cysteins im katalytischen Zentrum des E1 übertragen und bildet einen energiereichen Thioester. Während das E1 das aktivierte Ubiquitin auf ein Cystein des E2-Enzyms überträgt, aktiviert es bereits die nächste Ubiquitineinheit. Durch den Transfer des Ubiquitins auf E2 sinkt dessen Affinität für E1 und kann mit E3 interagieren. Dieses besitzt für das beladene E2 eine höhere Affinität als für unbeladenes, so dass das Ubiquitin entlang dieser Kaskade weitergegeben werden kann (Kerscher et al. 2006). Die Spezifität der Ubiquitinylierung wird durch die unterschiedliche Zahl der beteiligten Enzymklassen erreicht. Ein aktivierendes Enzym (Uba1) überträgt Ubiquitin auf mehrere konjugierende Enzyme, die über eine wachsende Zahl an Ubiquitin-Ligasen die Zielproteine modifizieren. Die Familie der Ubiquitin-Ligasen kann anhand ihrer Beteiligung an der enzymatischen Kaskade in zwei verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Hatakeyama and Nakayama 2003). Die eine Gruppe enthält eine RING-Domäne (Really Interesting New Gene) und bindet Ubiquitin-beladenes E2 parallel zum Substrat. Dabei wird ein Lysinrest des Substrats in räumliche Nähe zum Thioester des E2-Komplexes gebracht und über eine Isopeptidbindung mit Ubiquitin verknüpft. U-box-Proteine, die eine ähnliche Struktur wie RING-Ligasen besitzen, katalysieren den Ubiquitintransfer vom E2 auf das Zielprotein auf ähnliche Weise. Die zweite Gruppe der Ubiquitin-Ligasen beinhalten eine HECT-Domäne (Homologous to E6-associated protein C Terminus) und übernehmen das aktivierte Ubiquitin vom E2 durch einen eigenen Thioester, bevor sie das Ubiquitin an ein Lysin des Substrats binden. Ubiquitin-Ligasen erkennen ihre Substrate anhand bestimmter Merkmale. Eines davon wird als „N-end-rule“ bezeichnet, bei dem die Aminosäure am N-Terminus des Proteins über dessen Halbwertszeit entscheidet (Mogk et al. 2007). Phosphorylierung und Hydroxylierung gelten ebenfalls als Signale für die Modifikation mit Ubiquitin, während die Acetylierung von Lysinen des Substrats dessen Ubiquitinylierung verhindern kann (Sadoul et al. 2008). Später zeigte sich, dass die Funktion der Markierung durch Ubiquitin nicht nur auf den Proteinabbau beschränkt ist, sondern auch andere wichtige zelluläre Mechanismen reguliert. So können, wie bereits erwähnt, alle sieben Lysine des Ubiquitins zur Ausbildung von Ubiquitinketten genutzt werden, wobei die Art der Verknüpfung der Einheiten untereinander einen Einfluss auf die Funktion der Ubiquitinkette hat (Peng et al. 2003). Verknüpfungen über Lysin 48 der Ubiquitinsequenz gelten als Signal für den proteasomalen Abbau des modifizierten Proteins. Ubiquitinketten über Lysin 63 führen jedoch zu einer Änderung der Proteinfunktion, jedoch nicht zu dessen Abbau. Die Modifikation durch ein einzelnes Ubiquitin (Monoubiquitinylierung) oder einzelner Einheiten an mehreren Lysinresten eines Proteins (Multiubiquitinylierung) gelten ebenfalls nicht als Abbausignal (Sigismund et al. 2004), sondern können die Internalisierung von Membranrezeptoren induzieren und die DNA-Reparatur beeinflussen (Miranda and Sorkin 2007; Lee and Myung 2008). Die Expression der Faktoren des Ubiquitinsystems wird

von Hormonen beeinflusst (Marinovic et al. 2007), und sowohl die Aktivität der E1-, E2- und E3-Enzyme, als auch deren Verteilung in der Zelle kann durch Phosphorylierung reguliert werden (Kong and Chock 1992; Gao and Karin 2005). Die Zahl der Gene, die an der enzymatischen Kaskade zur kovalenten Modifikation mit Ubiquitin beteiligt sind, unterscheidet sich nicht wesentlich von der für Phosphorylierung und Dephosphorylierung benötigten Faktoren, so dass die Modifikation durch Ubiquitin deshalb als ein zusätzlicher grundlegender Mechanismus bei der Regulation zellulärer Prozesse gilt.

#### 1.4 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Im Laufe der Zeit wurden mehrere Ubiquitin-ähnliche Proteine identifiziert, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die Proteine erste Gruppe enthalten in ihrer Aminosäuresequenz eine oder mehrere Domänen, die der Sequenz von Ubiquitin ähneln. Diese Ubiquitin-Domänenproteine (UDP) werden nicht kovalent mit anderen Proteinen verknüpft. Einige UDPs enthalten zusätzlich sogenannte Ubiquitin-Interaktionsmotive (UIM) oder Ubiquitin-assoziierte Motive (UBA), mit denen sie Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine binden. Diese Interaktionsmotive besitzen unterschiedliche Affinitäten gegenüber einzelner Ubiquitin und Ubiquitinketten und ermöglichen den gerichteten Transport ubiquitinylierter Proteine zum Proteasom, wobei die Affinität zu Ubiquitinketten in Richtung des Proteasoms zunimmt (Elsasser et al. 2002; Schubert et al. 2004). Weitere Funktionen von UDPs im Ubiquitin-Proteasomsystem wurden bei der spezifischen Deubiquitinierung der Substrate durch Ubc6 und der Interaktion mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen festgestellt (Wyndham et al. 1999; Martinez-Noel et al. 1999). Andere UDPs sind in der DNA-Reparatur, der Organisation des Spindelpolkörpers und der Kontrolle des Zellzyklus involviert (Watkins et al. 1993; Biggins et al. 1996; Díaz-Martínez et al. 2006).

Neben Ubiquitin konnten weitere Faktoren identifiziert werden, die auf ähnliche Weise an der Modifikation von Proteinen beteiligt sind und daher als Ubiquitin-ähnliche Modifikatoren (ULM, ubiquitin like modifier) bezeichnet wurden. Die Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine wird weniger durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit Ubiquitin bestimmt, sondern durch die gemeinsame Tertiärstruktur und einem C-terminalen Diglyzinmotiv, das über eine Isopeptidbindung mit Lysinresten des Zielproteins verknüpft wird. Die kovalente Modifikation der jeweiligen Zielproteine verläuft über eine Reihe ähnlicher enzymatischer Reaktionen für die Aktivierung und Konjugation.

#### 1.4.1 *Interferon-Stimulated Gene-15*

Die Expression von ISG15 in höheren Eukaryonten wurde 1979 beschrieben und dabei festgestellt, dass diese durch Interferone des Typs I (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) induziert werden konnte (Farrell et al. 1979; Korant et al. 1984). ISG15 besteht aus zwei Ubiquitin-ähnlichen Domänen und besitzt ein C-terminales Diglyzinmotiv, das durch die Prozessierung des prä-Proteins entsteht (Ritchie and Zhang 2004). Die enzymatische Kaskade, die die Konjugation von ISG15 auf seine Substrate katalysiert, überlappt teilweise mit der von Ubiquitin. Sowohl das E1 von Ubiquitin (UBA1) als auch das E1 von ISG15 (UBE1L) übertragen ihr aktiviertes Molekül auf das gleiche konjugierende Enzym UBCH8 (Loeb and Haas 1992). Zwei der ISG15-Ligasen, ein RING-E3 und eine HECT-Ligase, akzeptieren neben ISG15 auch Ubiquitin als Signalmolekül (Zou and Zhang 2006; Dastur et al. 2006). Die Funktion von ISG15 ist mit den Mechanismen der zellulären Immunantwort verbunden, wobei auch eine Rolle des Proteins bei der Regulation des Wachstums und der Differenzierung der Zellen vermutet wird.

#### 1.4.2 *Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated-8*

NEDD8 wurde 1990 als eines der Gene identifiziert, die in neuronalen Vorläuferzellen bei der Entwicklung des Gehirns von Mäusen herunter reguliert wurde (Kumar et al. 1993). Das 9 kDa große Protein wurde in vielen Zelllinien und Geweben entdeckt, in denen es frei oder an andere Proteine gebunden auftrat (Kamitani et al. 1997). Das homologe Protein in *S. cerevisiae* wird als Rub1 (related to ubiquitin) bezeichnet (Liakopoulos et al. 1998). NEDD8 wird durch ein heterodimeres E1, bestehend aus APPBP1 und UBA3, aktiviert und über das konjugierende Enzym UBC12 auf eine begrenzte Zahl an Substraten, die Familie der Cullin-Proteine, übertragen. Cullin-Proteine bilden das Gerüst für Ubiquitin-Ligasen in Multiproteinkomplexen wie SCF (SKP1-CUL1-F-box), und interagieren mit RING-Finger Proteinen um deren konjugierende Enzyme zu rekrutieren. Neddylation ist ein Mechanismus zur Regulation von Ubiquitin-Ligasekomplexen, die oft eine Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus besitzen. Neuere Untersuchungen zeigen aber auch, dass die Konjugation mit NEDD8 zu einem Abbau der Proteine durch das Proteasom führt (Tanaka et al. 2003; Tanji et al. 2005).

### 1.4.3 *Small Ubiquitin-Related Modifier*

Die Funktion von SUMO beim Transport von Proteinen und Ribonukleinkomplexen durch die Kernpore wurde 1996 entdeckt (Matunis et al. 1996; Mahajan et al. 1997). Während in der Hefe nur ein SUMO (Smt3) bekannt ist, werden in Wirbeltieren drei paraloge Proteine exprimiert (Müller et al. 2001). Der C-Terminus von SUMO wird durch Proteolyse verkürzt, so dass die Aktivierung durch den heterodimeren E1-Komplex SAE1/SAE2 (Aos1/Uba2 in Hefe) am freigelegten C-terminalen Glyzinrest stattfinden kann (Hay 2005). Das aktivierte Protein wird vom E1-Enzymkomplex auf das SUMO-konjugierende Enzym UBC9 übertragen, das seinerseits das Lysin in der Konsensussequenz  $\Psi$ -K-x-E des Substrats mit SUMO modifiziert (Johnson and Hochstrasser 1997; Lin et al. 2002). Für dieses System wurden auch Proteine gefunden, die den E3-Ligasen des Ubiquitinsystems ähneln und die Spezifität der Sumoylierung erhöhen (Pichler et al. 2002; Schmidt and Müller 2003; Kagey et al. 2003). Zu den Substraten der Modifikation mit SUMO zählen Signalmoleküle und Proteine der Kern- und Plasmamembran (Vertegaal et al. 2004; Rosas-Acosta et al. 2005), sowie Transkriptionsfaktoren und Proteine, die an der Umstrukturierung von Chromatin beteiligt sind (Eaton and Sealy 2003; Kim et al. 2005). Die Sumoylierung von Proteinen wirkt sich auch auf deren Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomsystem aus.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ist ein Protein, das mit im Zytoplasma mit Transkriptionsfaktoren interagiert und deren Transport in den Zellkern verhindert. Abhängig von externen Signalen wird  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphoryliert, ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut. Im Gegensatz dazu ist sumoyliertes  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nicht davon betroffen (Desterro et al. 1998). Auch der proteasomale Abbau von p53 kann durch Sumoylierung verhindert werden (Gostissa et al. 1999).

### 1.4.4 *Ubiquitin-Fold Modifier-1*

UFM1 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das in allen Gewebetypen höherer Eukaryonten exprimiert wird. Vor seiner Aktivierung durch UBA5 wird es ebenfalls am C-Terminus prozessiert. Danach überträgt UFC1 als konjugierendes Enzym das aktivierte Protein auf seine Substrate (Komatsu et al. 2004). Es wird vermutet, dass UFM1 bei der Antwort der Zelle auf ungefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum ( $\text{UPR}^{\text{ER}}$ ) und bei der Entwicklung von Diabetes Typ II eine Rolle spielt (Azfer et al. 2006; Lu et al. 2008).

#### 1.4.5 Atg8 und Atg12

Autophagie ist ein Prozess, durch den die Zelle große Bestandteile des Zytoplasmas mit einer Doppelmembran umschließt und deren Inhalt nach der Fusion mit Lysosomen hydrolysiert. Atg12 wurde als Ubiquitin-ähnliches Protein entdeckt, das über seinen C-Terminus kovalent mit einem weiteren Protein für Autophagie (Atg5) verknüpft wird (Mizushima et al. 1998; Klionsky and Ohsumi 1999). Die Übertragung von Atg12 verläuft, ähnlich wie bei Ubiquitin, über ein aktivierendes (Atg7) und ein konjugierendes Enzym (Atg10). Der Atg12-Atg5-Komplex und das Protein Atg16, das über eine „coiled-coil“ Region Homooligomere bilden kann, formen einen multimeren, etwa 530 kDa großen Komplex (Mizushima et al. 1999). Parallel zu Atg12 wurde mit Atg8 ein weiteres ULM beschrieben, das zunächst am C-Terminus von Atg4 prozessiert wird, bevor es durch Atg7 (E1) aktiviert und über Atg3 (E2) auf Phosphatidylethanolamin (PE) intrazellulärer Membranen übertragen wird (Ichimura et al. 2000). Atg12 und Atg8 sind damit an der Fusion von Vesikeln der Autophagozytose mit dem Lysosom oder der Vakuole beteiligt.

#### 1.4.6 Ubiquitin-Related Modifier-1

Im Jahr 2000 wurde mit Urm1 ein weiteres Ubiquitin-ähnliches Protein identifiziert. Die Aminosäuresequenz von Urm1 besitzt eine Homologie von etwa 20% zu den prokaryontischen Proteinen ThiS, einem Faktor der Biosynthese von Thiamin, und Moad, einer kleinen Untereinheit der Molybdopterin synthase (Furukawa et al. 2000). Urm1 wird in *S. cerevisiae* über Uba4 aktiviert und auf das bisher einzige gefundene Substrat Ahp1 übertragen, das an der Regulation der zellulären Antwort auf oxidativen Stress beteiligt ist (Goehring et al. 2003). Bisher wurden aber weder konjugierende Enzyme noch Urm1-Ligasen gefunden. In neueren Studien wurde jedoch eine andere Funktion für Urm1 entdeckt, die mit der beschriebenen Ähnlichkeit zu ThiS und Moad korreliert. Dabei wird der C-Terminus von Urm1 nach der Aktivierung durch Uba4 in ein Thiocarboxylat umgewandelt und über eine Disulfidbrücke an das aktive Cystein in Uba4 gebunden (Schmitz et al. 2008). Urm1 wird dadurch eine Rolle als Überträger von Schwefel bei der Modifikation von Transfer-Ribonukleinsäuren zugeschrieben (Schlieker et al. 2008; Pedrioli et al. 2008).

#### 1.4.7 Ubiquitin-Like Protein-5 / Homologous to Ubiquitin 1

Hub1 wurde 1997 als kleiner uncharakterisierter Leserahmen (YNR032C-A) in *S. cerevisiae* beschrieben, der nur eine geringe Ähnlichkeit (22 % identische Aminosäuren) mit Ubiquitin aufwies, jedoch über 65 % Identität mit einem ebenfalls noch uncharakterisierten Leserahmen aus dem Genom der Maus (Andrade et al. 1997). Beide Gene enthalten kein C-terminales Diglyzinmotiv, sondern zwei konservierte, aufeinander folgende Tyrosine, die in das letzte  $\beta$ -Faltblatt der Ubiquitin-ähnlichen Struktur eingebettet sind (Ramelot et al. 2003; McNally et al. 2003). In *S. cerevisiae* wurde für Hub1 eine kovalente Bindung an seine Substrate Hbt1 und Sph1 postuliert, da eine verstärkte Interaktion dieser Proteine mit C-terminal bis auf das Dityrosinmotiv verkürztem Hub1 beobachtet wurde. Ein Defekt im polarisierten Wachstum der Zellen in Hub1-Deletionsstämmen konnte durch die Expression der homologen Proteine aus der Spalthefe und dem Menschen aufgehoben werden (Dittmar et al. 2002). Durch die Charakterisierung von SDS-resistenten Proteinkomplexen mit Hub1, die sich ohne enzymatische Reaktion und ATP als Energieträger formen, wurde das Modell der kovalenten Modifikation von Proteinen durch Hub1 abgelehnt (Lüders et al. 2003). In *S. pombe* und höheren Eukaryonten ist Hub1/UBL5 essentiell, wobei durch thermosensitive Mutanten eine Funktion für Hub1 im prä-mRNS-Splicing beschrieben wurde (Yashiroda and Tanaka 2004). Auch die Identifizierung des Splicing-Faktors Snu66 als Interaktionspartner, dessen Lokalisation im Zellkern von der Bindung an Hub1 abhängt, weist in diese Richtung (Wilkinson et al. 2004). In *C. elegans* ist UBL-5 an der Antwort der Zelle auf mitochondrialen Stress durch ungefaltete Proteine (UPR<sup>MT</sup>) beteiligt, und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor DVE-1 (Benedetti et al. 2006; Haynes et al. 2007). In israelischen Sandratten (*Psammomys obesus*) wurde eine Korrelation der Expression dieses Gens (Beacon) mit Zunahme des Körpergewichts, bzw. der Tendenz zu Diabetes, und die Interaktion mit einer Cdc2-ähnlichen Kinase (Clk4) beobachtet (Collier et al. 2000), wobei sich genetische Abweichungen in der nicht-kodierenden Gensequenz auch beim Menschen in Störungen bei der Regulation des Energiestoffwechsels beobachten lassen (Bozaoglu et al. 2006). Anhand der Expression von Ubl5 in Hormon-sekretierenden Neuronen und dem inhibitorischen Effekt von extrazellulärem Ubl5 auf die Hormonsekretion und Proliferation kultivierter Zellen, wird für Ubl5 auch eine Funktion als Hormon diskutiert (Ziolkowska et al. 2004; Bernstein et al. 2008).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

In verschiedenen Organismen wurden für Hub1/Ubl5 bisher jeweils unterschiedliche Funktionen gefunden. Während es in der Hefe das polarisierte Wachstum der Zelle und das Splicing mehrerer Transkripte beeinflusst, wird es in Nematoden in der zellulären Reaktion auf mitochondrialen Stress durch ungefaltete Proteine benötigt. In Menschen und Nagern wurde ein Einfluss von Ubl5 (Beacon) auf die Regulation des Körpergewichts beobachtet. Für diese Vielfalt an Funktionen ist Hub1/Ubl5 in den verschiedenen Organismen extrem stark konserviert. Da Hub1, im Gegensatz zu anderen Modellorganismen, in *S. cerevisiae* nicht essentiell ist, sollten durch die Analyse genetischer Interaktionen weitere zelluläre Prozesse charakterisiert werden, an denen Hub1 beteiligt ist. Die kovalente Modifikation von Substraten durch Hub1 ist umstritten und es gibt widersprüchliche Aussagen über die Relevanz des C-terminus von Hub1 auf seine Funktion. Da die räumliche Struktur von Hub1 bekannt ist, es aber keine Information zu funktionalen Aminosäureresten gibt, sollten durch eine Mutagenese von Hub1 Bereiche für eventuelle Interaktionen charakterisiert werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Genetische Interaktion von Hub1 mit einer Prp8-Mutante

#### 2.1.1 Suche nach Genen mit synthetischer Letalität

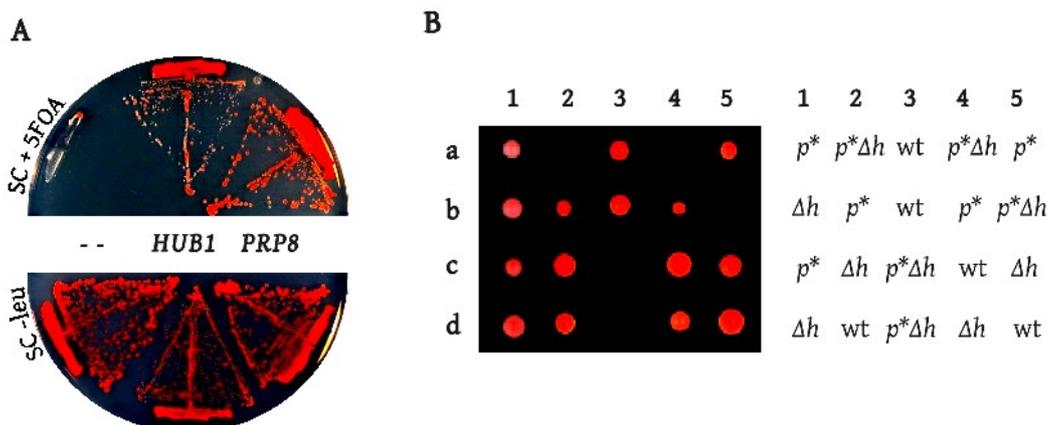
Im Gegensatz zu anderen Organismen ist *HUB1* in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) nicht essentiell. Selbst extreme äußere Bedingungen, wie pH-Stress, osmotischer Stress oder erhöhte Temperatur, zeigen kaum Defekte im Wachstum. Ein signifikanter Wachstumsphänotyp wäre jedoch bei der Suche nach den zellulären Funktionen von Hub1 hilfreich. Zusätzlicher Wachstumsstress kann auch durch die Deletion weiterer nicht-essentieller Gene ausgeübt werden. Dabei wird die Fähigkeit der Bäckerhefe genutzt, im diploiden Wachstumszyklus heterozygote Deletionen durch ein Wildtyp-Allel zu kompensieren. Durch Sporulation wird die Hefe in den haploiden Zyklus versetzt und die veränderten Genorte nach den Mendelschen Regeln auf die Tochterzellen verteilt. Führen dabei Kombinationen entfernter Gene zu einem Wachstumsdefekt, gilt dies als genetische Interaktion. Werden in der Analyse der Genotypen keine lebensfähigen Nachkommen der kombinierten Deletionen gefunden, spricht man auch von synthetischer Letalität. Das Muster der genetischen Interaktionen einer Deletionsmutante liefert dadurch Hinweise auf die Funktion des entfernten Gens.

Mehrere potentielle genetische Interaktionen mit Hub1, die nach einer automatisierten Suche in einer Bibliothek nicht essentieller Deletionsmutanten gefunden wurden (Tong et al. 2001), konnten durch manuelle Analyse der Sporen nicht bestätigt werden. Um die Auswahl der möglichen Interaktoren auch auf essentielle Gene zu erweitern, wurde eine klassische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat durchgeführt (Amberg et al. 2006a) und die überlebenden Zellen auf synthetische Letalität bei  $\Delta hub1$  getestet. Die genomischen Sequenzen für *HUB1* und *ADE3* wurden im Hefestamm yMD039 entfernt, sind aber als Kopien auf dem Plasmid pMD004 vorhanden. Verlieren die Zellen bei der Teilung das Plasmid, führt das zum Entfärben der sonst roten Zellen. Dieses System wird in Bender and Pringle (1991) genauer beschrieben. Bei der Mutagenese dieses Stammes wurde eine Tötungsrate von etwa 33% erreicht und ca. 85000 Einzelkolonien auf ihre rote oder weiße Färbung untersucht. Kolonien, die keine Sektoren weißer Zellen besaßen, waren auf den Erhalt des Plasmids angewiesen und deuteten auf eine mögliche genetische Interaktion hin. Etwa 3200 nicht-sektorierende Kolonien wurden einem zweiten Durchgang der Farbanalyse unterzogen und davon 370 durchgehend rote Kolonien auf ihre Fähigkeit geprüft, die Selektion gegen pMD004 durch 5-FOA (Boeke et al. 1984) zu überleben. 155 Stämme zeigten synthetische Letalität beim

Verlust des Plasmids, doch nur bei dem Stamm 13-115 konnte eine unabhängige Kopie von *HUB1* (pGD131) diesen Phänotyp aufheben (Abbildung 2.1-A).

Nach der Transformation dieses Stammes mit Vektoren einer Bibliothek genomischer Fragmente der Hefe (Goodson et al. 1996) wurden etwa 5000 Kolonien auf ihr Überleben auf 5-FOA geprüft. Neben DNS-Fragmenten mit *HUB1* wurden drei Plasmide isoliert, die den genomischen Bereich von *PRP8* (Chromosom VIII: 428220-437550) enthielten und den synthetisch letalen Phänotyp kompensierten (Abbildung 2.1-A).

Der Hefestamm 13-115 wurde zwei mal mit dem Wildtypstamm zurück gekreuzt. Bei der Sporulation des diploiden Hefestamms yMD330 blieb der synthetisch letale Phänotyp erhalten und wurde nach den Mendelschen Regeln vererbt (Abbildung 2.1-B). Damit kann eine Kombination mehrerer mutierter Gene ausgeschlossen und die synthetische Letalität dieses Stammes, neben  $\Delta hub1$ , auf den Funktionsverlust eines einzelnen Gens zurück geführt werden.



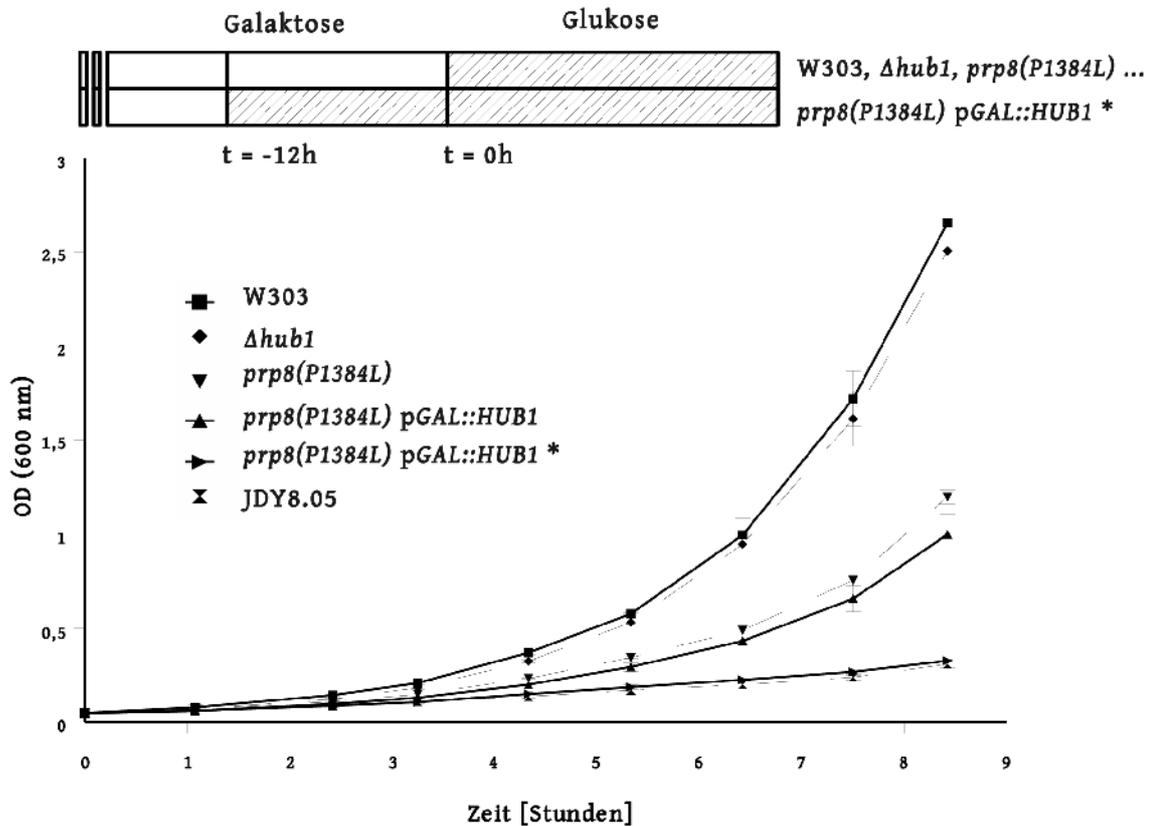
**Abbildung 2.1:** Synthetische Letalität von  $\Delta hub1$  und einer Mutante von *PRP8*. **A)** Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps auf 5-FOA-Medium durch Wildtypkopien von *HUB1* (pGD131) oder *PRP8* (pMD029), aber nicht durch einen leeren Vektor (pRS415). **B)** Wachstum der Kolonien nach Tetradenanalyse des Stamms yMD330. Untersuchte Asci (1-5) und der enthaltenen Sporen (a-d) mit den Genotypen: wt = Wildtyp,  $p^*$  = *prp8*(P1384) und  $\Delta h$  =  $\Delta hub1$ .

### 2.1.2 Charakterisierung der *Prp8*-Mutante

Die Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps durch *PRP8* unter eigenem Promotor, wies auf eine Mutation der genomischen Kopie hin, die aber keine essentielle Funktion des Gens betraf. Eine schrittweise Sequenzierung des genomischen Bereichs von *PRP8* im Stamm 13-115 ergab einen Austausch von Cytidin zu Thymin an der Position 4151 nach dem Startcodon, die bei



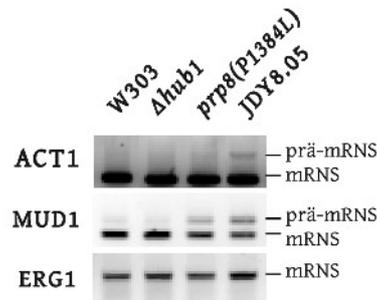
von Hub1 etwa 12 Stunden vor der Messung durch Glukosemedium unterbrochen, wuchsen diese Zellen signifikant schlechter. Die Wachstumsrate ähnelte Zellen mit bekanntem Wachstumsdefekt durch das Abschalten der Expression von Prp8 (JDY8.05).



**Abbildung 2.3:** Wachstumskurve verschiedener Stämme in Flüssigmedium bei 30°C. Umsetzen der Kulturen von Galaktose- in Glukosemedium zum Zeitpunkt t = 0, bei zusätzlicher 12-stündiger Vorinkubation des Stamms yMD355 ( $prp8(P1384L) pGAL::HUB1$ ) in Glukosemedium.

Da eine Mutation des integralen Splicing-Faktors Prp8 gefunden wurde, die zudem mit Hub1 genetisch interagiert, wurde ein verstärkter Defekt beim Spleißen von prä-mRNS vermutet. In Stämmen yGD141 und yMD348 wurde die Anreicherung ungespleißter prä-mRNS durch die Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten aus revers transkribierter RNS (RT-PCR) geprüft. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass sie ein Intron in der Gensequenz einschlossen, und sich die Banden der ungespleißten (prä-mRNS) und der gespleißten Form (mRNS) durch die Länge des Introns unterschieden. Für *ACT1*, einem Reporter zur Detektion genereller Splicing-Defekte, konnte weder bei  $\Delta hub1$  noch bei  $prp8(P1384L)$  eine Akkumulation der ungespleißten RNS-Form gezeigt werden, die mit dem Kontrollstamm JDY8.05 vergleichbar war (Abbildung 2.4). Bei

der Analyse weiterer Gene wurde jedoch für *MUD1*, einem Faktor des U1-snRNPs, eine Anreicherung der ungespleißten prä-mRNS-Form in Zellen mit mutiertem Prp8 festgestellt.



**Abbildung 2.4:** Splicing-Defekt von *prp8(P1384L)* bei *MUD1*-prä-mRNS. Gelelektrophorese der RT-PCR aus Hefe-RNS. Die Banden von *ACT1* (oMD177/178) und *MUD1* (oMD260/261) verschieben sich bei nicht entfernten Introns. *ERG1* (oLJ13/14) wurde als Kontrolle der Reaktion gewählt.

## 2.2 Interaktion mit dem Splicing-Faktor Snu66

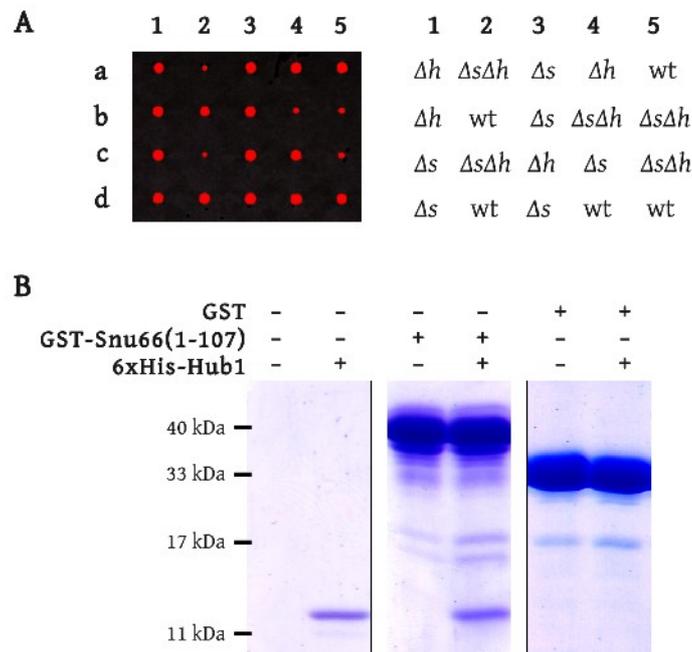
### 2.2.1 Interaktion von *Hub1* und *Snu66*

In bereits veröffentlichten Experimenten wurde gezeigt, dass *Hub1* und dessen homologe Proteine aus der Spaltheefe und dem Menschen mit dem Splicing-Faktor *Snu66*, bzw. dessen Homologen interagiert (Wilkinson et al. 2004). In den folgenden Experimenten wurde die Interaktion bei der Faktoren weiter charakterisiert.

Nach der Tetradenanalyse des diploiden Hefestamms yMD149, wuchsen die haploiden Kolonien  $\Delta$ *snu66*  $\Delta$ *hub1* langsamer als der Wildtyp oder Zellen mit nur einer Deletion (Abbildung 2.5-A). Durch die Analyse der Sporen weiterer Hefestämme mit unterschiedlicher genetischer Basis (DF5, BY4743) konnte dieser Effekt bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In Flüssigmedium wurde jedoch keine verringerte Teilungsrate beobachtet und Kolonien aus einzeln auf Platten gelegten vegetativen Zellen unterschieden sich nicht in ihrer Größe. Die genetische Interaktion von  $\Delta$ *hub1* und  $\Delta$ *snu66* zeigte sich daher als Defekt in der Sporenkeimung und wurde aus technischen Gründen nicht weiter beobachtet.

Wie ebenfalls in Wilkinson et al. (2004) für die Spaltheefe berichtet, genügt der N-terminale Bereich von *spSnu66* für die Bindung von *spHub1*. Für den folgenden Versuch wurde ein Fusionsprotein aus GST und den N-terminalen 107 Aminosäuren von *Snu66* aus *S. cerevisiae* bakteriell expriert und aufgereinigt. Parallel dazu wurde *Hub1* durch einen Hexahistidin-Affinitätsmarker ge-

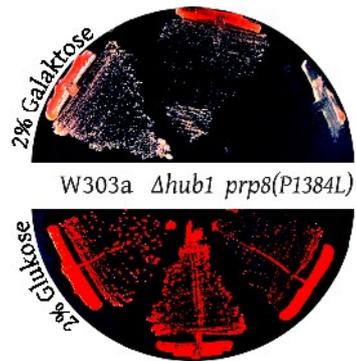
reinholt. Durch die Bindung von Hub1 und dem Snu66-Fusionskonstrukt konnte die direkte Interaktion beider Proteine *in vitro* für die Bäckerhefe bestätigt werden (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5:** Genetische und physikalische Interaktion von Hub1 und Snu66. **A)** Koloniewachstum nach Tetradenanalyse von yMD149. Untersuchte Asci (1-5) und deren Sporen (a-d) mit den Genotypen: wt = Wildtyp,  $\Delta s = \Delta snu66$  und  $\Delta h = \Delta hub1$ . **B)** *in vitro* Bindungsstudie von gereinigtem Hub1 und einem N-terminalen Fragment von Snu66. Auftrennung der Proteine durch 18%ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung.

### 2.2.2 Letalität der Überexpression eines N-terminalen Snu66-Fragments

In einer Analyse zellulärer Proteinkonzentrationen (Ghaemmaghami et al. 2003) wurden weniger als 50 Moleküle Snu66 in einer Hefezelle bestimmt. Gleichzeitig kann eine erhöhte Expression in *S. pombe* den thermosensitiven Phänotyp der *hub1-4* Mutante komplementieren (Wilkinson et al. 2004). Eine Galaktose-induzierte Überexpression von Snu66 im *S. cerevisiae*-Wildtyp führte jedoch zum Absterben der Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde Snu66 C-terminal verkürzt (pMD283) und die Expression des N-terminalen Bereichs von Snu66 (Aminosäuren 1-371) induziert. Die Überexpression des Snu66-Fragments beeinträchtigt  $\Delta hub1$ -Zellen etwas stärker als den Wildtyp und ist in Zellen mit der P1384L-Mutation in Prp8 letal (Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6:** Überexpression eines N-terminalen Fragments von Snu66 im Wildtyp,  $\Delta hub1$  und  $prp8(P1384L)$ . Induktion der Snu66-Expression durch Ausstreichen der Zellen auf Galaktosemedium, Repression des Promotors durch Glukose.

## 2.3 Einfluss von $\Delta hub1$ und $prp8(P1384L)$ auf das Splicing

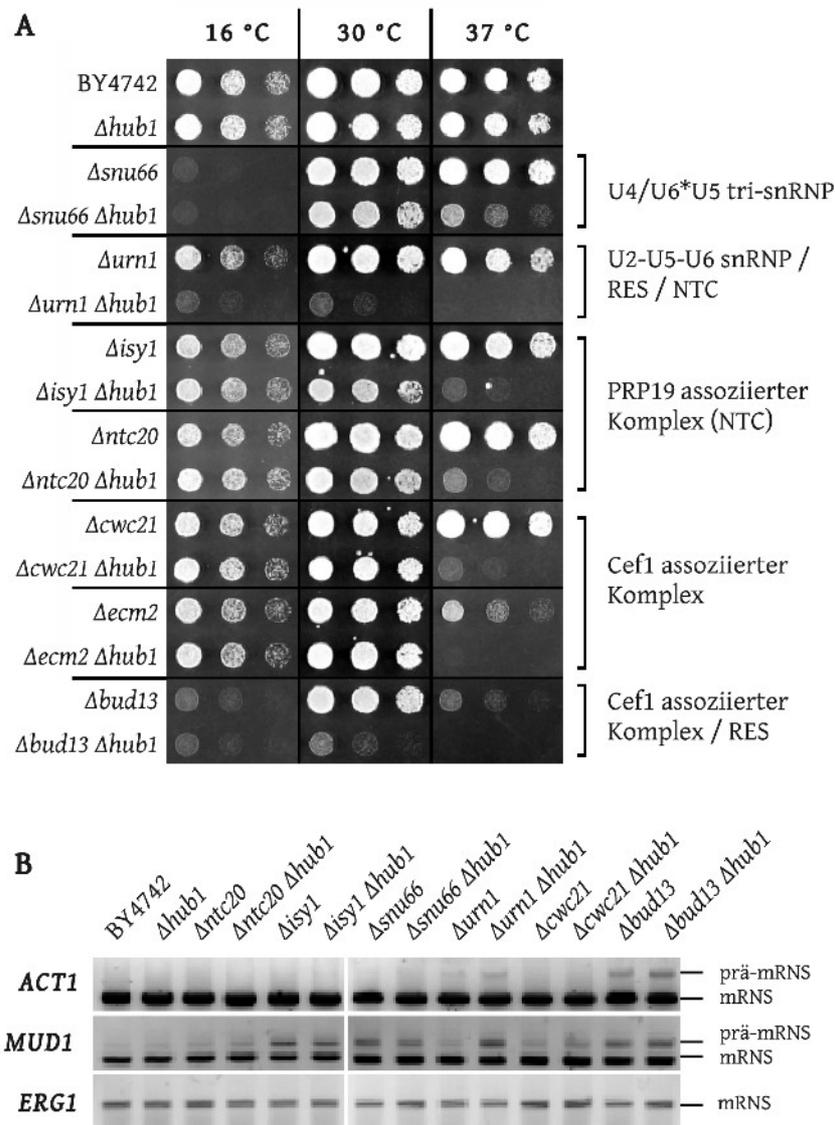
### 2.3.1 Genetische Interaktionen von Hub1 mit Faktoren des ersten Splicing-Schritts

Das Entfernen von Introns aus einer prä-mRNA erfordert die zeitlich und räumlich koordinierte Interaktion mehrerer Unterkomplexe des Spliceosoms. Das Splicing verläuft in zwei Schritten, bei denen die sn-Ribonukleinsäuren und ihre Proteinkomplexe drastisch umgelagert werden. Die meisten Gene mit einer Funktion im Splicing sind hoch konserviert und auch in der Bäckerhefe essentiell. In dieser Arbeit konnte bereits eine Mutation in dem Splicing-Faktor Prp8 charakterisiert werden, bei der Hub1 zu einem essentiellen Faktor wird (Abbildung 2.1). Durch die Suche nach weiteren genetischen Interaktionen sollte die Funktion von Hub1 im Splicing genauer bestimmt werden. Dafür wurden 24 Deletionsstämme nicht-essentieller Splicing-Faktoren mit einem  $\Delta hub1$ -Stamm der Linie BY4741 (yGD251) gekreuzt und sporuliert. Die haploiden Deletionsstämme wurden nach der Tetradenanalyse bei Temperaturen inkubiert, die Wachstumsdefekte hervorrufen, wenn Defekte im Splicing vorliegen. Dabei zeigten 7 Stämme mit kombinierten Gendeletionen ein deutlich reduziertes Wachstum gegenüber den Stämmen mit Hub1. Wachstumsdefekte konnten sowohl bei 30°C ( $\Delta urn1 \Delta hub1$ ,  $\Delta bud13 \Delta hub1$ ) als auch bei erhöhter Temperatur ( $\Delta snu66 \Delta hub1$ ,  $\Delta isy1 \Delta hub1$ ,  $\Delta ntc20 \Delta hub1$ ,  $\Delta cwc21 \Delta hub1$ ,  $\Delta ecm2 \Delta hub1$ ) beobachtet werden. Eine Liste aller untersuchten Stämme und deren Wachstum bei verschiedenen Temperaturen ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Gen	Funktion / Komplex	$\Delta x$ 30/37°C	$\Delta x \Delta hub1$ 30/37°C	Gen	Funktion / Komplex	$\Delta x$ 30/37°C	$\Delta x \Delta hub1$ 30/37°C
<i>STO1</i>	CBC	%	%	<i>SNT309</i>	NTC	++/++	++/++
<i>CBC2</i>	CBC / CC	++/++	++/++	<b><i>NTC20</i></b>	NTC	++/++	++/ts
<i>MUD2</i>	CC	++/++	++/++	<b><i>ISY1</i></b>	NTC	++/++	+/ts
<i>NAM8</i>	U1 snRNP	++/++	++/++	<i>SYF2</i>	NTC	++/++	++/++
<i>MUD1</i>	U1 snRNP	++/++	++/++	<i>CWC15</i>	Cef1 complex	++/++	++/++
<i>CUS2</i>	U2 snRNP	++/++	++/++	<b><i>CWC21</i></b>	Cef1 complex	++/++	++/ts
<i>IST3</i>	U2 snRNP / RES	++/++	++/++	<i>CWC27</i>	Cef1 complex	++/++	++/++
<i>LEA1</i>	U2 snRNP	%	%	<i>CDC40</i>	3' SS recognition	++/++	++/++
<i>BUD31</i>	U2 snRNP	++/++	++/++	<i>DBR1</i>	lariat debranching	++/++	++/++
<i>MSL1</i>	U2 snRNP	++/++	++/++	<i>PML39</i>	RES	++/++	++/++
<i>LIN1</i>	U5 snRNP	++/++	++/++	<b><i>BUD13</i></b>	RES	++/++	-/ts
<i>PRP18</i>	U5 snRNP	++/++	++/++	<b><i>PML1</i></b>	RES	++/++	++/ts
<b><i>SNU66</i></b>	U4/U6.U5 snRNP	++/++	(*) ++/+	<i>NUP60</i>	RES	++/++	++/+
<b><i>URN1</i></b>	U2-U5-U6 snRNPs / NTC / RES	++/+	-/ts	<i>MLP1</i>	RES	++/++	++/++
<b><i>ECM2</i></b>	U2/U6 helix formation	++/-	++/ts	<i>MLP2</i>	RES	++/++	++/++
<i>BRR1</i>	snRNPs	++/++	++/++	<i>MER1</i>	meiotic splicing / RES	++/++	++/++
<i>LSM6</i>	snRNPs	%	%	<i>HMT1</i>	mRNA export	++/++	++/++
<i>LSM7</i>	snRNPs	%	%	<i>NPL3</i>	mRNA export	++/++	++/++
<i>SKY1</i>	5' SS recognition	++/++	++/++	<i>CBP2</i>	mitochondrial splicing	++/++	++/++

**Tabelle 2.1:** Liste der getesteten Deletionsstämmen ( $\Delta x$ ), in Kombination mit  $\Delta hub1$ . CBC = cap binding complex, CC = commitment complex, snRNP = small nuclear ribonucleic particle, NTC = Prp19 complex, RES = pre-mRNA retention and export system, 5'-SS/3'-SS = splice sites; ++/+/- = Wachstum der Zellen, ts = thermosenstiv, % = unterschiedliche Koloniegößen nach Tetradenanalyse; \* = Defekt in der Keimung; fett markiert = Gene mit Wachstumsdefekten bei  $\Delta x \Delta hub1$  gegenüber  $\Delta x$

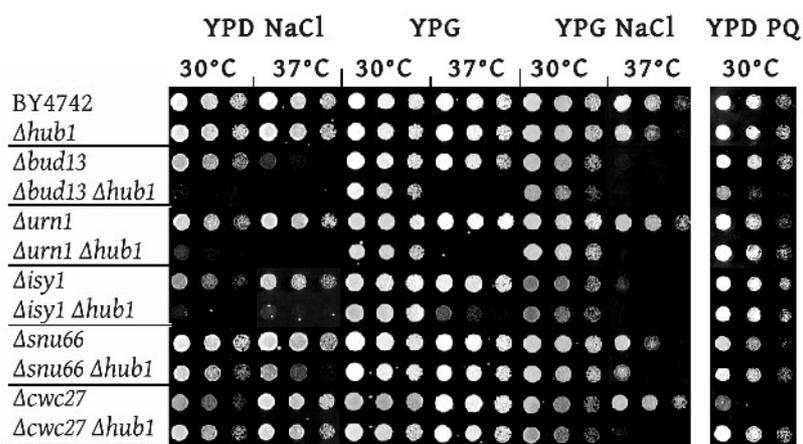
Die Splicing-Faktoren, deren Deletion in Kombination mit  $\Delta hub1$  Wachstumsdefekte hervorrufen, können größtenteils den Unterkomplexen des Spliceosoms zugeordnet werden, die unmittelbar vor der Aktivierung des ersten Splicing-Schritts an die prä-mRNS binden (siehe Abbildung 1.2). Daraufhin wurde vermutet, dass diese Stämme ebenfalls Defekte im Splicing zeigen. Die Anreicherung ungespleißter prä-mRNS von *ACT1* und *MUD1* wurde bei diesen Stämmen wieder mittels RT-PCR geprüft (Abbildung 2.7) und festgestellt, dass nur bei einer Deletion von *URN1* das Fehlen von Hub1 zu einem verstärkten Splicing-Defekt führt.



**Abbildung 2.7:** Temperatursensitivität und Splicing-Defekte in Deletionsstämmen nicht-essentieller Splicing-Faktoren mit  $\Delta hub1$  **A)** Wachstumsvergleich als Verdünnungsreihen bei verschiedenen Temperaturen. Die Zugehörigkeit der Faktoren zu Unterkomplexen des Spliceosoms wird auf der rechten Seite der Abbildung beschrieben. **B)** Vergleich von Splicing-Defekten bei Deletionsstämmen mit thermosensitivem Phänotyp, durch RT-PCR von *ACT1* und *MUD1*

Die bereits beschriebenen Deletionsmutanten wurden zusätzlich zur erhöhten Temperatur auch auf ihr Wachstum unter osmotischem Stress (0,7 M NaCl), oxidativem Stress (1 mM Paraquat) und einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Glyzerin) getestet, um die Zahl der genetischen Interaktionen mit Hub1 unter Stressbedingungen zu erweitern. Bei einigen Stämmen wirkten sich die veränderten Bedingungen auf die bereits beschriebenen Wachstumsphänotypen aus (Abbildung 2.8). Zusätzlicher osmotischer Stress führte zur Letalität des Stamms  $\Delta isy1 \Delta hub1$

und verringerte das Wachstum von  $\Delta isy1$  und  $\Delta cwc27$ . Der Wechsel von Glukose zu Glycerin im Medium hob die Wachstumsdefekte bei den Stämmen  $\Delta bud13 \Delta hub1$  und  $\Delta urn1 \Delta hub1$  bei 30°C, sowie für  $\Delta bud13$  bei 37°C auf und verbesserte das Wachstum für  $\Delta snu66 \Delta hub1$  bei 37°C leicht. Sowohl osmotischer Stress, als auch das Wachstum auf Glycerin komplementierte die Letalität von  $\Delta isy1 \Delta hub1$  bei 30°C. Bei 37°C auf Glycerinmedium zeigte bereits  $\Delta hub1$  einen leichten Wachstumsdefekt und der thermosensitive Phänotyp von  $\Delta bud13$  wurde wiederhergestellt, während er bei  $\Delta isy1$  und  $\Delta cwc27 \Delta hub1$  induziert wurde. Die auffälligste Änderung bei oxidativem Stress war ein Wachstumsdefekt von  $\Delta cwc27$ , der durch den Verlust von Hub1 kompensiert wurde.



**Abbildung 2.8:** Änderungen der Wachstumsphänotypen unter verschiedenen Stressbedingungen. Verdünnungsreihen der Hefestämme in Vollmedien mit 2% Glukose + 0,7M NaCl (YPD NaCl), 2% Glycerin (YPG), 2% Glycerin + 0,7 M NaCl (YPG NaCl) und 2% Glukose + 1 mM Paraquat (YPD PQ) und Inkubation bei den angegebenen Temperaturen.

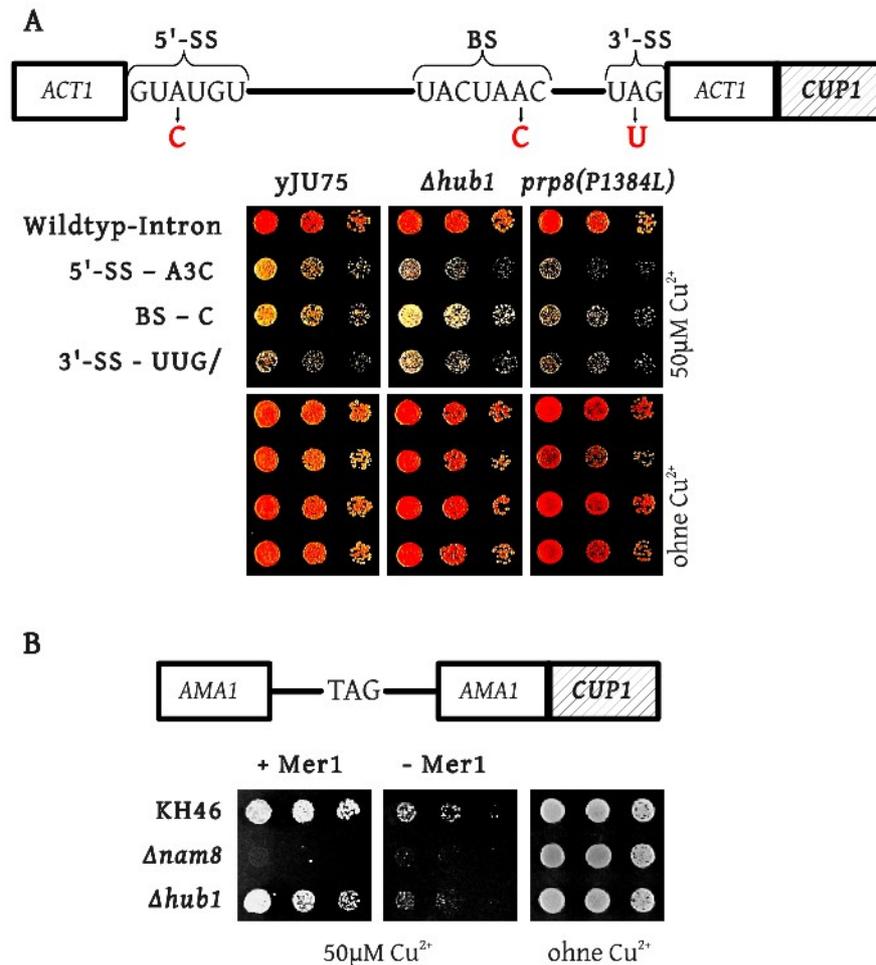
### 2.3.2 Splicing von veränderten Konsensussequenzen: Kupfersensitivität

Die Effizienz des Splicings kann sowohl durch Mutationen der beteiligten Proteine oder sn-Ribonukleinsäuren beeinträchtigt werden, als auch durch die Veränderung konservierter Sequenzen innerhalb eines Introns, da diese die Erkennung der korrekten Positionen für die Transesterifizierung vermitteln. Dabei kann zwischen Mutationen mit einem Einfluss auf den ersten oder zweiten Splicing-Schritt unterschieden werden (Liu et al. 2007). Um die Auswirkungen der P1384L-Mutation in Prp8 und das Fehlen von Hub1 auf einen der beiden Schritte zu bestimmen, wurde ein *ACT1-CUP1*-Reportersystem benutzt (Lesser and Guthrie 1993b), welches, abhängig von der Splicing-Effizienz, eine graduierte Resistenz gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen im

Medium vermittelt. Dieses System war zusätzlich mit Mutationen in der 5'-Spleißstelle, der Verzweigungsstelle und der 3'-Spleißstelle des Introns verfügbar (Query and Konarska 2004).

Für das folgende Experiment wurde die Prp8-Mutante durch Einkreuzen in den kupfersensitiven Stamm yJU75 (Liu et al. 2007) überführt und durch Tetradenanalyse ein haploider Stamm des kombinierten Genotyps gewonnen. Die Deletion von *HUB1* in yJU75 erfolgte durch homologe Rekombination PCR-basierter „knock-out“-Kassetten (Wach et al. 1994). Nach der Transformation der Reporterkonstrukte wurde das Wachstum der Stämme auf entsprechendem Selektionsmedium mit einer Kupferkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  verfolgt (Abbildung 2.9-A). Bei den Reporterkonstrukten mit einer Veränderung der 5'-Spleißstelle des Introns von GUAUGU zu GUCUGU wuchsen sowohl der Stamm mit der Prp8-Mutante, als auch der Stamm ohne Hub1 schlechter als der Wildtyp. Die Mutation in der Verzweigungsstelle des Introns von UACUAAC zu UACUACC führte zu einem leichten Wachstumsdefekt des Stamms mit mutiertem Prp8. Für beide Stämme konnten keine Unterschiede im Wachstum bei dem Konstrukt mit der Mutation in der 3'-Spleißstelle von UAG zu UUG festgestellt werden.

*AMA1*, *MER2* und *MER3* sind Gene, deren Funktion nur während der Meiose benötigt wird, wobei die Zelle deren Expression nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert. Die konstitutiv transkribierte prä-mRNS wird durch Mer1-abhängiges Splicing in funktionelle mRNA umgewandelt, die später translatiert wird. Die 5'-Sequenz dieser Introns weicht ebenfalls von der Konsensussequenz GUAUGU ab (Spingola et al. 2000). Ein *AMA1-CUP1*-Reportersystem mit konstitutiv exprimiertem Mer1 wurde benutzt, um den Effekt von Hub1 auf das Splicing von Introns mit veränderter 5'-Spleißstelle (GUACGU) zu beobachten (Abbildung 2.9-B). Der Vergleich mit dem Wildtyp zeigt dabei einen leichten Wachstumsdefekt der  $\Delta hub1$ -Deletionsmutante auf Medium mit 50  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat, wenn Mer1 exprimiert wurde. Ohne die Induktion des Splicings durch Mer1 wurde dieser Effekt deutlicher.

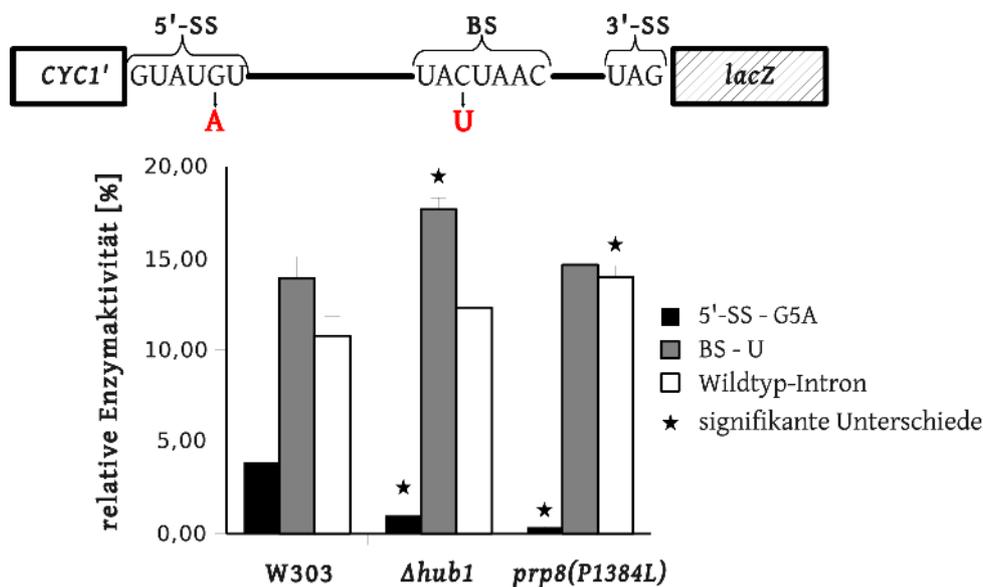


**Abbildung 2.9:** Wachstumskontrolle kupfersensitiver Stämme mit Splicing-Reporterkonstrukten als Verdünnungsreihen auf Medium mit 50 µM Kupfersulfat. **A)** Die Mutationen im Intron des *ACT1-CUP1*-Reporterkonstrukts werden im oberen Schema verdeutlicht. 5'-SS = 5'-Spleißstelle; BS = Verzweigungsstelle des Lariats; 3'-SS = 3'-Spleißstelle; / = 3'-Ende des Introns **B)** Splicing des *AMA1-CUP1*-Reporters mit einer nicht-kanonischen 5'-Spleißstelle, sowohl mit als auch ohne Induktion durch Mer1.

### 2.3.3 Splicing von veränderten Konsensussequenzen: $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Da der beobachtete Effekt im Wachstum auf Kupferplatten bei der Prp8-Mutante oder  $\Delta hub1$  nur gering war, wurde ein ähnliches Reporterkonstrukt zur Quantifizierung des Splicing-Defekts verwendet (Teem and Rosbash 1983). Dabei liegt nur bei dem gespleißten Reporterkonstrukt die kodierende Sequenz der  $\beta$ -Galaktosidase im korrekten Leseraster, deren enzymatische Aktivität damit zum Vergleich der Splicing-Effizienz genutzt werden kann. Auch bei diesem Reportersystem waren Versionen mit mutierten Intronsequenzen erhältlich (Jacquier et al. 1985). Die *CYC1'*-

*lacZ*-Konstrukte wurden in die angegebenen Stämme transformiert und nach der Induktion des Reporters die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase gemessen (Abbildung 2.10). Für das Intron mit der Mutation der 5'-Spleißstelle von GUAUGU zu GUAUAU konnte eine signifikante Abnahme der relativen Enzymaktivität der mutierten Hefestämme festgestellt werden. Der Wert der  $\Delta hub1$ -Deletionsmutante sank auf etwa 25 %, der der Prp8-Mutante auf etwa 10 % des Wildtyps. Die relative Enzymaktivität des Reporterkonstrukts mit der Mutation in der Verzweigungsstelle, von UACUAAC nach UAUUAAC, überstieg bei der  $\Delta hub1$ -Mutante den Wert des Wildtypstamms. Das Splicing des Konstrukts mit unveränderten Konsensussequenzen führte in der Prp8-Mutante zu einem Anstieg der relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.



**Abbildung 2.10:** Vergleich der relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der Reporterkonstrukte. Die Mutationen im Intron werden in dem oberen Schema aufgeführt. 5'-SS = 5'-Spleißstelle; BS = Verzweigungsstelle des Lariats; 3'-SS = 3'-Spleißstelle

#### 2.3.4 Splicing von veränderten Konsensussequenzen: RT-PCR

In zwei Experimenten wurden sowohl bei Zellen mit einer Mutation in Prp8, als auch bei  $\Delta hub1$ , Defekte im Splicing festgestellt, wenn die 5'-Sequenz der Introns von der kanonischen Sequenz GUAUGU abwich. Da viele Gene der Hefe Introns mit ungewöhnlichen 5'-Sequenzen enthalten, wurden Beispiele für unterschiedliche 5'-Spleißstellen gesucht, und mittels RT-PCR bestimmt, ob eine Akkumulation der entsprechenden ungespleißten prä-mRNS in den Hefestämmen *prp8*(P1384L) und  $\Delta hub1$  besteht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Es wurden

nur im Stamm mit der Prp8-Mutation sichtbare Anreicherungen der ungespleißten Form festgestellt (*GIM4*, *YNL050C*, *PCC1*, *QCR10* und *SRC1*), jedoch nicht bei *Δhub1*.

5'-SS Mutation	Genname	prä-mRNS-Akkumulation	
		<i>Δhub1</i>	<i>prp8(P1384L)</i>
GUAUGA	BET1	nein	nein
GUAUGC	GIM4	nein	ja
	YNL050C	nein	ja
GUAAGU	PCC1	nein	ja
	UBC9	nein	nein
	YIP3	nein	nein
	QCR10	nein	ja
GUACGU	UBC12	nein	nein
	ARP9	nein	nein
GUGAGU	SRC1	nein	ja
GUCAGU	RPL30	nein	nein
GUUAAG	HOP2	ja*	ja*
GCAUGU	COX5B	nein	nein
	YJR079W	ja*	ja*

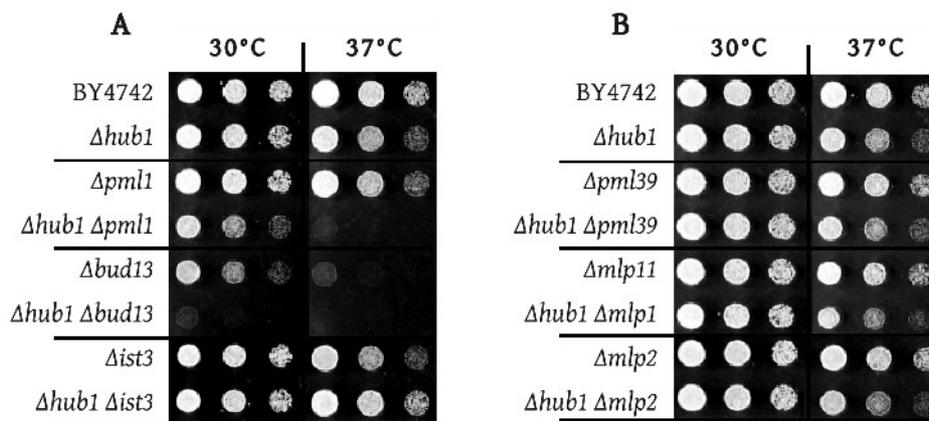
**Tabelle 2.2:** Gene mit veränderter 5'-Sequenz des Introns, und deren Anreicherung ungespleißter prä-mRNS in den Stämmen *prp8(P1384)* und *Δhub1*. \* = ungespleißte RNS-Form auch im Wildtyp detektierbar

## 2.4 Einfluss von *Δhub1* auf die prä-mRNS-Retention

Bevor eine Boten-RNS aus dem Zellkern exportiert werden kann, wird durch geeignete Kontrollmechanismen geprüft, ob vorher enthaltene Introns aus dem Nukleinsäurestrang entfernt wurden. Ohne eine solche Kontrolle würde die Zelle nicht-funktionelle oder sogar toxische Proteine translatieren, da ein Intron meist zu einer Verschiebung des Leserasters führt oder in seiner Sequenz für ein Ende der Translation kodiert. Diese Kontrolle geschieht im Zellkern durch das „prä-mRNS Export und Retentionssystem“ (RES). Es enthält zum einen Faktoren, die über Unterkomplexe des Spliceosoms an die zu prozessierende prä-mRNS binden (Dziembowski et al. 2004) und andererseits Faktoren an der Kernpore, die diese spezifischen Protein-Nukleinsäure-Komplexe am Export ins Zytoplasma hindern (Palancade et al. 2005).

## 2.4.1 Genetische Interaktion von Hub1 mit Faktoren des RES

In dem bereits in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Experiment wurden auch thermosensitive Stämme gefunden, denen neben Hub1 auch Faktoren des Retentionssystems fehlten. Wachstumsdefekte bei 37°C traten dabei nur bei Deletionen von RES-Komponenten auf, die mit der Regulation des Splicings verbunden sind (Abbildung 2.11-A). Bei den Faktoren des RES, die vorwiegend an der Kernpore lokalisiert sind, ist dieser Effekt nicht erkennbar (Abbildung 2.11-B).



**Abbildung 2.11:** Wachstumsvergleich von Deletionsmutanten des prä-mRNS-Retentionssystems (RES) als Verdünnungsreihen bei 30°C und 37°C. **A)** Faktoren des RES, die mit dem Spliceosom assoziieren  
**B)** RES-Faktoren, die an der Kernpore binden

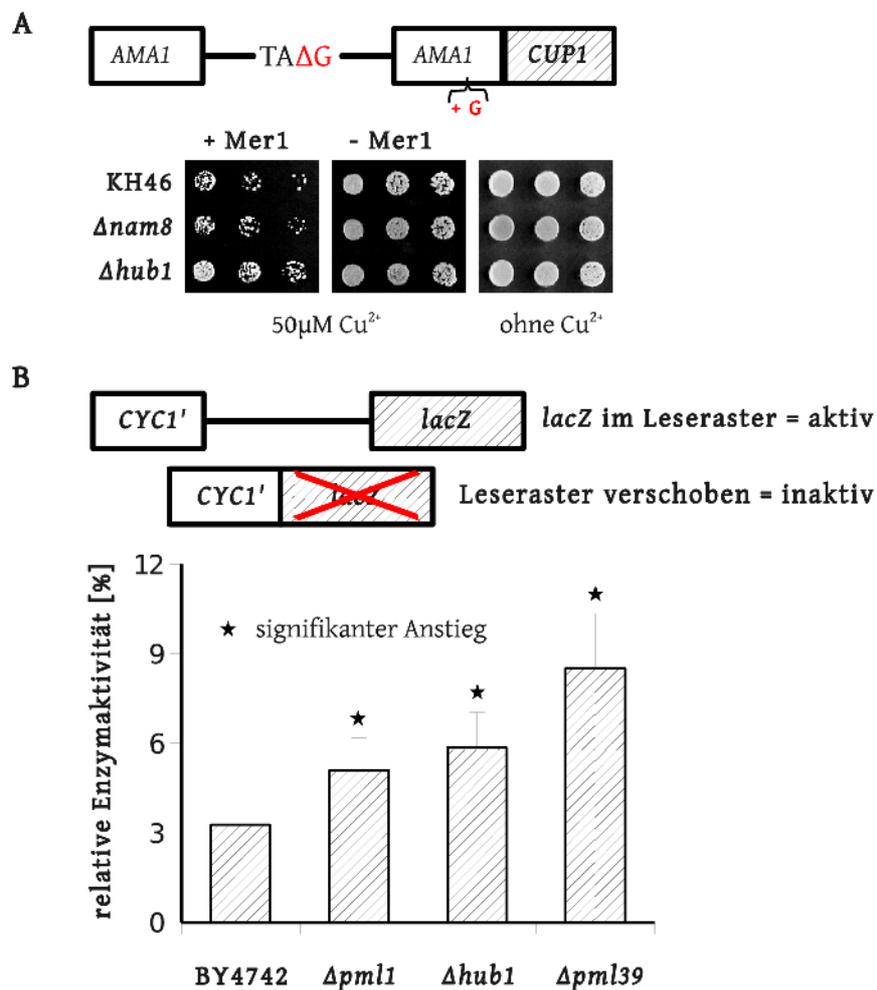
2.4.2 prä-mRNS-Retention: Kupfersensitivität und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Der Einfluss von Hub1 auf die Kontrolle des prä-mRNS-Exports wurde zusätzlich mit Reporter-konstrukten überprüft, die nur dann für ein aktives Protein kodieren, wenn die ungespleißte prä-mRNS aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wurde. Die Reporter ähneln denen aus den Kapiteln 2.3.2 und 2.3.3, wobei sich *CUP1*, bzw. *lacZ*, nur bei vorhandenem Intron im passenden Leseraster befinden. Das Raster wird durch das Entfernen der Introns verschoben, so dass die Translation der gespleißten Ribonukleinsäuren zum Funktionsverlust der Reporter führt.

Das bereits in Abschnitt 2.3.2 beschriebene *AMA1-CUP1*-Reporterkonstrukt wurde in dieser modifizierten Form (Scherrer et al. 2006) zur Analyse der Resistenz gegenüber erhöhter Kupferkonzentrationen verwendet. Dabei wuchsen Zellen ohne Hub1 bei 50  $\mu$ M Kupfersulfat deutlich besser als die Vergleichsstämme (Abbildung 2.12-A). Wurde das Splicing des Reporterkonstrukts

nicht durch Mer1 induziert, konnte bei keinem der Stämme ein Wachstumsdefekt durch Kupferstress beobachtet werden.

Das ähnlich modifizierte *CYC1'-lacZ*-Konstrukt (Legrain et al. 1989), konnte zur Quantifizierung des Defektes genutzt werden, ungespleißte prä-mRNS im Zellkern zurückzuhalten. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des  $\Delta hub1$ -Stamms war gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht (Abbildung 2.12-B), wie auch in den Kontrollstämmen mit einer bekannter Störung des prä-mRNS-Retentionssystems ( $\Delta pml1$  und  $\Delta pml39$ ).



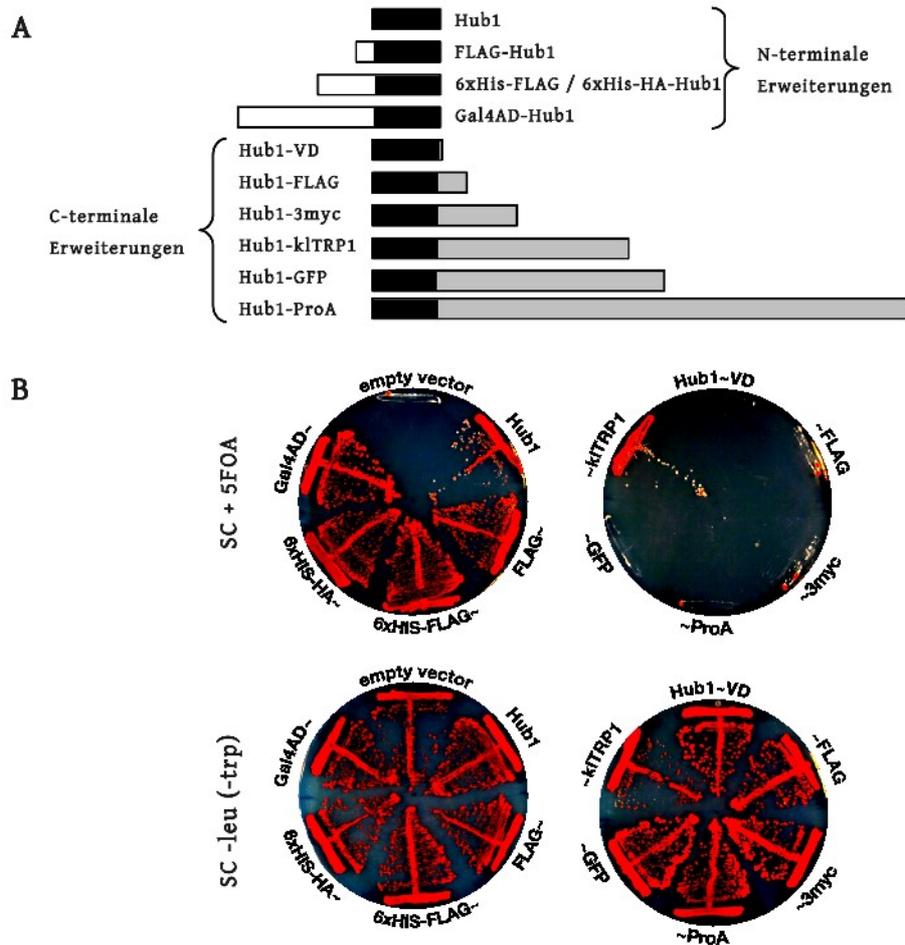
**Abbildung 2.12:** Störung des prä-mRNS-Retentionssystems durch  $\Delta hub1$ . **A)** Wachstumsvergleich kupfer-sensitiver Stämme mit dem prä-mRNS-Exportreporter, mit und ohne Mer1-induziertem Splicing. **B)** Vergleich der relativen Enzymaktivitäten nach zweistündiger Induktion des Reporterkonstrukts.

## 2.5 Störung der Hub1-Funktion durch C-terminale Verlängerung

Die Erweiterung eines Proteins durch das Anfügen von Epitopen, die von kommerziellen Antikörpern erkannt werden, erleichtern den Nachweis des markierten Proteins durch proteinchemische Methoden. Auch die Interaktionspartner in Proteinkomplexen können durch eine Aufreinigung des markierten Proteins gefunden werden. Sollten diese Markierungen die Funktion des Proteins beeinträchtigen, sind jedoch auch unspezifische Interaktionen zu erwarten. In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten beschrieben, die Funktion von Hub1-Fusionsproteinen über seine genetischen Interaktionen zu testen (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.3.1). Hub1 wurde dafür sowohl am N-Terminus, als auch am C-Terminus mit Proteinmarkern verlängert und die erhaltenen Fusionskonstrukte auf ihre Fähigkeit getestet, weiterhin die Funktion des Wildtyp-Proteins zu erfüllen. Die verwendeten Modifikationen und deren Länge in Relation zu Hub1 werden in Abbildung 2.13-A aufgeführt.

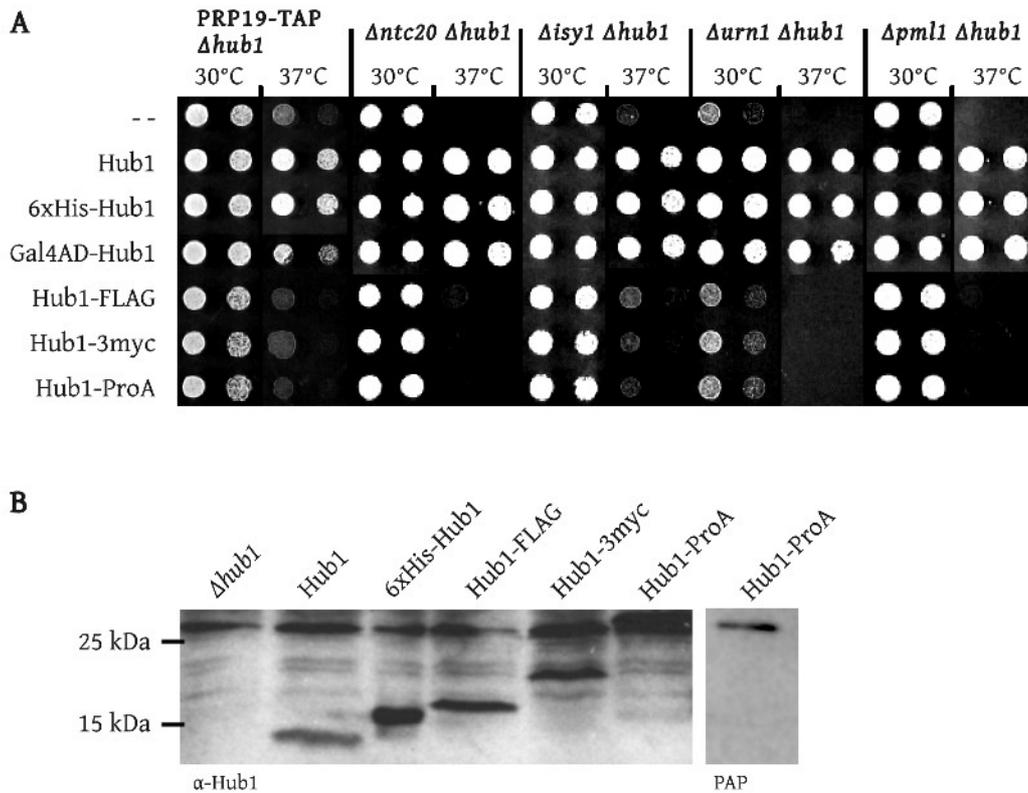
Die Konstrukte wurden im Stamm 13-115 auf das Überleben der Zellen durch die Selektion gegen die Wildtypkopie von *HUB1* (pMD004) getestet. Keine der N-terminalen Erweiterungen beeinflusste dabei die Funktion von Hub1 (Abbildung 2.13-B). Im Gegensatz dazu führten beinahe alle C-terminalen Hub1-Fusionsproteine zum synthetisch letalen Phänotyp. Nur eine C-terminale Verlängerung von Hub1 mit Trp1 aus *K. lactis*, konnte den Verlust von des Wildtypproteins kompensieren, jedoch nur eingeschränkt, da die überlebenden Zellen weniger und auch kleinere Kolonien als mit Wildtyp-Hub1 bildeten.

Der Verlust der Funktion von Hub1 bei C-terminaler Erweiterung, sowie der Erhalt der Hub1-Funktion bei Verlängerungen am N-Terminus, sind nicht nur auf den synthetisch letalen Phänotyp der Prp8-Mutante beschränkt, sondern lassen sich auch bei den thermosensitiven Stämmen, mit Deletionen nicht-essentieller Splicing-Faktoren und  $\Delta hub1$ , beobachten (Abbildung 2.14-A). Bei der Aufreinigung des Proteinkomplexes um Prp19, um Unterschiede in dessen Zusammensetzung in Abhängigkeit von Hub1 zu bestimmen, wurde ebenfalls einen thermosensitiver Phänotyp festgestellt, der vom C-terminalen TAP-Affinitätsmarker an Prp19 in Kombination mit  $\Delta hub1$  hervorgerufen wird. Auch dabei verlieren C-terminale Erweiterungen von Hub1 ihre Funktion, im Gegensatz zu N-terminalen Fusionsproteinen.



**Abbildung 2.13:** Einfluss von N- und C-terminalen Erweiterungen von Hub1 auf dessen Funktion im synthetisch letalen Stamm 13-115. **A)** Vergleich der verwendeten Modifikationen anhand des jeweiligen Molekulargewichts. Schwarz = Hub1; weiß = N-terminale Erweiterung; grau = C-terminale Erweiterung  
**B)** Wachstumsvergleich von synthetisch letalen Stämmen mit N- oder C-terminalen Hub1-Fusionsproteinen. Selektion gegen die Wildtypkopie von Hub1 (pMD004) durch 5'-FOA. Gal4AD = Gal4-Aktivierungsdomäne; VD = Dipeptid aus Valin und Aspartat. *klTrp1* = Trp1 aus *K. lactis*

Um auszuschließen, dass Hub1-Versionen mit C-terminalen Verlängerungen durch zu geringe Expression oder vorzeitigem Abbau der Zelle nicht zur Verfügung stehen, wurde der zytosolische Anteil der Fusionskonstrukte und unmodifiziertem Hub1 verglichen (Abbildung 2.14-B). Die Bande des Hub1-ProA-Fusionsproteins wird dabei durch eine Kreuzreaktion des Hub1-Antikörpers überdeckt und wurde deshalb zusätzlich mit anti-Peroxidase-Antikörpern (PAP) detektiert. Proteine mit N- oder C-terminalen Erweiterungen von Hub1 konnten mit ähnlichen Signalstärken detektiert werden, wobei die Laufgeschwindigkeiten der Proteine in der SDS-PAGE mit den erwarteten Molekulargewichten korrelierte. Der Funktionsverlust von C-terminalen Hub1-Fusionsproteinen ist daher nicht durch geringere Expression oder schnellem Abbau in der Zelle zu erklären.



**Abbildung 2.14:** Funktionsverlust C-terminaler Hub1-Fusionsproteine bei genetischen Interaktionen mit Splicing-Faktoren. **A)** Wachstumsvergleich thermosensitiver Stämme mit N- oder C-terminalen Erweiterungen von Hub1, als Verdünnungsreihen mit Inkubation bei 30°C und 37°C. **B)** 18% SDS-PAGE und Western-Blot von Rohlysaten dieser Stämme mit nachfolgender Immunolumineszenzdetektion durch Hub1-Antikörper, bzw. PAP.

## 2.6 Charakterisierung funktionaler Aminosäurereste von Hub1

Die Reihenfolge der Aminosäuren eines Proteins ist die Grundlage für seine räumliche Struktur, die ihrerseits die Funktion dieses Proteins beeinflusst. Dabei kann zwischen strukturerhaltenden und funktionalen Aminosäureresten unterschieden werden. Während erstere an der Stabilisierung des strukturellen Rückgrats durch hydrophobe Wechselwirkungen im Proteinkern, kovalente Bindungen der Seitenketten (z.B. Disulfidbrücken) oder elektrostatische Wechselwirkungen hydrophiler Reste an der Oberfläche des Proteins (z. B. Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen) beteiligt sind, befinden sich funktionale Reste meist auf der Oberfläche des Proteins. Sie weisen oft in das umgebende Medium und können so mit externen Faktoren interagieren. Die Tertiärstruktur für Hub1 wurde bereits durch Kernspinresonanzanalyse in einer Proteinlösung bestimmt

(Ramelot et al. 2003), und für Hub1 eine eine Ubiquitin-ähnliche Faltung gefunden. Im Gegensatz dazu weisen die Primärstrukturen von Hub1 und Ubiquitin nur wenig Gemeinsamkeiten auf (Dittmar et al. 2002), die sich größtenteils auf strukturerhaltende Reste beschränken. Verglichen mit Ubiquitin sind für Hub1 nur relativ wenige Interaktionspartner bekannt und es fehlen Informationen über die Bereiche von Hub1, die für deren Bindung essentiell sind.

### 2.6.1 Mutagenese von Hub1 und Selektion funktionsloser Mutanten

Im folgenden Experiment wird die synthetische Letalität von  $\Delta hub1$  mit einer P1384L-Mutation in Prp8 (siehe Kapitel 2.1.1) für die Suche nach Hub1-Mutanten benutzt, die diesen Phänotyp nicht mehr komplementieren können. Dabei wurden der *HUB1*-Sequenz durch fehlerbehaftete PCR zufällige Mutationen eingefügt. Betrachtet man die Nukleotidsequenz von Hub1 wird deutlich, dass der Austausch einer einzelnen Basenpaarung in 31 der 73 kodierenden Triplets von *HUB1* (= 42,5 %) mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 11 % zu einem Translationsstop führen kann. Dadurch enthielten theoretisch 5 % - 20 % aller Mutanten ein vorzeitiges Stopcodon, wenn in einer *HUB1*-Kopie bis zu 4 Basen ausgetauscht würden. Dieser Anteil wäre dann bei den funktionslosen Hub1-Mutanten stark erhöht und würde die Suche nach Mutanten ohne vorzeitigem Translationsstop erschweren.

Um Mutationen zu Stopcodons zu vermeiden, wurde ein Konstrukt von Hub1 mit einer C-terminalen Fusion von Trp1 aus *K. lactis* generiert, das den Verlust von Wildtyp-Hub1 in der Prp8-Mutante komplementieren konnte (siehe Kapitel 2.5). Die Selektion der Zellen nach der Mutagenese auf Tryptophan-Mangelmedium stellte auch die vollständige Translation des Fusionsproteins sichergestellt werden. Aus Kolonien, die die anschließende Selektion auf 5-FOA-Medium nicht überstanden, wurden die enthaltenen Plasmide isoliert und durch Sequenzierung die Mutation in *HUB1* bestimmt. Im Laufe des Experiments wurden etwa 5000 Kolonien auf 5-FOA selektiert und 60 Plasmide isoliert, deren Hub1-*kl*Trp1-Fusionsproteine den synthetisch letalen Phänotyp nicht mehr komplementieren konnten. Die Sequenzierung der Plasmide ergab 33 Hub1-Mutanten mit dem Austausch einer einzelnen Basenpaarung (= 55%), 17 Mutanten mit zwei Basenaustauschen (= 28%), 4 Mutanten mit drei (= 7%) und 6 Mutanten mit vier ausgetauschten Basenpaarungen (= 10%). In der Aminosäuresequenz trugen 47 Hub1-Versionen eine einzelne Mutation und 13 mehr als eine ausgetauschte Aminosäure. Da die Auswirkung der einzelnen Austausche eines mehrfach mutierten Proteins nicht bestimmt werden kann, wurden nur die Einzelmutanten zu weiteren Experimenten herangezogen.

Von den 47 Austauschungen einzelner Aminosäuren wurden 12 mehrfach gefunden, so dass am Ende des Versuchs 35 unterschiedliche Mutationen an insgesamt 30 Positionen der Aminosäuresequenz von Hub1 zur Verfügung standen (Tabelle 2.3).

Aminosäure einzeln	Nukleotid	Aminosäure einzeln	Nukleotid	Aminosäuren mehrfach	Nukleotide
E3G	A8G	K41R	A122G	L10F I42V	A30T A124G
N7S	A20G	I42F	A124T	Q34L E58V	A101T A173T
N7I	A20T	V43E	T128A	Q34H Y71I	A102T T201A A202T
L10E	T28G T29A	Q45R	A134G	Q34H L73R	A102T T218G
G11R	G31C	S49C	A145T	I35T Q45R	T104C A134G
L19H	T56A	V50G	T149G	G36S N40S	G106A A119G
L19P	T56C	K52E	A154G	T37A Q65R	A109G A194G
E21V	A62T	S56T	T166A	I42F I55T Y71C	A124T T164C A212G
E21G	A62G	E58V	A173T	L70H Y72L L73Δ	T201C 209-211Δ
D22E	T66A	E58D	A174T		
K29N	A87T	Y60H	T178C		
V30I	G88A	N67D	A199G		
L33M	T97A	E69K	G205A		
Q34H	A102C	Y71H	T211C		
I35V	A103G	Y71N	T211A		
T37S	A109T	Y71S	T211A A212G		
T37I	C110T	L73R	T218G		
Q38R	A113G				

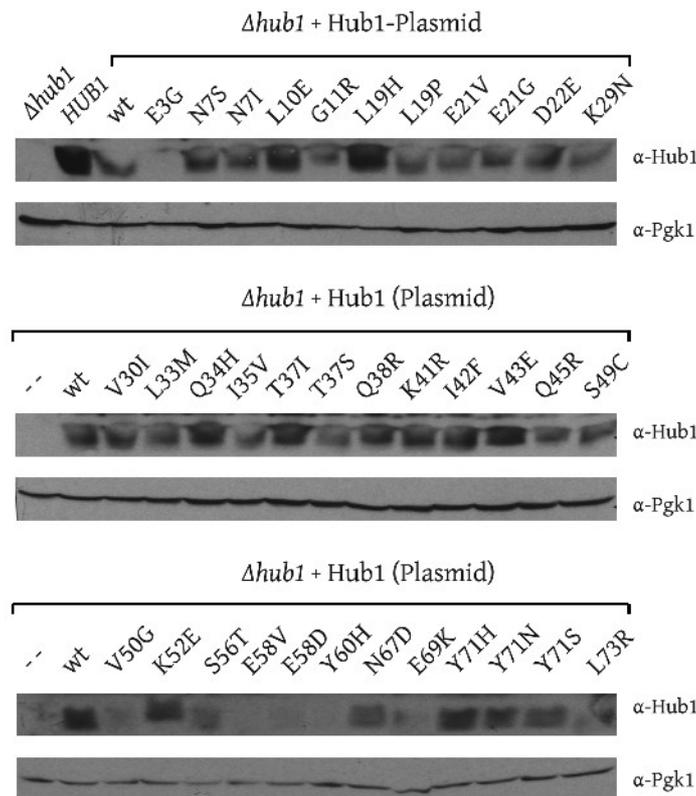
**Tabelle 2.3:** Liste der gefundenen Hub1-Mutanten mit dem Verlust ihrer Funktion als *klTrp1*-Fusionsprotein, sortiert nach der Zahl der ausgetauschten Aminosäuren und ihrer Position in der Sequenz.

### 2.6.2 Expressionsgrad und Stabilität der Hub1-Mutanten

Der Funktionsverlust eines mutierten Proteins kann unterschiedliche Ursachen haben. Aminosäureaustausche auf der Proteinoberfläche können durch eine veränderte Ladungsverteilung oder sterische Effekte die Bindung von Interaktionspartnern stören. Dagegen destabilisieren Austauschungen strukturerhaltender Aminosäuren oft die korrekte Faltung des Proteins, wobei hydrophobe Bereiche im Inneren des Proteins dem umgebenden wässrigen Medium zugänglich werden und damit unspezifische hydrophobe Interaktionsbereiche darstellen. In der Zelle werden teilweise entfaltete Proteine durch Chaperone stabilisiert und ihnen, unter ATP-Verbrauch, die Möglichkeit zur Rückfaltung gegeben. Gelingt dies nicht, werden instabile Proteine durch proteasomalen Abbau aus der Zelle entfernt.

Durch einen Vergleich der Proteinmengen von Hub1-Mutanten ohne *klTrp1*-Fusion sollten die Mutanten bestimmt werden, die keine korrekte Faltung besitzen und daher in der Zelle abgebaut werden. Die kodierende Sequenz der Hub1-Mutanten wurde in den Vektor pGD251 kloniert, der den genomischen *HUB1*-Promoter bzw. Terminator enthielt, in den Stamm yGD139 transformiert

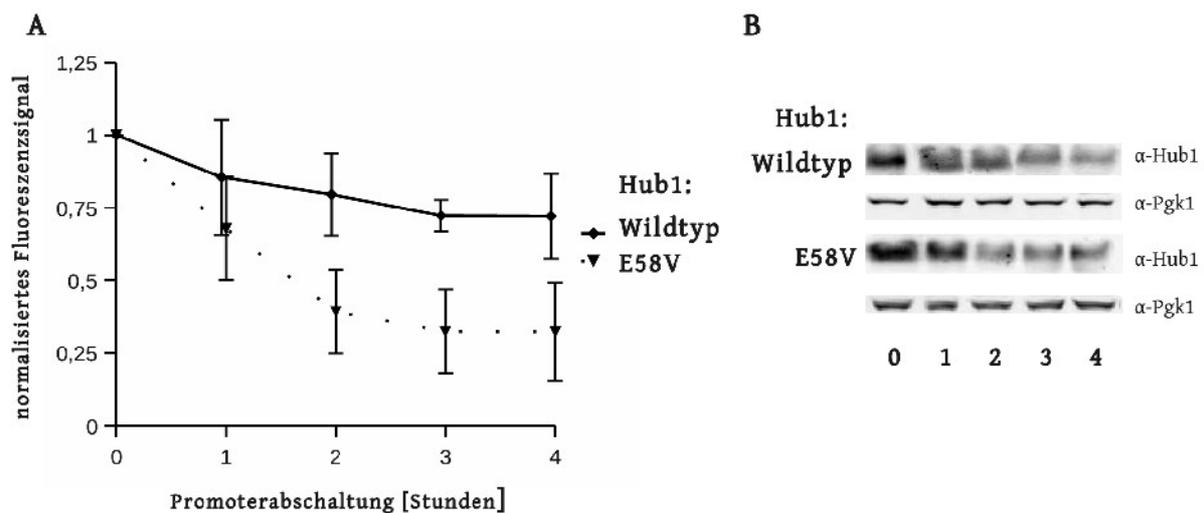
und das Rohlysate dieser Hefekulturen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western-blotting und Immunlumineszenz mit Hub1-Antikörpern wurde die Menge an enthaltenem Hub1 verglichen (Abbildung 2.15). Obwohl die *HUB1*-Kopie auf dem Plasmid weitgehend dem genomischen Promoter und Terminatorbereich entsprach, wurde weniger Hub1 exprimiert als im Wildtypstamm. Die Proteinmengen der Hub1-Mutanten sind weitgehend ähnlich, jedoch zeigen die Mutationen E3G, V50G, E58V/G, Y60H und E69K eine deutliche Reduktion des Antikörpersignals.



**Abbildung 2.15:** Vergleich der zellulären Proteinlevel der Hub1-Mutanten nach Western-blot von Rohlysaten und Immunolumineszenz mit Hub1-Antikörpern. Kontrolle der aufgetragenen Lysatmengen durch Immunodektion von Pgk1

Die niedrigen Hub1-Signale der verschiedenen Mutanten deuteten auf Proteine mit instabiler Faltung hin, die rasch in der Zelle abgebaut wurden. Wildtyp-Hub1 und die Mutante E58V wurden in den Vektor pSV52 (2 $\mu$ ; pGAL4) kloniert und ebenfalls in den Stamm yGD139 transformiert. Nach einer zweistündigen Induktion der Hub1-Expression durch Galaktose, wurde der Promotor durch Glukose reprimiert und für 4 Stunden weiter inkubiert.

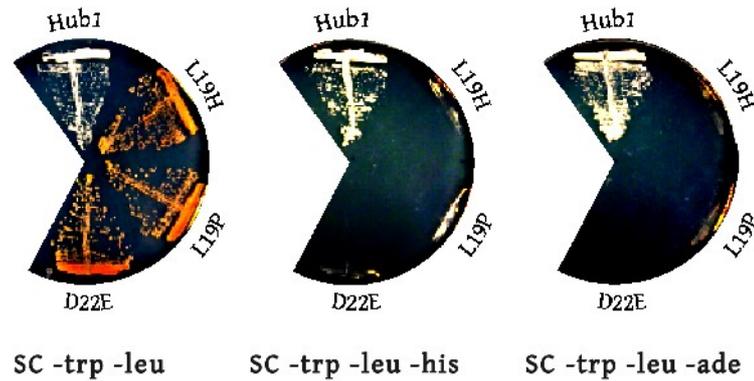
Die Rohlysate der Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge an Hub1 durch Immunfluoreszenz quantifiziert. Nach dem Auftrag der Signalstärken gegen die Zeit nach der Promotorabschaltung konnte die Halbwertszeit der Hub1-Versionen grafisch bestimmt werden. (Abbildung 2.16). Für Wildtyp-Hub1 lag diese über 4 Stunden, während die Mutante E58V eine Halbwertszeit von weniger als 2 Stunden aufwies.



**Abbildung 2.16:** Bestimmung der Halbwertszeit des Wildtyps und der E58V-Mutante von Hub1.  
**A)** Auftrag der normalisierten Signalintensitäten gegen die Zeit nach der Promotorabschaltung.  
**B)** Zugehöriger Western-blot mit Fluoreszenzsignalen für Hub1 und der Ladekontrolle Pgk1.

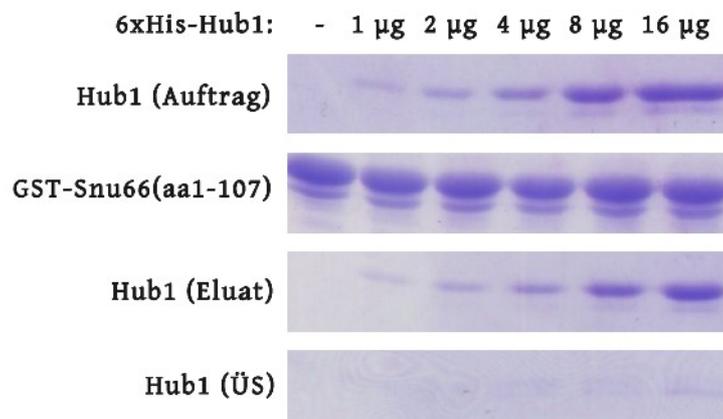
### 2.6.3 Interaktion der Hub1-Mutanten mit Snu66

Die bereits bekannte Interaktion von Hub1 mit Snu66 im „two-hybrid“-System (Wilkinson et al. 2004) und dessen N-terminalen Bereichs *in vitro* (siehe Kapitel 2.2.1) konnte für die Charakterisierung der Bindung der Hub1-Mutanten an Snu66 verwendet werden. Die mutierten Hub1-Sequenzen wurden in ein „two-hybrid“-System kloniert und ihre Interaktion mit Snu66 durch ihr Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedien beobachtet. Bei drei Mutationen in Hub1 (L19H, L19P und D22E) konnte kein Wachstum des Reporterstamms auf dem Selektionsmedium festgestellt werden (Abbildung 2.17). Stämme mit anderen Mutanten wuchsen normal oder waren teilweise im Wachstum beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

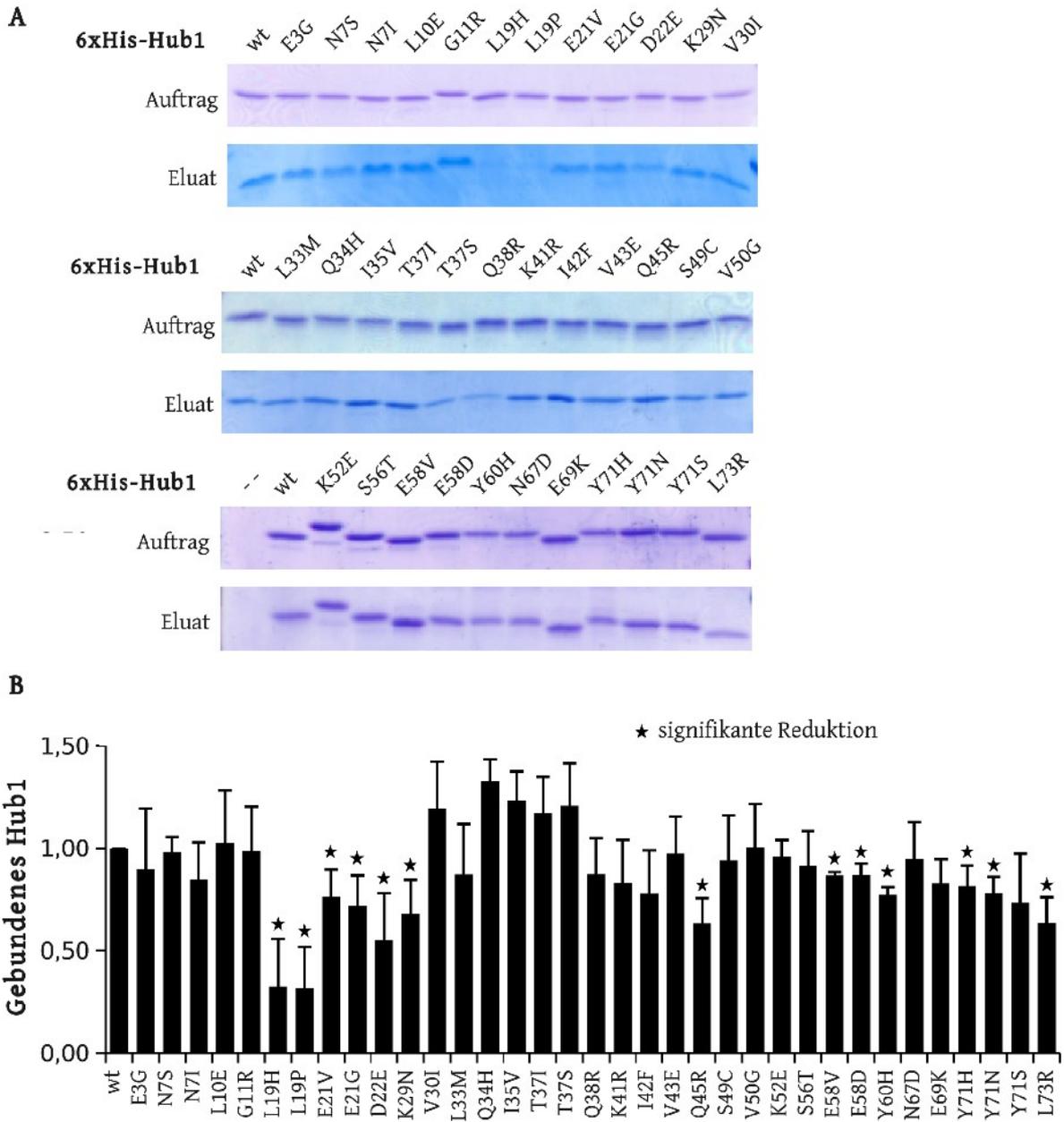


**Abbildung 2.17:** Verlust der Interaktion mit Snu66 bei Mutationen in Hub1 an den Positionen 19 und 22. Beobachtung des Wachstum der Reporterstämme mit Gal4(AD)-Hub1 und Gal4(BD)-Snu66 auf den entsprechenden Selektionsmedien.

Die Analyse der Interaktion der Hub1-Mutanten an Snu66 durch das „two-hybrid“-System erlaubte nur eine qualitative Aussage der Bindungsaffinität. Deshalb wurde die beschriebene *in vitro*-Bindung von Hub1 an den N-Terminus von Snu66 genutzt und die gebundenen Proteinmengen quantifiziert, um die Affinitäten der mutierten Hub1-Versionen gegenüber dem Snu66-Fragment zu vergleichen. Zunächst wurde die Bindekapazität des gereinigten GST-Snu66-Fusionsproteins getestet und die einzusetzende Menge an Hub1 so gewählt, dass einerseits keine Sättigung der Bindung an Snu66 auftrat, andererseits aber die Unterschiede des gebundenen Hub1 in der Coomassiefärbung deutlich sichtbar wurden (Abbildung 2.18). Der Einsatz von etwa 4 µg Hub1 ergab eine deutlich sichtbare Bande, deren Intensität selbst bei der Verdopplung oder Halbierung der eingesetzten Proteinmenge noch gut messbar war.



**Abbildung 2.18:** Titration der Bindungskapazität des N-terminalen Snu66-Fragments. Coomassiefärbung der Proteinbanden nach SDS-PAGE der Proteinproben aus der *in vitro*-Bindung.

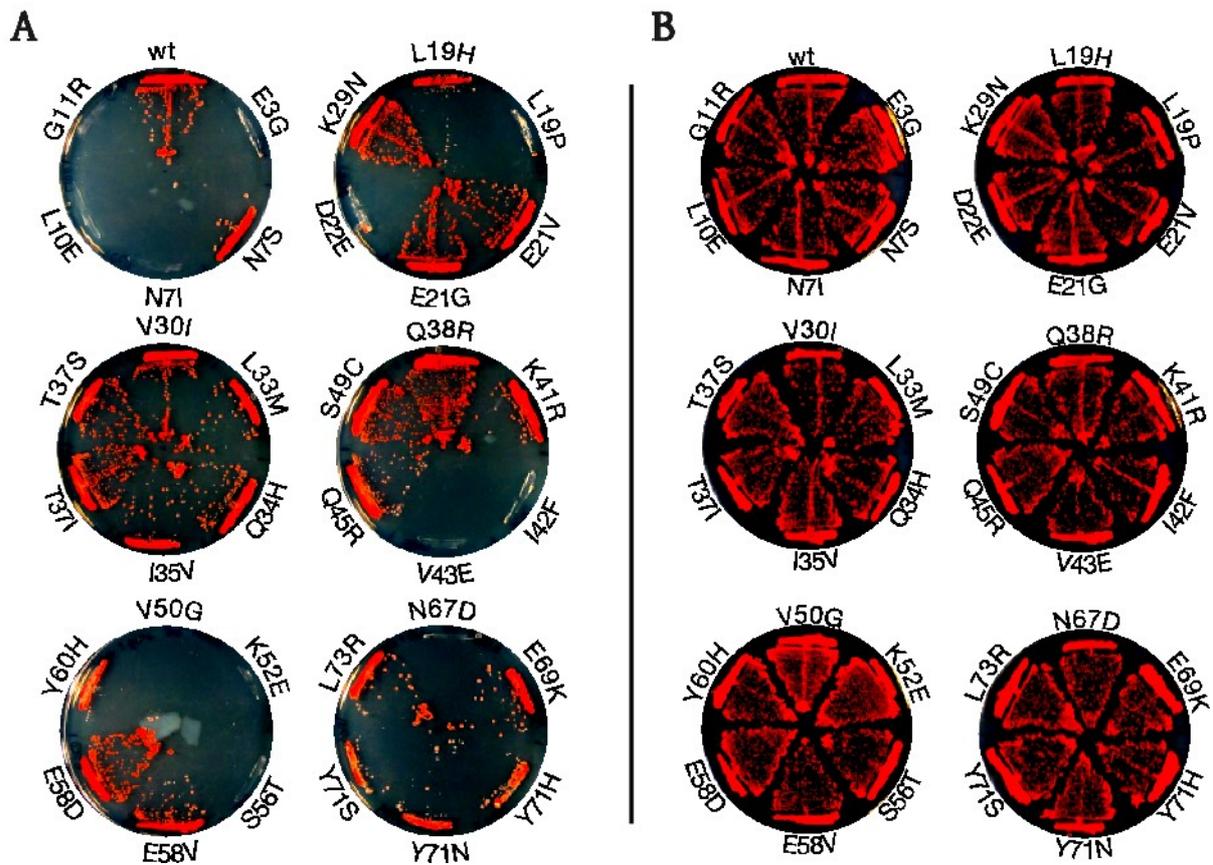


**Abbildung 2.19:** Quantifizierung der *in vitro*-Bindung der Hub1-Mutanten an Snu66(1-107).  
**A)** Coomassiefärbung der Hub1-Banden nach SDS-PAGE zum Vergleich der eingesetzten Proteinmenge mit dem Eluat. **B)** relative Bindungsstärken der Hub1-Mutanten, nach der Quantifizierung ihrer Banden und der Normalisierung auf den Wildtyp

Für die Bindungsstudie wurden die Hub1-Mutanten in ein bakterielles Expressionssystem (pDESTco) kloniert, und nach der Expression aufgereinigt. Je 4 µg gereinigtes Hub1 wurde mit einer konstanten Menge an GST-Snu66(1-107) inkubiert und nach dem Waschen der Säulenmatrix durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 2.19-A). Die Stärke der Proteinbanden im Acrylamidgel wurden anhand ihrer Farbdichte quantifiziert und die Hub1-Banden des Eluats sowohl auf eine unspezifische Bande aus der der Snu66-Präparation, als auch auf die eingesetzte Hub1-Menge normiert, um Abweichungen der eingesetzten Proteinmengen auszugleichen. Im Vergleich der Menge an gebundenem Hub1 ließen sich bei einigen Mutanten signifikante Änderungen im Vergleich zum Wildtyp feststellen (Abbildung 2.19-B). Mutationen an den Positionen 19, 21, 22 und 29 reduzieren die Affinität zu Snu66, wobei die Hub1-Mutanten, die im „two-hybrid“-System keine Interaktion mit Snu66 zeigten, auch hier die niedrigsten Werte aufwiesen. Weitere Reduktionen der Snu66-Bindung waren auch bei Mutationen an den Positionen 45, 58, 60, 71 und 73 zu beobachten.

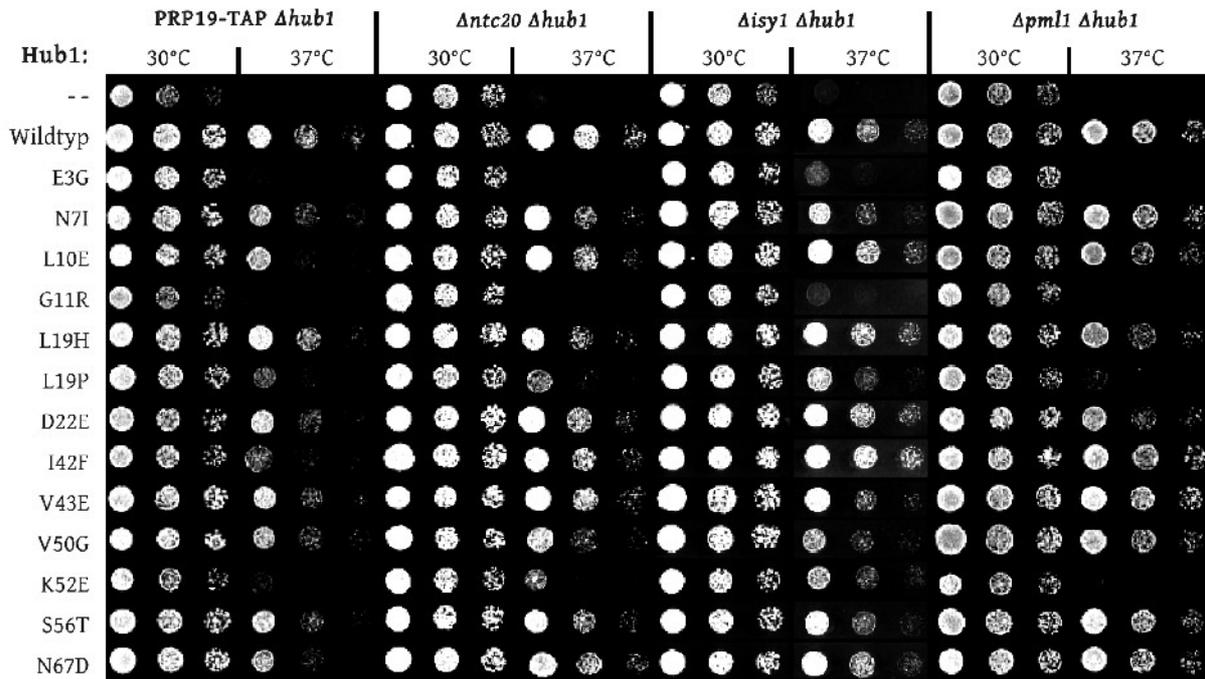
#### 2.6.4 Funktionstest der Mutanten durch genetische Interaktion

Die synthetische Letalität von  $\Delta hub1$  und einer Mutation im Splicing-Faktor Prp8 war eine Voraussetzung für die Suche nach funktionslosen Hub1-Mutanten. Das Fusionsprotein aus Hub1 und *klTrp1*, mit dem Mutanten mit vorzeitigem Translationsstops vermieden werden konnte, kompensierte zwar den Verlust der Hub1-Wildtypkopie (Abbildung 2.13-B), aber eine Beeinträchtigung der Funktion von Hub1 durch die C-terminale Erweiterung war nicht ausgeschlossen. Die 35 Hub1-Mutanten ohne *klTrp1*-Fusion (pMD211-246) wurden daher auf die Komplementation des synthetisch letalen Phänotyps getestet (Abbildung 2.20). Es zeigte sich, dass einige Hub1-Mutanten (K29N, E21V/G, Q34H, T37I/S, Q38R, S49C und E58D) nur mit der C-terminalen *klTrp1*-Fusion ihre spezifische Funktion im Zusammenhang mit der Prp8-Mutante verlieren. Andere Mutationen (L19H, V30I, L33M, I35V, K41R, Q45R, E58V, Y60H, E69K, Y71H/N/S und L73R) führen zu stärkeren Wachstumsdefekten, aber nicht zum Tod der Zellen. Die nicht-letalen Mutationen von Hub1 wurden aus der Liste für weitere Untersuchungen herausgenommen. Nur die Mutationen E3G, N7I, L10E, G11R, L19P, D22E, I42F, V43E, V50G, K52E, S56T und N67D konnte den letalen Phänotyp nicht mehr kompensieren.



**Abbildung 2.20:** Wachstumsvergleich von Zellen mit Hub1-Mutanten im Stamm 13-115, bei gleichzeitiger Selektion gegen die Wildtypkopie von Hub1. Als Fusionsprotein mit *klTrp1* konnte keine der Mutanten die synthetische Letalität kompensieren. **A)** Wildtyp-Hub1 bis Mutante T37S **B)** Hub1-Mutanten Q38R bis L73R

Die Hub1-Mutanten, die weiterhin zur synthetischen Letalität im Zusammenhang mit der Prp8-Mutante führen, wurden in die Hefestämme transformiert, die bei der Deletion von *HUB1* einen thermosensitiven Phänotyp zeigten (siehe Kapitel 2.3.1). Die Funktion der Hub1-Mutanten wurde durch das Wachstum der Zellen bei 37°C überprüft (Abbildung 2.21). Die Mutationen E3G und G11R führen in allen getesteten Stämmen zum Tod der Zellen bei erhöhter Temperatur. Die Mutation K52E kann diesen Phänotyp nur im Stamm  $\Delta isy1 \Delta hub1$  teilweise komplementieren. Die Hub1-Mutante L19P kann die Funktion von Wildtyp-Hub1 in geringem Maße übernehmen, jedoch nicht im Stamm  $\Delta pml1 \Delta hub1$ . Nur N71, L10E, I42F und N67D führen nur im Stamm Prp19-TAP  $\Delta hub1$  zu einem Wachstumsdefekt bei 37°C, während die restlichen Mutanten (L19H, D22E, V43E, V50G, S56T) das Wachstum der Stämme bei 37°C nicht beeinträchtigen.



**Abbildung 2.21:** Wachstumsvergleich der Stämme mit Hub1-abhängiger Thermosensitivität. Das Wachstum der Zellen bei 37°C zeigt den Erhalt der Wildtypfunktion der Mutanten.

### 3 Auswertung

#### 3.1 Synthetische Letalität nach EMS-Mutagenese

Die Suche nach veränderten Genen mit einer synthetischen Letalität mit  $\Delta hub1$  verlief erfolgreich. Die Dimensionen der Mutagenese mit EMS, ca. 85000 untersuchte Kolonien bei einer Tötungsrate von 30-40 %, liegen im Rahmen bereits beschriebener Protokolle (Lawrence 2002). Da bei Deletionen nicht-essentieller Gene keine synthetische Letalität mit  $\Delta hub1$  festgestellt wurde, sollten in diesem Ansatz essentielle Gene durch Mutagenese geschädigt werden, ihre essentiellen Funktionen aber erhalten bleiben. Eine starke Mutagenese, mit einer höheren Rate getöteter Zellen, hätte auch zu einer erhöhten Rate mehrfacher Mutationen in unterschiedlichen Genen geführt, deren Auswertung im weiteren Verlauf des Experiments erschwert worden wäre.

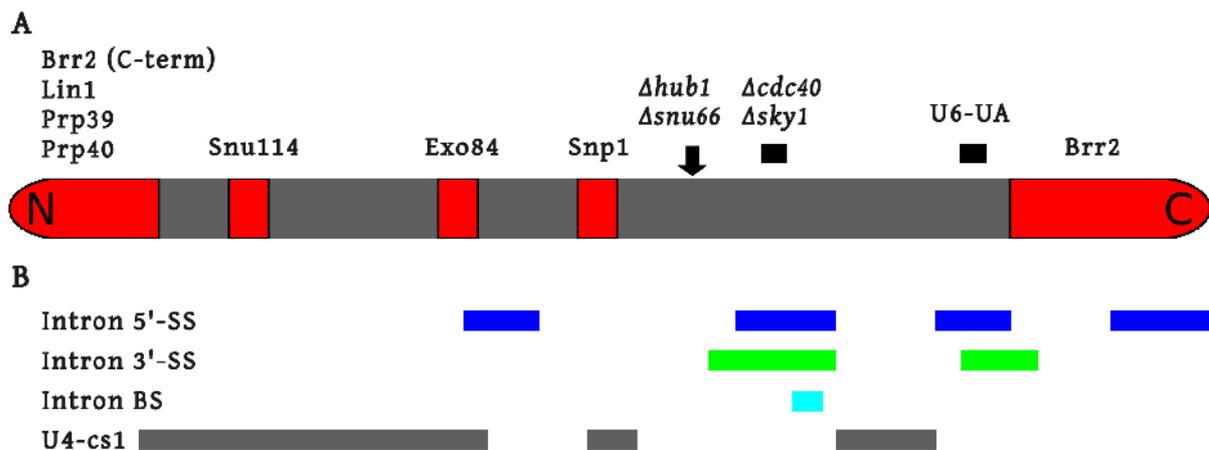
Durch die Mutagenese konnte ein Stamm mit einer Mutation C4151T im essentiellen Splicing-Faktor *PRP8* isoliert werden, die zu einem Austausch einer einzelnen Aminosäure (P1384L) führt. In diesem Stamm wurde eine Funktion von Hub1 nun für das Überleben der Zellen essentiell. Die Charakterisierung von Hub1 durch eine Suche nach genetischen Interaktionen wäre in anderen Modellorganismen (*S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster*) nicht möglich gewesen, da der Verlust von Hub1 in diesen Zellen bereits letal ist.

#### 3.2 Die Mutation P1384L in Prp8

Der Splicing-Faktor Prp8 ist ein zentraler Faktor des U5 snRNPs und für den Mechanismus des Splicings von besonderer Bedeutung. Prp8 wird als Teil des U4/U6.U5 tri-snRNPs an den Komplex A des Spliceosoms gebunden, bzw. bindet als penta-snRNP die prä-mRNS, und ist an der Umformung des Komplex B zum aktiven Spliceosom beteiligt. Über Prp8 interagiert die U5 snRNS mit beiden Spleißstellen des Introns und mit angrenzenden Sequenzen der Exons. Die Bindung der mRNS-Sequenzen bleibt dabei über beide Transesterifikationsschritte erhalten (Newman and Norman 1992; Sontheimer and Steitz 1993; Newman 1997).

Die ersten Hinweise auf funktionelle Bereiche in der Sequenz von Prp8 wurden durch Mutagenese und die Analyse der Wachstumsphänotypen gefunden. Im U4/U6.U5 tri-snRNP sind die U4 snRNS und die U6 snRNS durch Basenpaarung miteinander verbunden und müssen zur Aktivierung des Spliceosoms getrennt werden. Eine Mutation der U4 snRNS (U4-cs1), die die Basenpaarung mit der U6 snRNS stabilisiert, behindert die Funktion der Helikase Brr2 und führt dadurch zu einem Wachstumsdefekt der Zellen bei niedrigen Temperaturen. Es wurden mehrere

Mutationen in Prp8 identifiziert, die diesen Wachstumsdefekt aufheben konnten (Kuhn et al. 1999; Kuhn et al. 2000). Andere Prp8-Mutanten unterdrücken Splicing-Defekte bei Mutationen der 5'- oder 3'-Spleißstelle in Introns (Umen and Guthrie 1996; Collins and Guthrie 1999; Query et al. 2004), oder beeinträchtigen den zweiten Splicing-Schritt bei mutierten 3'-Spleißstellen (Frank et al. 1992; Siatecka et al. 1999). Die Bereiche der beschriebenen Mutationen in Prp8 und deren Auswirkungen werden, zusammen mit den Interaktionsbereichen anderer Splicing-Faktoren (nach Grainger et al. 2005) in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1:** Schema der Interaktionen des Splicing-Faktors Prp8 **A**) Bereiche mit Interaktionen im „two-hybrid“-System (rot) oder synthetisch letalen Mutationen (schwarz) **B**) Bereiche von Mutationen mit einer Reduktion von Splicing-Defekten bei Veränderungen der 5'-Spleißstelle (blau), der 3'-Spleißstelle (grün), der Verzweigungsstelle (türkis) oder der U4 snRNS (grau).

Die Mutation P1384L, die zur synthetischen Letalität bei der Deletion von Hub1 führt, liegt nicht direkt in einem der beschriebenen funktionellen Bereiche von Prp8. Die einzige bekannte Mutation in unmittelbarer Umgebung ist *prp8-C124* (M1399I; Umen et al. 1996), die den Splicing-Defekt einer Veränderung der 3'-Spleißstelle kompensiert. Etwa 200-300 Aminosäuren in Richtung des N-terminus liegt ein Bereich, in dem Mutationen den Wachstumsdefekt der U4-cs1 Mutante aufheben. In der gleichen Entfernung in Richtung des C-Terminus können Mutationen in der Prp8-Sequenz veränderte Konsensussequenzen der 5'- und 3'-Spleißstellen kompensieren, oder führen zu genetischen Interaktionen bei Deletionen von Sky1 oder Cdc40.

Bei der Charakterisierung der Mutation P1384L in Prp8 wurde keine Kompensation des Splittings bei Veränderungen der Intron-Konsensussequenzen beobachtet. Dafür war die Effizienz des Splittings bei ungewöhnlichen 5'-Spleißstellen reduziert. Der Wachstumsdefekt beim Splicing eines *ACT1-CUP1*-Reporterkonstrukts mit der 5'-Spleißstelle GUCUGU konnte durch die Quantifizie-

Die Splicing-Effizienz eines Introns mit einer 5'-Sequenz GUAUAU bestätigt werden (siehe Abbildung 2.9-A und Abbildung 2.10). Der Splicing-Defekt der Prp8-Mutante ist dabei nicht für alle Gene mit veränderter 5'-Konsensussequenz detektierbar (siehe Tabelle 2.2). Interessanterweise wird auch die prä-mRNS von *MUD1* weniger effizient gespleißt, obwohl die 5'-Sequenz des Introns mit der Konsensussequenz GUAUGU übereinstimmt. Bei genauerer Betrachtung der Intronsequenz kann man aber eine überlappende alternative 5'-Spleißstelle erkennen (GUAUGUAUAU; alternative 5'-SS unterstrichen), die einen U5A Austausch enthält, für den bereits ein Splicing-Defekt gezeigt wurde (Abbildung 2.4 und Abbildung 2.10). Dieser Effekt könnte durch die Annahme erklärt werden, dass in der Zelle beide 5'-Spleißstellen bei der Entfernung des Introns benutzt werden und die Mutation in Prp8 nur das Splicing der alternativen Sequenz beeinträchtigt. Dagegen spricht aber eine Verschiebung des Leserahmens, der nach dem Splicing der alternativen 5'-Stelle zu Stopcodons in der kodierenden Sequenz für Mud1 führt. Da diese fehlerhafte mRNA durch NMD wieder aus dem Zytoplasma entfernt werden muss, wäre die Expression von *MUD1* recht ineffizient. Zusätzlich gab es in der Literatur keine Hinweise auf das alternative Splicing von *MUD1*. Eine andere Erklärung für den Splicing-Defekt der *MUD1* prä-mRNS wäre eine fehlerhafte Erkennung der originären 5'-Sequenz des Introns, die dann zum ineffizienten Splicing der alternativen 5'-Spleißstelle führen würde. Die Hypothese, dass Prp8 im Zusammenhang mit dem U4/U6.U5 tri-snRNP an der Erkennung der 5'-Spleißstelle des Introns beteiligt ist, wurde bereits in Hall and Konarska (1992); Kuhn et al. (1999); Maroney et al. (2000) diskutiert. Dieses Modell könnte durch weitere Experimente getestet werden, wenn beispielsweise die Sequenz des *MUD1*-Introns in eines der verwendeten Reporterstrukture eingefügt und die Verschiebung des Leserasters für den Reporter ausgeglichen werden würde.

Nach einer Übertragung der mutierten *PRP8*-Sequenz in den Hefestamm mit dem selben genetischen Hintergrund, der auch für die Bibliothek der Deletionsmutanten verwendet wurde, könnte sowohl die Prp8-Mutante, als auch die Funktion von Hub1 durch die Suche nach weiteren genetischen Interaktionen genauer charakterisiert werden.

### 3.3 Einfluss von $\Delta hub1$ auf die prä-mRNS-Prozessierung

#### 3.3.1 Genetische Interaktionen

Der Verlust von Hub1 führt in Zellen der Linien S288C und W303 nicht zu beobachtbaren Wachstumsdefekten, wie in Lüders et al. (2003) beschrieben wurde. Eine automatisierte Suche nach Genen, deren Deletion Wachstumsdefekten in Zellen ohne Hub1 hervorruft, führte zu mehreren genetischen Interaktionen, die durch manuelle Analyse der Doppelmutanten aber nicht verifiziert werden konnten. Da die darauf folgende Mutagenese eine synthetische Letalität mit einer Mutante des Splicing-Faktors Prp8 ergab und für Mutanten von Hub1 in *S. pombe* sowohl genetische Interaktionen mit Splicing-Faktoren, als auch Splicing-Defekte für bestimmte Gene gezeigt werden konnten (Yashiroda et al. 2004; Wilkinson et al. 2004), wurde manuell gezielt nach weiteren genetischen Interaktionen von Hub1 mit nicht-essentiellen Splicing-Faktoren gesucht. Die generierten Doppelmutanten wurden verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt, insbesondere erhöhter Temperatur, die Defekte im Splicing induzieren kann (Rosbash et al. 1981; Woolford 1989).

Einige Gene, die zu Wachstumsdefekten ohne Hub1 führen (siehe Tabelle 2.1), sind Splicing-Faktoren, die vor der Aktivierung des B-Komplexes, bzw. vor der ersten Transesterifikation an das Spliceosom binden (siehe Abbildung 2.7-A). Snu66 ist ein Bestandteil des U4/U6.U5 tri-snRNP, der bei der Umlagerung der Komplexe zur Aktivierung des Spliceosoms dissoziiert (Stevens et al. 2001). Isy1 und Ntc20 gehören zu einem Proteinkomplex um Prp19 (NTC), der nach der Dissoziation des U4 snRNPs die Bindung der snRNPs U5 und U6 an die prä-mRNS stabilisiert (Chen et al. 2006). Cwc21, Ecm2 und Bud13 sind Proteine in einem Komplex um Cef1, der ebenfalls mit Prp19 interagieren kann, für den neben dem Splicing auch Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus gefunden wurden (Tsai et al. 1999; Ben-Yehuda et al. 2000; Ohi and Gould 2002). Für Urn1 wird eine Assoziation mit mehreren Ribonukleoproteinkomplexen, jedoch keine spezifische Funktion beschrieben (Hesselberth et al. 2006; Oeffinger et al. 2007). Eine automatisierte Analyse der genetischen Interaktionen von nicht-essentiellen Splicing-Faktoren wurde erst kürzlich veröffentlicht und verdeutlicht die extreme Vernetzung der einzelnen Faktoren untereinander (Wilmes et al. 2008). Da in dieser Analyse kein Hub1-Deletionsstamm verwendet wurde, können die Daten dieser Arbeit damit nicht verifiziert werden.

Die Komplexe um Prp19 und Cef1 binden an das aktivierte Spliceosom, nachdem die sn-RNPs U1 und U4 den Komplex verlassen haben. In dieser Form des Spliceosoms interagieren die sn-Ribonukleinsäuren U5 und U6 durch Basenpaarungen, die sich durch einen Versatz um 5 Basen unterscheiden (Sawa and Abelson 1992; Lesser et al. 1993a; Johnson and Abelson 2001). Der NTC induziert dabei den Wechsel der U5/U6 Basenpaarungen und stabilisiert damit sowohl die Bindung des 3' Endes der U6 snRNS an das Intron, als auch die Bindung der U5 snRNS an die 5'-Spleißstelle (Chan et al. 2003; Chan et al. 2005). Damit trägt der Komplex um Prp19 zu einer effizienteren Erkennung der 5'-Spleißstelle des Introns bei. Da bereits das humane Hub1-Homologe in den spliceosomalen Komplexen B und B\* gefunden wurde (Makarov et al. 2002; Deckert et al. 2006; Bessonov et al. 2008), aber nicht in im Komplex C, könnte Hub1/Ubl5 an der Umformung spezifischer Unterkomplexe des Spliceosoms beteiligt sein.

### 3.3.2 prä-mRNS-Retention

Sobald Splicing-Komponenten an der 5'-Sequenz des Introns einer prä-mRNS gebunden haben, wird dieser Komplex im Zellkern zurückgehalten, und so der Export der ungespleißten prä-mRNS ins Zytoplasma verhindert (Legrain et al. 1989; Rain and Legrain 1997). Die Komponenten dieses Systems können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe enthält Proteine, die an der Bindung der prä-mRNS beteiligt sind, und damit auch die Effizienz des Splicings beeinflussen (Gottschalk et al. 2001; Spingola et al. 2004; Dziembowski et al. 2004; Wang et al. 2005). Die andere Gruppe von RES-Faktoren ist an der Erkennung der prä-mRNS/Spliceosom-Komplexe beteiligt und interagiert mit Komponenten der Kernpore, um diese Komplexe am Export zu hindern (Galy et al. 2004; Palancade et al. 2005). Die Faktoren Pml1, Ist3 und Bud13 der ersten Gruppe formen einen eigenen Komplex, dessen Struktur vor Kurzem beschrieben werden konnte (Brooks et al. 2008; Trowitzsch et al. 2008). Bud13 und Ist3 sind ebenfalls essentiell für das Splicing von meiosispezifischen Genen (Spingola et al. 2004; Scherrer et al. 2006), während für Pml1 keine weitere Funktion im Splicing beschrieben wurde.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Hub1 mit Pml1 und Bud13 genetisch interagiert, aber nicht mit Ist3 oder Faktoren des RES an der Kernpore (siehe Abbildung 2.11). Die Deletion von Hub1 führt zu einem Verlust der Exportkontrolle von ungespleißter prä-mRNS, der mit der Deletion eines der RES-Faktoren vergleichbar ist (siehe Abbildung 2.12-B). Der verstärkte Export von ungespleißter prä-mRNS ist dabei keine unmittelbare Folge der reduzierten Splicing-Effizienz, da im *AMA1-CUP1*-Reportersystem das Splicing der prä-mRNS ohne Nam8 vollständig verhindert wird, aber in diesem Stamm die Exportkontrolle wie im Wildtyp funktioniert (siehe Abbildung

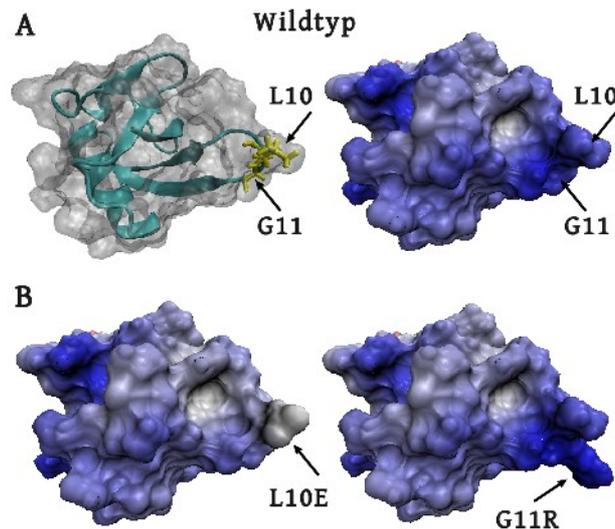
2.9-B und Abbildung 2.12-A). Ohne konstitutive Expression von Mer1, das an eine konservierte Sequenz des *AMA1*-Introns bindet und weitere Splicing-Komplexe rekrutiert (Spingola et al. 2000), wurde der Export des ungespleißten Reporterkonstrukts in keinem der getesteten Stämme verhindert. Der erhöhte prä-mRNS-Export ohne Hub1 könnte also durch eine reduzierte Effizienz bei der Erkennung von Introns in der prä-mRNS erklärt werden.

### 3.4 Charakterisierung der Hub1-Mutanten

Mit der P1384L-Mutation in Prp8 stand nun ein Versuchssystem zur Verfügung, mit dem sich der Verlust der Funktion von Hub1 nach der Mutagenese eindeutig und schnell detektieren ließ. Durch die C-terminale Fusion eines Selektionsmarkers konnten Basenaustausche zu vorzeitigen Stopcodons in der *HUB1*-Sequenz vermieden werden. Es wurden 35 einzelne Mutationen in der Aminosäuresequenz von Hub1 generiert, die die Funktion des Hub1-*klTrp1*-Fusionsproteins beeinträchtigten. Dies entsprach etwa 40 % der möglichen Positionen in Hub1. Die Mutagenese der *HUB1*-Sequenzen verlief entsprechend ihrer Optimierung, denn nur etwa 17 % der Mutanten besaß mehr als zwei Basenaustausche. Etwa 36 % der selektierten Mutanten waren redundant, d.h. es wurden mehrfach Aminosäureaustausche an der selben Position gefunden. Eine Erhöhung der Zahl der getesteten Kolonien hätte vermutlich das Spektrum der gefundenen Mutationen erweitert, die zum Funktionsverlust von Hub1 führen, was aber auch eine höhere Redundanz in den Mutationen zur Folge gehabt hätte.

Dieses Set der Hub1-Mutanten wurde zuerst auf ihre Stabilität geprüft (siehe Abbildung 2.15). Die detektierten Proteinmengen waren zwar systembedingten Schwankungen unterlegen, doch auffällig starke Reduktionen der zellulären Proteinkonzentration mancher Mutanten konnten durch erhöhten proteolytischen Abbau in der Zelle erklärt werden und lassen auf eine inkorrekte Struktur der Proteine schließen (siehe Abbildung 2.16). Die strukturelle Instabilität war nicht direkt mit dem Verlust der Funktion verbunden, da die Mutationen E58V/D, Y60H und E69K einerseits kaum detektierbare Antikörpersignale erzeugten, andererseits ihre Funktion bei der Komplementation der synthetischen Letalität behielten (siehe Abbildung 2.20). Der Funktionsverlust der Mutationen E3G und V50G durch strukturelle Instabilität kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die mit der Prp8-Mutante synthetisch letalen Hub1-Mutationen können in der Tertiärstruktur von Hub1 in verschiedenen Bereiche eingeteilt werden. Das hydrophobe Leuzin 10 ragt am Ende des  $\beta_1$ -Faltblatts relativ weit ins wässrige Medium, liegt in einem Bereich mit positiver Partiaalladung und könnte mit der benachbarten hydrophoben Tasche einen Interaktionsbereich mit anderen Proteinen darstellen (Abbildung 3.2-A). Die Mutation dieses Restes zu Glutamat neu-

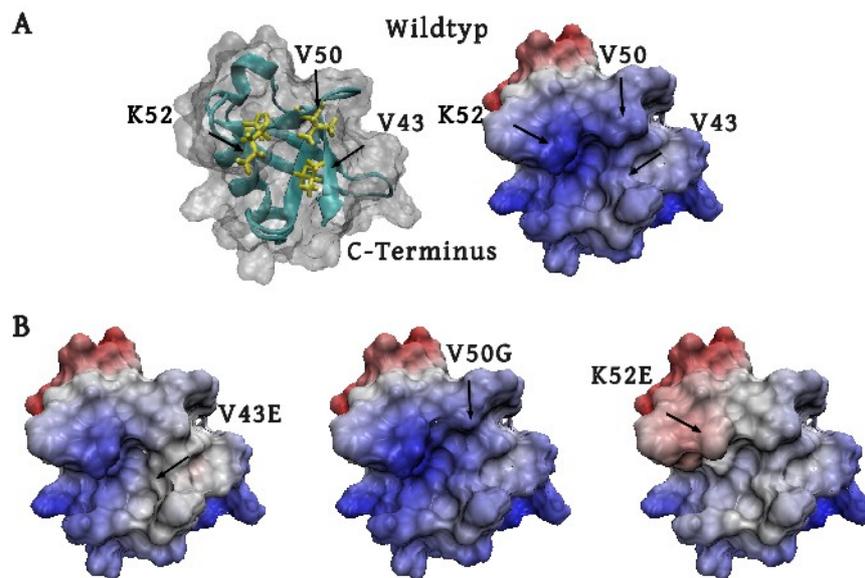
tralisiert die Partiaalladung und würde so die Interaktion stören. Ähnliche Auswirkungen hätte die Mutation des Glyzins 11 zu Arginin, die einerseits die positive Ladung des Gebiets verstärkt, aber durch den voluminösen Aminosäurerest eine Interaktion mit externen Faktoren sterisch behindern könnte (Abbildung 3.2-B).



**Abbildung 3.2:** Tertiärstruktur von Hub1 und einzelnen Mutanten in raumfüllender Darstellung.

**A)** Wildtyp Hub1 **B)** Hub1-Mutanten L10E und G11R; grün = Proteinerückgrad in schematischer Darstellung; gelb = Aminosäuren L10 und G11; weiß = unpolare Bereiche; blau = Bereiche mit positiver Partiaalladung

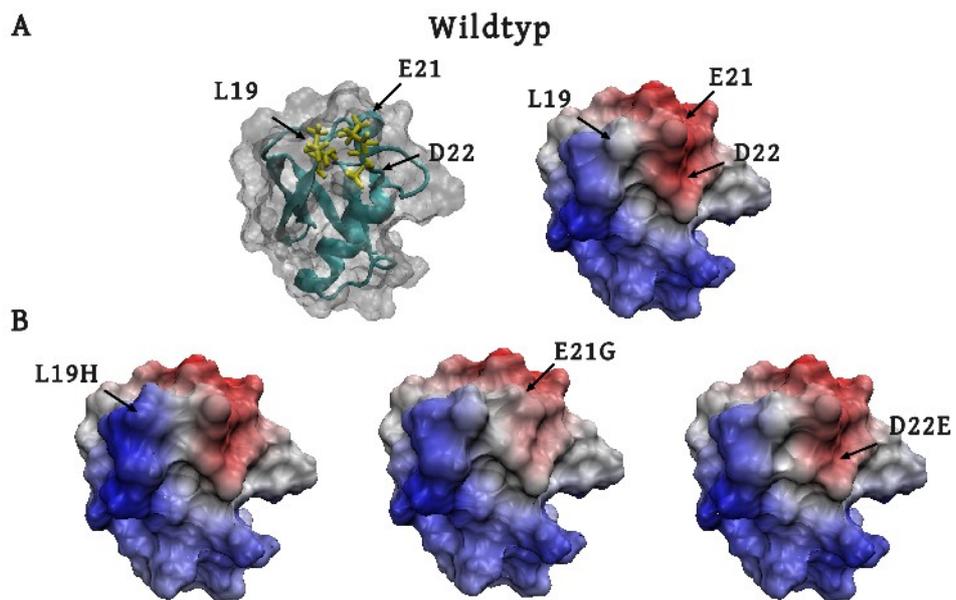
Die nicht-funktionellen Mutationen V34E, V50G und K52E spannen einen weiteren Bereich auf der Oberfläche von Hub1 auf, in dem eine mögliche Interaktion mit externen Faktoren stattfinden könnte. Das Valin an der Position 43 ähnelt dem Isoleuzin 44 von Ubiquitin, eingebettet in einen hydrophoben Bereich, der durch mehrere interagierende Proteine kontaktiert wird (Sloper-Mould et al. 2001; Fisher et al. 2003; Hurley et al. 2006). Das Valin an der Position 50 würde ebenfalls eine hydrophobe Kontaktstelle darstellen, während die positive Ladung des Lysinrestes 52 ebenfalls zu einer Interaktion beitragen könnte (Abbildung 3.3-A). In der Mutante V43E wird diese mögliche Bindungstasche durch die zusätzliche negative Partiaalladung beeinflusst und hydrophobe Wechselwirkungen mit diesem Aminosäurerest wären stark beeinträchtigt. Der Austausch von Valin 50 zu Glyzin führt zum Verlust der hydrophoben Seitenkette, die sowohl interne, als auch externe hydrophobe Interaktionen verhindern könnte. Durch den Austausch des Lysins 50 nach Glutamat ändert dieser Bereich seine Partiaalladung und würde von interagierenden Proteinen nicht mehr erkannt werden (Abbildung 3.3-B).



**Abbildung 3.3:** Tertiärstruktur von Hub1 und einzelnen Mutanten in raumfüllender Darstellung.

**A)** Wildtyp Hub1 **B)** Hub1-Mutanten V43E, V50G und K52E; grün = Proteinrückgrad in schematischer Darstellung; gelb = Aminosäuren V43, V50 und K52; weiß = unpolare Bereiche; blau = Bereiche mit positiver Partiaalladung; rot = Bereiche mit negativer Partiaalladung

Für den dritten Bereich der Mutationen, die die Funktion von Hub1 bei der synthetischen Letalität mit der Prp8-Mutante beeinträchtigen, konnte ein Einfluss auf die Interaktion mit dem Splicing-Faktor Snu66 gezeigt werden. Die Bindung an Snu66 ist in *S. pombe* und menschlichen Zellen konserviert, nicht kovalent und wurde bei *S. pombe* auf den N-terminus von Snu66 eingegrenzt. Dieses System wurde mit den homologen Proteinen der Bäckerhefe bestätigt (Abbildung 2.5-B) und für die Charakterisierung der Hub1-Mutanten genutzt. Die Aminosäurereste 19, 21 und 22 liegen im Übergang des Faltblatts  $\beta_2$  zur Helix  $\alpha_1$ . Das hydrophobe Leuzin 19 weist ebenfalls ins umgebende wässrige Medium, während das Glutamat 21 und Aspartat 22 zu einer relativ starken negativen Partiaalladung dieses Bereichs beitragen. Der Aminosäurerest des Aspartats weist dabei in die Richtung der möglichen Bindungstasche (Abbildung 3.4-A). Die Mutationen des Leuzins 19 zu Prolin könnte zu einer Einschränkung der strukturellen Beweglichkeit dieses Bereichs führen, während der Austausch des Leuzins zu Histidin einen Teil der negativen Partiaalladung kompensiert. Eine Verringerung der negativen Ladung erfolgt auch durch den Austausch des Glutamats 21 zu Valin oder Glyzin. Die Mutation des Aspartats 22 zu Glutamat verändert die Ladungsverteilung dieses Bereichs nicht, füllt aber durch den längeren Aminosäurerest die mögliche Bindungstasche aus (Abbildung 3.4-B).



**Abbildung 3.4:** Tertiärstruktur von Hub1 und einzelnen Mutanten in raumfüllender Darstellung.

**A)** Wildtyp Hub1 **B)** Hub1-Mutanten L19H, E21G und D22E; grün = Proteinrückgrad in schematischer Darstellung; gelb = Aminosäuren L19, E21 und D22; weiß = unpolare Bereiche; blau = Bereiche mit positiver Partialladung; rot = Bereiche mit negativer Partialladung

### 3.5 Ausblick

Die Rolle von Hub1 im prä-mRNS-Splicing konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit auch für das Modellsystem *S. cerevisiae* bestätigt, und auf einen Bereich vor der Katalyse des zweiten Splicing-Schritts eingegrenzt werden. Zellen ohne Hub1 zeigen sowohl eine reduzierte Effizienz beim Splicing von Introns mit veränderten 5'-Spleißstellen, als auch eine Störung des prä-mRNS-Rückhaltesystems (RES). Hub1 interagiert genetisch mit einer Mutation im Splicing-Faktor Prp8, die ebenfalls zu Splicing-Defekten bei ungewöhnlichen 5'-Intronsequenzen führt, und mit Genen, die vor dem ersten Splicing-Schritt an der Erkennung des Introns und der Aktivierung des Spliceosoms beteiligt sind. Dies deutet auf eine Funktion von Hub1 bei der Erkennung der 5'-Spleißstelle oder der Stabilisierung, bzw. Destabilisierung von Proteinkomplexen bei Umlagerungen innerhalb des Spliceosoms hin. Im Unterschied zu *S. cerevisiae* wird die Selektion der Spleißstellen in höheren Eukaryonten von Proteinen mit Serin/Arginin-Bereichen in ihrer Sequenz (SR-Proteine) beeinflusst (Long u. a. 2009). Die Funktion der SR-Proteine im alternativen Splicing wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Kinasen der LAMMER-Familie (Clk/STY) sind durch die Phosphorylierung ihrer Substrate an dieser Regulation beteiligt (Hagiwara 2005). Da bereits das humane Homologe zu Hub1 (Ubl5) in spliceosomalen Komplexen gefunden wurde und mit solchen Kinasen interagiert (Collier et al. 2000; Kantham et al. 2003), könnte Hub1/Ubl5 über die Regulation der Kinaseaktivität an der Regulation des Splicings beteiligt sein. Kns1 gilt in *S. cerevisiae* als homologe LAMMER-Kinase und interagiert ebenfalls mit Hub1 (G. Dittmar, unveröffentlicht). Die Vielfalt der Signalwege, mit der die Zelle auf intra- oder extrazelluläre Zustandsänderungen reagieren kann, und deren Überschneidung, könnte einerseits die gefundenen stressabhängigen Änderungen der genetischen Interaktionen mit Splicing-Komponenten mit Hub1 erklären, und andererseits die Schwierigkeit verdeutlichen, spezifische Effekte (*HUB1/Δhub1*) in einem komplexen System wie dem Spliceosom zu detektieren. Die Suche nach möglichen Funktionen von Hub1/Ubl5 würde dabei stark von der Charakterisierung weiterer Interaktionspartner profitieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### 4.1.1 Bakterienstämme

Für die Klonierung und Expression von Proteinen wurden Zellen des Stamms XL1-Blue (Stratagene) verwendet. Die Klonierung durch das Gateway®-System (Invitrogen) und die Erstellung der Zielvektoren wurden die Stämme DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> und DB3.1 (beides Invitrogen) benutzt.

#### 4.1.2 Hefestämme

Die Manipulation und Analyse, der in Tabelle 4.1 aufgelisteten Hefestämme, erfolgte nach molekularbiologischen Standardmethoden (Ausubel et al. 1989; Guthrie and Fink 1991). Deletion und Modifikation von Hefegenen erfolgten durch die Integration von Konstrukten aufgrund homologer Rekombination (Longtine et al. 1998). Die dabei verwendeten Plasmide und Oligonukleotide werden am Anfang der jeweiligen Experimente beschrieben.

**Tabelle 4.1:** In dieser Arbeit verwendete Hefestämme

Name	Basis	Genotyp / Änderung	Referenz
W303-1A		MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 phi+	Thomas u. a. 1989
W303-1B		MAT $\alpha$ leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 phi+	Thomas u. a. 1989
BY4741		MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Brachmann u. a. 1998
BY4742		MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0	Brachmann u. a. 1998
pJ69-4 $\alpha$		MAT $\alpha$ trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 $\Delta$ gal80 $\Delta$ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	James u. a. 1996
JDY8.05		MATa prp8 $\Delta$ ::LEU2 ura3-52 leu2-3 trp1-289 ade2-1 his3-200 pJDY13 [GAL1-PRP8 HIS3 CEN ARS]	Brown u. a. 1992
yGD139	DF5	MATa hub1 $\Delta$ ::HIS3	G. Dittmar
yGD141	W303	MATa hub1 $\Delta$ ::HIS3	G. Dittmar
yGD521	BY4741	hub1 $\Delta$ ::natMX4	G. Dittmar
yMD039	W303	MATa hub1 $\Delta$ ::HIS3 ade3 $\Delta$ ::kanMX4 pMD004 [HUB1 ADE3 URA3 CEN ARS]	diese Arbeit
13-115	W303	MATa prp8(P1384L) hub1 $\Delta$ ::HIS3 ade3 $\Delta$ ::kanMX4 pMD004 [HUB1 ADE3 URA3]	diese Arbeit
yMD149	W303	MATa/ $\alpha$ snu66::natMX4/SNU66 hub1::HIS3/HUB1	diese Arbeit
yMD330	W303	MATa/ $\alpha$ hub1 $\Delta$ ::HIS3/HUB1, ade3 $\Delta$ ::kanMX6/ADE3, prp8(P1384L)/PRP8	diese Arbeit
yMD348	W303	MATa prp8(P1384L)	diese Arbeit
yMD352	W303	MAT $\alpha$ prp8(P1384L)	diese Arbeit
yMD355	W303	MATa kanMX4-pGALL-HUB1 prp8(P1384L)	diese Arbeit
yJU75		MATa ade2 cup1 $\Delta$ ::ura3 his3 leu2 lys2 prp8 $\Delta$ ::LYS2 trp1; pJU169	Umen u. a. 1996
yNM540	yJU75	MATa hub1 $\Delta$ ::natMX4	N. Martinez-Marshall
yMD460	yJU75	MATa prp8(P1384L)	diese Arbeit

KH46		<i>MAT<math>\alpha</math> cup1::ura3-52 trp1 leu2-3,112 his3-1 lys2 ade2-101 GAL+</i>	Spingola u. a. 2000
KH46- $\Delta$ nam8		<i>MAT<math>\alpha</math> nam8<math>\Delta</math>::His3MX6</i>	Spingola u. a. 2000
KH46- $\Delta$ hub1	KH46	<i>MAT<math>\alpha</math> hub1<math>\Delta</math>::His3MX6</i>	diese Arbeit
PRP19-TAP	BY4741	<i>PRP19-TAP</i>	Ghaemmaghami u.a. 2003
PRP19-TAP $\Delta$ hub1	BY4741	<i>PRP19-TAP-HIS3MX6 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ brr1	BY4742	<i>brr1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ bud13	BY4742	<i>bud13<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ bud31	BY4742	<i>bud31<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cbc2	BY4742	<i>cbc2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cbp2	BY4742	<i>cbp2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cdc40	BY4742	<i>cdc40<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cus2	BY4742	<i>cus2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cwc15	BY4742	<i>cwc15<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cwc21	BY4742	<i>cwc21<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ cwc27	BY4742	<i>cwc27<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ dbr1	BY4742	<i>dbr1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ ecm2	BY4742	<i>ecm2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ hmt1	BY4742	<i>hmt1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ hub1	BY4742	<i>hub1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ ist3	BY4742	<i>ist3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ isy1	BY4742	<i>isy1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ lea1	BY4742	<i>lea1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ lin1	BY4742	<i>lin1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ lsm6	BY4742	<i>lsm6<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ lsm7	BY4742	<i>lsm7<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ mer1	BY4742	<i>mer1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ mlp1	BY4742	<i>mlp1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ mlp2	BY4742	<i>mlp2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ msl1	BY4742	<i>msl1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ mud1	BY4742	<i>mud1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ mud2	BY4742	<i>mud2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ nam8	BY4742	<i>nam8<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ npl3	BY4742	<i>npl3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ ntc20	BY4742	<i>ntc20<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ nup60	BY4742	<i>nup60<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ pml1	BY4742	<i>pml1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ pml39	BY4742	<i>pml39<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ prp18	BY4742	<i>prp18<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ sky1	BY4742	<i>sky1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ snt309	BY4742	<i>snt309<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ snu66	BY4742	<i>snu66<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ sto1	BY4742	<i>sto1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ syf2	BY4742	<i>syf2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ urn1	BY4742	<i>urn1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	Winzeler u. a. 1999
$\Delta$ brr1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>brr1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ bud13 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>bud13<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ bud31 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>bud31<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cbc2 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cbc2<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cbp2 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cbp2<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cdc40 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cdc40<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cus2 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cus2<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cwc15 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cwc15<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cwc21 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cwc21<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cwc27 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>cwc27<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ dbr1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>dbr1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ ecm2 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>ecm2<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ hmt1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>hmt1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ ist3 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>ist3<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ isy1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>isy1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ lea1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>lea1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta$ lin1 $\Delta$ hub1	BY4742	<i>lin1<math>\Delta</math>::kanMX4 hub1<math>\Delta</math>::natMX4</i>	diese Arbeit

$\Delta$ lsm6 $\Delta$ hub1	BY4742	lsm6 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ lsm7 $\Delta$ hub1	BY4742	lsm7 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ mer1 $\Delta$ hub1	BY4742	mer1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ mlp1 $\Delta$ hub1	BY4742	mlp1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ mlp2 $\Delta$ hub1	BY4742	mlp2 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ msl1 $\Delta$ hub1	BY4742	msl1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ mud1 $\Delta$ hub1	BY4742	mud1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ mud2 $\Delta$ hub1	BY4742	mud2 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ nam8 $\Delta$ hub1	BY4742	nam8 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ npl3 $\Delta$ hub1	BY4742	npl3 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ ntc20 $\Delta$ hub1	BY4742	ntc20 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ nup60 $\Delta$ hub1	BY4742	nup60 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ pml1 $\Delta$ hub1	BY4742	pml1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ pml39 $\Delta$ hub1	BY4742	pml39 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ prp18 $\Delta$ hub1	BY4742	prp18 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ sky1 $\Delta$ hub1	BY4742	sky1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ snt309 $\Delta$ hub1	BY4742	snt309 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ snu66 $\Delta$ hub1	BY4742	snu66 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ sto1 $\Delta$ hub1	BY4742	sto1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ syf2 $\Delta$ hub1	BY4742	syf2 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit
$\Delta$ urn1 $\Delta$ hub1	BY4742	urn1 $\Delta$ ::kanMX4 hub1 $\Delta$ ::natMX4	diese Arbeit

#### 4.1.3 Plasmide

Die Erstellung der in Tabelle 4.2 aufgelisteten Plasmide wird am Anfang des jeweiligen Experiments genauer beschrieben. Die Modifikation von DNS erfolgte nach den Protokollen in Ausubel et al. (1989).

**Tabelle 4.2:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Basis	Selektion	Beschreibung	Referenz
pBluescript KS(-)	<i>E.coli</i>	AmpR	Klonierungsvektor	Short u. a. 1988
pFA6-kanMX6	<i>E.coli</i>	AmpR	kanMX6	Wach u. a. 1994
pAG25	<i>E.coli</i>	AmpR	natMX4	Goldstein u. a. 1999
pYM2	<i>E.coli</i>	AmpR	3HA-His3MX6	Knop u. a. 1999
pYM-N26	<i>E.coli</i>	AmpR	kanMX4-pGALL	Knop u. a. 1999
pDONR221	<i>E.coli</i>	KanR CmR	ccdB attP1/2	Invitrogen
pDESTco	<i>E.coli</i> Expr.	AmpR CmR	6His lacI ccdB attR1/2	Scheich u. a. 2007
pGEX4T-1	<i>E.coli</i> Expr.	AmpR	GST lacI	D. B. Smith u. a. 1988
pRS413	CEN ARS	AmpR HIS3	Klonierungsvektor	Sikorski u. a. 1989
pRS414	CEN ARS	AmpR TRP1	Klonierungsvektor	Sikorski u. a. 1989
pRS415	CEN ARS	AmpR LEU2	Klonierungsvektor	Sikorski u. a. 1989
pRS416	CEN ARS	AmpR URA3	Klonierungsvektor	Christianson u. a. 1992
pOAD1	CEN ARS	AmpR LEU2	pADH1 GAL4(AD)	Hudson u. a. 1997
pOBD2	CEN ARS	AmpR TRP1	pADH1 GAL4(BD)	Uetz u. a. 2000
pGD83	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 FLAG-HUB1	G. Dittmar
pGD85	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 FLAG-6HIS-HUB1	G. Dittmar
pGD99	2u	AmpR TRP1	pCUP1 HA-6His-HUB1	G. Dittmar
pGD131	CEN ARS	AmpR LEU2	HUB1	G. Dittmar
pGD218	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 FLAG-HUB1-3myc	diese Arbeit
pGD240	2u	AmpR LEU2	pADH1 GAL4(AD)-HUB1	diese Arbeit
pGD243	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 FLAG-HUB1-ProA	diese Arbeit
pGD244	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 FLAG-HUB1-FLAG	diese Arbeit

pGD251	CEN ARS	AmpR CmR TRP1	pHUB1 attR1 ccdB	diese Arbeit
pMD004	CEN ARS	AmpR URA3	HUB1 ADE3	diese Arbeit
pMD019	E.coli	AmpR	HUB1-3xGLY-klTRP1	diese Arbeit
pMD022	CEN ARS	AmpR LEU2 klTRP1	HUB1-3xGLY-klTRP1	diese Arbeit
pMD027	CEN ARS	AmpR HIS3	pHUB1 (o. ATG) 3xGLY-klTRP1	diese Arbeit
pMD029	CEN ARS	AmpR LEU2	PRP8	Hieter YGL
pMD055	CEN ARS	AmpR TRP1	HUB1-Val-Asp	diese Arbeit
pMD127	E.coli Expr.	AmpR	GST-SNU66(aa1-107) lacI	diese Arbeit
pMD139-150, 163-186	E.coli	KanR	HUB1 (+ Mutanten) attL1/2	diese Arbeit
pMD151-162, 192-210	E.coli Expr.	AmpR	6HIS-HUB1 (+ Mutanten) lacI attP1/2	diese Arbeit
pMD211 - 246	CEN ARS	AmpR TRP1	HUB1 (+ Mutanten) attP1/2	diese Arbeit
pMD283	2μ	AmpR URA3	pGAL1/10 SNU66(aa1-371)	diese Arbeit
pMD284	2μ	AmpR TRP1	pGAL4 10xHIS-HA-HUB1	diese Arbeit
pMD285	2μ	AmpR TRP1	pGAL4 10xHIS-HA-HUB1(E58V)	diese Arbeit
pMD290	CEN ARS	AmpR CmR URA3	pHUB1 ccdB attR1/2	diese Arbeit
pMD304-339	CEN ARS	AmpR URA3	HUB1 (+ Mutanten) attP1/2	diese Arbeit
pMR07-28, 30-33, 35-44	CEN ARS	AmpR LEU2	pADH1 GAL4(AD)-HUB1 (+ Mutanten)	diese Arbeit
pMR29	CEN ARS	AmpR TRP1	pADH1 GAL4(BD)-SNU66	diese Arbeit
pCH1	CEN ARS	AmpR LEU2	pCUP1 HUB1-eGFP	diese Arbeit
pSV52	2μ	AmpR TRP1	pGAL4 10xHIS-HA	S. Sadis
pTX180	2μ	AmpR URA3	pGAL1/10	E. Jarosch
pCC-71	2μ	AmpR LEU2	ACT1-CUP1 (wt)	Liu u. a. 2007
pMA-A3C	2μ	AmpR LEU2	ACT1-CUP1 (5'SS-A3C)	Liu u. a. 2007
pMA-BS-C	2μ	AmpR LEU2	ACT1-CUP1 (BS-C)	Liu u. a. 2007
pMM-41	2μ	AmpR LEU2	ACT1-CUP1 (3'SS-UUG/)	Liu u. a. 2007
PRS316-AMA1-CUP1	2μ	AmpR URA3	AMA1-CUP1 (wt)	Spingola u. a. 2000
pRS316-CF7B-G1A	2μ	AmpR URA3	AMA1-CUP1 (Export Rep.)	Scherrer u. a. 2006
R1070	2μ	AmpR TRP1	MER1 Guarente u. a. 1982	Engbrecht u.a. 1991
pLGS5	2μ	AmpR URA3	CYC1'-lacZ (o. Intron)	Guarente u. a. 1982
pHZ18	2μ	AmpR URA3	CYC1'-lacZ (wt Intron)	Teem u. a. 1983
pHZ12	2μ	AmpR URA3	CYC1'-lacZ (5'SS-G5A)	Jacquier u. a. 1985
pHZ8	2μ	AmpR URA3	CYC1'-lacZ (BS-C)	Jacquier u. a. 1985
Plint-Nde°-Acc°	2μ	AmpR URA3	CYC1'-lacZ (Export Rep.)	Legrain u. a. 1989

#### 4.1.4 Oligonukleotide

**Tabelle 4.3:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Funktion
Rub2-1f	cccccccaggatccATGATTGAGGTAGTTGTGAATGACCG	BamHI HUB1 vorw.
Rub2-1r	cccccccgaagcttCTACAGGTAATACAGCTTC	HindIII HUB1 rückw.
HBR	tcttccccatcggtgatgctc	YGL Seq. rückw.
HBV	agtctgctcgcttcgcta	YGL Seq. vorw.
oGD163	ccccccgaattcATGATTGAGGTAGTTGTGAA	EcoRI HUB1 vorw.
oGD202	GAGAAAAGAGGAGCGGTGGCAAAGCTTAGATTGCAAATAAATACTCT-GAAAATGcgtacgctgcaggtcgac	Promotorwechsel für HUB1 vorw.
oGD203	TTCACTCTGACTTTTTTGCCATAATCGGTCATTCACAACCTCAATcatc-gatgaattctctgtcg	Promotorwechsel für HUB1 rückw.
oGD67	GAGAAAAGAGGAGCGGTGGCAAAGCTTAGATTGCAAATAAATACTCT-GAAAcagctgaagcttcgtacgc	Δhub1:: vorw.
oGD68	AAATGTATGTATTGTGTATTTAGATCAAAAAAAAAAAAAACAGCG-CATTTTgcatagccactagtggatctg	Δhub1:: rückw.
oLJ13	CTACTGGTCTAGCAAGAAAAGGG	RT-PCR ERG1 vorw.
oLJ14	CTCAATGCTCTAACACCACC	RT-PCR ERG1 rückw.
oMR1	gaagatacccccaaaacccccaaaaaagagatcgaattccagctgaccacc-ATGAACAAAACGGAAAACCT	SNU66 für pOBD2 vorw.
oMR2	ctacgattcatagatctctgcaggtcgacggatccccgggaattgccatg-TTAATTGTCATCAAATTC	SNU66 für pOBD2 rückw.

oMD078	CCCCGAGCTCctggctgcatcgtttaaatgc	SacI pHUB1 vorw.
oMD079	CCCCGAATTCcttactaacaatagaaaagc	EcoRI tHub1
oMD082	tgagaccaggtgagaccaggtaacgagacgaacacaactttacaagtcaaataagaatc- CAGCTGAAGCTTCGTACGC	Δade3:: vorw.
oMD083	aaaaaaacttttgcatttgtctttataaattctatataattaagttgtc- GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Δade3:: rückw.
oMD084	aaacgacggccagtgagcgcgcgtaatacagactcactatagggcgaattgtctagaTC- CAGGTAGTGGATGTGCGAG	pADE3 homologe Rekombination vorw.
oMD085	ATGCTTTTCTATTGTTTAGTAAAGgaattcगतatcaagcttatcgatacccc- cgggGTCGCGGAACGTTAAATCCCC	tADE3 homologe Rekombination rückw.
oMD147	ccccctcgacCAGGTAATACAGCTCCAAATTTG	SalI HUB1 (o. STOP) rückw.
oMD148	ccccctcgacGGTGGTCTCGTTAAAGTGTGTGGTTTG	SalI 3xGLY-(o. ATG)-klTRP1 vorw.
oMD149	ccccctcgagCTATTGAGAGGCCCTGCTG	XhoI klTRP1 rückw.
oMD150	ccccctcgagAAAATGCGCTGTTTTTTTTTTTTTTG	XhoI tHUB1 vorw.
oMD151	cccccgggcccCTACTAAACAATAGAAAAGCATTATAGAG	ApaI tHUB1 rückw.
oMD153	TCAGCACCATCATCCACAGCAG	pHUB1 (80bp vor HUB1) vorw.
oMD156	ccccctcgacCTACAGGTAATACAGCTCCAAATTTG	SalI HUB1 rückw.
oMD159	GATGAGGAGGAGAGGAAAAGATTG	klTRP1 (80bp nach HUB1) rückw.
oMD160	ccccctcgacTAATTAGCTGAAAAATGCGCTGTTTTTTTTTTTTTTG	SalI STOP-tHUB1 vorw.
oMD163	ACTTGTGCGATTGAACTTCC	PRP8 Teil I vorw.
oMD164	CGTACTCCTCATCGTTCTGG	PRP8 Teil I rückw.
oMD165	GCGAATATAAGGTAGCGTTTCC	PRP8 Teil II vorw.
oMD166	ATACCCAGGCATCAGCTTTG	PRP8 Teil II rückw.
oMD167	GGCTTGAGATGTTGGAAGG	PRP8 Teil III vorw.
oMD168	CGTCCTGACGTATTAGCCTC	PRP8 Teil III rückw.
oMD169	TTGGCAGAGAATCCAGATCC	PRP8 Teil IV vorw.
oMD170	ACCGACATAGACATTTGCTC	PRP8 Teil IV rückw.
oMD171	ACTCATGCTCAAAGAACTGG	PRP8 Teil V vorw.
oMD172	TCATTTTGGCACTTTCCTCG	PRP8 Teil V rückw.
oMD173	GGTTAGACCGTATTTTCATCG	PRP8 Teil VI vorw.
oMD174	GACGGGCATAAAAAATGCGTTG	PRP8 Teil VI rückw.
oMD177	GAAAATTTACTGAATTAACAATGGATTCTG	RT-PCR ACT1 vorw.
oMD178	GGATTGAGCTTCATCACCAC	RT-PCR ACT1 rückw.
oMD208	ccccgatccATGAACAAAACGGAAAACCTTTC	BamHI SNU66(aa1-107) vorw.
oMD209	ccccgaattcttaACTGTCGTCATTTACATTAGTTTC	EcoRI Snu66(aa1-107) rückw.
oMD214	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctATGATTGAGGTAGTTGTGAAT	attB1-HUB1 vorw.
oMD215	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACAGGTAATACAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1 rückw.
oMD226	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctATGATTGGGGTAGTTGTGAAT	attB1-HUB1(E3G) vorw.
oMD227	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctATGATTGAGGTAGTTGTGAGT	attB1-HUB1(N7S) vorw.
oMD228	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctATGATTGAGGTAGTTGTGATT	attB1-HUB1(N7I) vorw.
oMD229	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACCGGTAATACAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1(E69K) rückw.
oMD230	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACAGGTAATGCAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1(Y71H) rückw.
oMD231	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACAGGTAATTCAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1(Y71N) rückw.
oMD232	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACAGGTAATCAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1(Y71S) rückw.
oMD233	ggggaccactttgtacaagaagctgggtcCTACCGGTAATACAGCTCCAA	attB2-STOP-HUB1(L73R) rückw.
oMD237	GGAAAAGAGGAGCGGTGGCAAAGCTTAGATTGCAAATAAATACTCT- GAAAgatATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC	Gateway®-Konv. (pGD251) vorw.
oMD238	AAATGTATGTATTGTATTTAGATCAAAAAAAAAAAAAACAGCG- CATTTTgatATCACCACCTTTGTACAAGAAAGCTG	Gateway®-Konv. (pGD251) rückw.
oMD260	CATCAAACCTAAAGAAACCATGTACGC	RT-PCR MUD1 vorw.
oMD261	ATCAGCGGTTGTGATGATATTTGTAAT	RT-PCR MUD1 rückw.
oMD264	CATTAAGAATCAGTTAGAGAATATAAAACAAGATAATAAAAATG	RT-PCR UBC12 vorw.
oMD265	ATTACCTCCAATTTCCGGCGATTG	RT-PCR UBC12 rückw.
oMD266	CTCCATTTAGGCAGGACAGTATTTTG	RT-PCR ARP9 vorw.
oMD267	GGTTTGATTAATTCGGCTTTATTATCCTTG	RT-PCR ARP9 rückw.
oMD270	GGAAAAGTCACTGGATCACACATT	RT-PCR PCC1 vorw.
oMD271	CGAAGCACCTATCATCAATGC	RT-PCR PCC1 rückw.
oMD272	CTACAGCGTCTTCAGGAAGAAAG	RT-PCR UBC9 vorw.
oMD273	GATATTCATTTGGATATTCGACTGTAATTGG	RT-PCR UBC9 rückw.
oMD274	ATGAATCAGTTAGGAGCTTTAGCC	RT-PCR YIP3 vorw.
oMD275	TACTTCAGGTTATACGCCACTCT	RT-PCR YIP3 rückw.

oMD276	CACTAGGCTACACAGATGAGTTCAAG	RT-PCR BET1 vorw.
oMD277	CATCTGTTCCCTCACTTTGAGATTCAAG	RT-PCR BET1 rückw.
oMD280	CAGCTATGGAACAAAGGAACAACG	RT-PCR GIM4 vorw.
oMD281	GTTTGAACATCACTTTCAACAAGTGC	RT-PCR GIM4 rückw.
oMD282	CATTGAAATTCAGTATAAAAATGTCTGAATTTAAGAT	RT-PCR YNL050C vorw.
oMD283	CTTTGAGATCTAATGATGAGTCGGTTC	RT-PCR YNL050C rückw.
oMD284	CATTCAGGCAAAAGGCTCAGAAG	RT-PCR HOP2 vorw.
oMD285	CAAGAGTAAATTATAATCTTTCCGAAGGTTTTAGAC	RT-PCR HOP2 rückw.
oMD286	CATAAGACTTAAACTAACCTCAATGGCG	RT-PCR QCR10 vorw.
oMD287	GAATCTTTTTGTATAGCGTATCTTGAAACTTAGG	RT-PCR QCR10 rückw.
oMD288	GAAGAACCAGAAATATTATGGAGGCAA	RT-PCR SRC1 vorw.
oMD289	GTAGATTTCTCTTTCAAATCGACACTTCATTC	RT-PCR SRC1 rückw.
oMD290	GGAATAACGCCACATATTCATTGTAAGA	RT-PCR COX5B vorw.
oMD291	CATGGAAGCTTTTGACGTTCTGTC	RT-PCR COX5B rückw.
oMD292	GTTTCTTCTTGGTCATATTTTTTATACATATACATACATATAT	RT-PCR YJR079W vorw.
oMD293	GAAGCTTGCCGTACTIONGAATTTGAC	RT-PCR YJR079W rückw.
oMD294	GCTTATTCAATTAATCAATATACGCAGAGATG	RT-PCR RPL30 vorw.
oMD295	GTTGTCCAAGGGACTTTCTCAAAAC	RT-PCR RPL30 rückw.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Allgemeine Methoden

Alle allgemeinen molekularbiologischen Methoden wurden nach den Anweisungen in Ausubel et al. (1989) durchgeführt, mit dem Verweis auf die dort beschriebenen Rezepte der Standardpuffer.

### 4.2.2 Klassische Klonierung

Die benötigten Enzyme (Restriktionsenzyme, Nukleasen, Polymerasen, Ligasen) wurden nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt (NEB, wenn nicht anders beschrieben). Geschnittene Vektoren wurden durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion (Invitek) gereinigt. Mindestens 100 ng Vektor wurden mit dem Insert in verschiedenen Mengenverhältnissen für 1h oder über Nacht bei 16°C ligiert.

### 4.2.3 Gateway®-System

Die Rekombination eines Inserts in den Donor-/Zielvektor erfolgte mit Gateway® BP/LR Clonase® II nach der Anleitung des Herstellers (Invitrogen).

#### 4.2.4 SDS-PAGE / Western Blot / Immundetektion

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt und durch Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran (ROTH) übertragen (beides Bio-Rad Mini-PROTEAN 3). Das Blockieren der Membran erfolgte entweder mit Magermilch oder proteinfreiem Rotiblock (ROTH). Die Antikörpersignale wurden entweder mit dem ECL-System (Amersham) und Röntgenfilmen (Kodak) oder mit dem Odyssey®-System (LI-COR Biosciences) detektiert.

##### verwendete Antikörper:

- anti-Hub1 (primär, Kaninchen, polyklonal, affinitätsgereinigt, 1:1000; A. Wittstruck)
- anti-Pgk1 (primär, Maus, monoklonal, 1:10000, Sigma)
- anti-Peroxidase (primär, Peroxidase-gekoppelt, Sigma)
- anti-Kaninchen (sekundär, Peroxidase-gekoppelt, Sigma)
- anti-Maus (sekundär, Peroxidase-gekoppelt, Sigma)
- anti-Kaninchen (sekundär, IRDye®-680, LI-COR Biosciences)
- anti-Maus (sekundär, IRDye®-800, LI-COR Biosciences)

### 4.3 E.coli-Methoden

#### 4.3.1 Medien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium, das mit erforderlichen Antibiotika versetzt wurde, durch Schütteln bei 37°C. Feste Medien enthielten 2% Agar.

##### Luria-Bertani (LB) - Medium:

- 1% Hefeextrakt (Becton & Dickinson)
- 1% Natriumchlorid
- 2% Trypton (Becton & Dickinson)

##### Antibiotika:

- 100 µg/ml Ampicillin (ROTH)
- 25 µg/ml Kanamycin (ROTH)
- 25 µg/ml Chloramphenicol (ROTH)

#### 4.3.2 Elektrokompente Zellen und DNS-Transformation

Eine Bakterienkultur einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde für 20 min auf Eis abgekühlt, zweimal mit eiskaltem sterilen Wasser und einmal mit einer eiskalten sterilen 10% Glycerinlösung gewaschen. Das Zellpellet wurde im selben Volumen mit 10% Glycerin resuspendiert und in 50 µl-Aliquots bei -80°C gelagert. Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde mit 0,5 µl einer Plasmidlösung ver-

setzt, für 5 min auf Eis inkubiert und in einer Elektroporationskuvette (2 mm, Peqlab) bei einer Spannung von 2,5 kV elektroporiert. Die Zellsuspension wurde in LB-Medium aufgenommen, für 30 min bei 37°C geschüttelt und auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

#### 4.3.3 Plasmidpräparation

Plasmide aus Bakterien wurden durch Präparationskits laut Anweisungen der Hersteller (Qiagen, Invitex oder Eppendorf) gewonnen.

#### 4.3.4 Proteinexpression

Die Bakterienkultur mit dem Expressionsplasmid wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bei 37°C geschüttelt und die Expression durch Zugabe von 0,2 mM IPTG (Sigma) für 2 Stunden induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Lysepuffer aufgenommen und durch Ultraschall lysiert. Das Lysat wurde 10 min bei 5000 x g und weitere 20 min bei 20000 x g abzentrifugiert und der klare Überstand für die weitere Reinigung verwendet. 6xHis-Hub1 wurde an Ni-NTA (Qiagen) gebunden, mit 10fachem Säulenvolumen gewaschen und mit Puffer Hub1-E eluiert. Das Eluat wurde aliquotiert, dessen Proteinkonzentration durch UV bestimmt und bei -80°C gelagert. Sowohl GST-Snu66(1-107), als auch GST wurden an Gutathion-Sepharose (Amersham) gebunden und mit 10fachem Säulenvolumen gewaschen. Die beladene Säulenmatrix wurde bei 4°C gelagert.

##### Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
150 mM NaCl  
1 mM PMSF (Sigma)

##### Hub1-E:

10 mM Tris/HCl pH ,0  
150 mM NaCl  
50 mM EDTA

## 4.4 Hefe-Methoden

### 4.4.1 Medien

Die Anzucht von Hefen erfolgte entweder in Vollmedien oder Minimalmedium. Die Selektion auf bestimmte Markergene erfolgte durch Zugabe geeigneter Antibiotika oder durch Weglassen der entsprechenden Komponente im Minimalmedium. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Zellen in Flüssigmedium bei 30°C geschüttelt. Feste Medien enthielten 2% Agar.

Vollmedien:

1% Hefeextract (Becton & Dickinson)  
 2% Pepton (Becton & Dickinson)  
 2% Kohlenstoffquelle

100x Aminosäuremischung:

0,2 % Arginin  
 0,3 % Histidin  
 0,6 % Isoleuzin  
 0,6 % Leuzin  
 0,4 % Lysin  
 0,2 % Methionin  
 0,6 % Phenylalanin  
 0,5 % Threonin  
 0,5 % Tryptophan

„synthetic complete“(SC)-Minimalmedium:

1x Stickstoffbasis (YNB; Becton & Dickinson)  
 2% Kohlenstoffquelle  
 0,002% Uracil  
 0,001% Adenin (Sigma)  
 1% einer 100x Aminosäuremischung

Antibiotika:

200 µg/ml Geneticin (G418-Sulfate; Calbiochem)  
 100 µg/ml Nourseothricin (cloNAT; WERNER BioAgents)  
 1 mg/ml 5-Fluoro-orotsäure (5-FOA; Fermentas)

## 4.4.2 Kreuzen, Sporulation und Tetradenanalyse

Zum Kreuzen von haploiden Stämmen wurden zwei Hefestämme gegensätzlichen Geschlechts auf Vollmedium vermischt und für 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden bei geeigneten Markern auf Selektionsmedium plattiert und auf diploide Zellen selektiert. Waren keine Marker nutzbar, wurden Zellen im Zygotenstadium mit einem Mikromanipulator vereinzelt. Zur Sporulation von diploiden Hefestämmen wurden 0,2 ml einer stationären Kultur in 3 ml PräSpo-Medium für 6 Stunden bei 30°C rotiert. Die Zellen wurde zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml Spo-Medium für 2 Tage bei 30°C geschüttelt. Die Zellwand der entstandenen Asci wurde durch Zugabe von 10 µl einer 100 µg/ml Zymolyaselösung (Zymolyase 20T; MP Biomedicals) für 5 min bei Raumtemperatur verdaut. Die Sporen wurden anschließend mit einem Mikromanipulator auf Platten gelegt und bei 30 °C inkubiert. Die Größe der Kolonien wurde nach zwei Tagen notiert und deren Genotypen durch Replikaplattieren auf geeignete Selektionsmedien bestimmt.

PräSpo-Medium:

0,8 % Hefeextrakt  
 0,3 % Pepton  
 10 % Glukose

Spo-Medium:

1 % Kaliumacetat  
 0,1 % Bacto-Pepton  
 0,05 % Glukose

#### 4.4.3 Tüpfeltest zur Wachstumsanalyse

Hefezellen einer frühen logarithmischen Wachstumsphase wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 eingestellt und anschließend seriell 1/5 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden mittels eines Replikationsrechs gleiche Volumina auf Platten mit passenden Medien getüpfelt. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für 2-3 Tage inkubiert und die Größe der Kolonien dokumentiert.

#### 4.4.4 Kompetente Zellen und DNS-Transformation

Eine Hefekultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,7 bis 1,0 wurde zweimal mit sterilem Wasser und einmal mit sterilem TEL-Puffer gewaschen. Eine Zellsuspension von 3 OD in 40  $\mu$ l TEL-Puffer wird mit 5  $\mu$ l 10 g/l Träger-DNS (Carrier-DNA; Sigma) versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde mit 1  $\mu$ g DNS und 350  $\mu$ l TEL-PEG-Puffer gemischt und für 30 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  und weiteren 15 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden einmal in sterilem Wasser gewaschen und auf ein erforderliches Mangel- oder Selektionsmedium ausplattiert.

TEL-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
0,1 M LiAc  
1 mM EDTA

TEL-PEG-Puffer:

TEL-Puffer mit 40% Polyethylenglycol 4000

#### 4.4.5 Präparation von genomischer DNS / Plasmiden

10 ml Zellsuspension einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 0,2 ml Lysepuffer resuspendiert. Ein Pelletvolumen Glaskugeln (425-600  $\mu$ m; Sigma) wurde dazu gegeben, mit 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma) gemischt und 5 min intensiv geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 16.000 U/min für 2 min wird der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übernommen und die enthaltene DNS gefällt.

Lysepuffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8.0  
1 mM EDTA  
0,1 M NaCl  
1% SDS / 2% Triton X-100

#### 4.4.6 Präparation von RNS

Gesamt-RNS aus Hefekulturen wurde laut dem Protokoll in Amberg et al. (2006b) präpariert und in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.7 Lyse von Hefezellen

Zellen einer Hefekultur mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 wurden abzentrifugiert, einmal mit sterilem Wasser gewaschen und in ca. 100  $\mu\text{l}$  eines geeigneten Lysepuffers pro 100 OD Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von selbem Volumen Glaskugeln (425-600  $\mu\text{m}$ ; Sigma) wurde die Zellsuspension 5 min intensiv geschüttelt. Zur Präparation von Rohlysaten wurde die Suspension 1 min bei  $1000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verwendet. Für zytosolische Extrakte wurde das Rohlysat weitere 10 min bei  $13000 \times g$  abzentrifugiert.

### 4.5 Suche nach genetischen Interaktionen mit Hub1

#### 4.5.1 Mutagenese der Zellen

Für das Plasmid pMD004 wurde der genomische Bereich von *HUB1*, einschließlich 600 bp vor und 120 bp nach der kodierenden Sequenz (oMD078/079; SacI/EcoRI), in den Hefevektor pRS416 kloniert. Danach wurde *ADE3*, mit eigenem Promotor und Terminator, durch homologe Rekombination (oMD084/085) in diesen Vektor integriert. Der Stamm yMD039 wurde aus dem Hefestamm yGD141 durch die Deletion von *ADE3* durch homologe Rekombination mit einer kanMX6-Deletionskassette (pFA6a-kanMX6; oMD082/83) erstellt und mit der Transformation von pMD004 für die Mutagenese und Selektion auf genetische Interaktionen mit Hub1 vorbereitet. Die Mutagenese der Hefezellen erfolgte nach der Anleitung in Amberg et al. (2006a). Der Anteil der überlebenden Zellen wurde durch den Vergleich wachsender Kolonien mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die mutagenisierten Zellen wurden auf große Kulturschalen (30x30cm, Corning; SC-Medium mit 0,0004% Adenin) ausplattiert, so dass Einzelkolonien ausgewertet werden konnten. Die Platten wurden visuell auf komplett rote Hefekolonien untersucht. Die Grundlagen der Farbselektion wurden in Jones and Fink (1982), Roman (1956) und Bender et al. (1991) im Detail erläutert. Diese Kolonien wurden auf ihr Wachstum auf SC-Medium mit 1 g/l 5-FOA getestet. Die Selektion auf 5-FOA-Medium gegen *URA3* wird in Boeke et al. (1984) beschrieben.

Stämme, die auf 5-FOA-Medium nicht überlebten, wurden mit dem Plasmid pGD131 transformiert und erneut auf ihr Wachstum auf 5-FOA-Platten getestet.

#### 4.5.2 Suche nach komplementierenden genomischen Fragmenten

Wenn ein synthetisch letaler Hefestamm nach der Transformation mit pGD131 auf 5-FOA-Medium überlebte, wurden die ursprünglichen Zellen mit einer Plasmid-Bibliothek transformiert, die in einem *LEU2*-Vektor genomischer Fragmente der Hefe enthielt (Yeast Genomic Library, Goodson et al. (1996)). Die Transformanten wurden erneut auf ihr Wachstum auf 5-FOA-Medium geprüft. Aus überlebenden Stämmen wurden die enthaltenen Plasmide isoliert, in *E. coli* vervielfältigt und das komplementierende genomische Fragment ansequenziert (HBV/HBR).

#### 4.5.3 Bestimmung der Mutation in genomischer DNA

Der Stamm mit dem synthetisch letalen Phänotyp wurde zwei mal mit dem W303-Wildtyp zurück gekreuzt. blieb die synthetische Letalität in den Tochterzellen erhalten, wurde der genomische Bereich des Ursprungsstamms, der auf dem komplementierenden Plasmid bestimmt wurde, sequenziert. Für den Stamm 13-115 wurden überlappende Fragmente des genomischen Bereichs von *PRP8* amplifiziert (oM163 - oMD174), gereinigt und die DNS-Fragmente sequenziert.

#### 4.5.4 Suche nach genetischen Interaktionen von Deletionsstämmen

Für die Suche nach genetischen Interaktionen von Hub1 mit Deletionen nicht-essentieller Splicing-Faktoren wurde die angegebenen Stämme aus der Sammlung (YKO-Library; Openbiosystems) mit dem Stamm yGD251 gekreuzt, die diploiden Stämme sporuliert und die Verteilung der Deletionsmarker in den Sporen durch Tetradenanalyse dokumentiert. Die Stämme wurden als Serienverdünnung auf Platten mit Vollmedium getüpfelt und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach 3-5 Tagen wurde das Wachstum der Zellen dokumentiert. Der Stamm *PRP19-TAP Δhub1* wurde aus der TAP-Tag-Sammlung (Openbiosystems) durch Kreuzen mit einer *MATα hub1Δ::natMX4*-Kolonie (aus obiger Tetradenanalyse), Sporulation und anschließender Tetradenanalyse generiert.

## 4.6 Wachstumskurve

Für den Stamm yMD355 wurde im Stamm yMD348 ein Galaktose-induzierbarer Promoter durch homologe Rekombination (pYM-N25; oGD202/203) genomisch vor *HUB1* integriert. Die Zellen wurden über Nacht in Vollmedium mit 2% Galaktose bis zu einer OD<sub>600</sub> kleiner als 0,7 wachsen gelassen und zu Beginn der Messung in Vollmedium mit 2% Glukose zurück verdünnt. Die Kulturen wurden bei 30°C geschüttelt und deren Zelldichte periodisch bestimmt.

## 4.7 Reverse-Transkriptase (RT) – PCR

### 4.7.1 DNS Verdau und RT-Reaktion

1 µg Hefe-RNS wurde mit 1 U DNase I (RNase frei, Roche), in 10 µl 1x DNase Puffer (RNase frei), versetzt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Enzym durch Inkubation für 10 min bei 70°C inaktiviert. Die RNS-Lösung wurde mit 250 ng “Random Hexamer”-Oligonukleotiden (Fermentas) in 25 µl 1x RT-Buffer (Promega) für 5 min bei 70°C inkubiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 100 U MLV-Reverse-Transkriptase (Promega) wurde der Ansatz zunächst für 10 min bei Raumtemperatur und danach für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Transkriptase wurde durch Inkubation für 10 min bei 70°C deaktiviert.

### 4.7.2 PCR nach RT-Reaktion:

Ein PCR-Ansatz von 25 µl enthielt 2 µl einzelsträngige cDNA (nach RT-Reaktion), 1 µM eines genspezifischen Oligonukleotidpaars, 0,2 mM dNTPs (Fermentas) und 0,5 U Taq-Polymerase (NEB) in 1x Reaktionspuffer. Das PCR-Programm wurde nach den Vorgaben des Herstellers eingerichtet, mit 35 Zyklen bei 52°C bis 60°C Schmelztemperatur (je nach Oligonukleotidpaar) und einer Extensionszeit von 1 min bei 72°C. Die Größe und Menge der DNS-Fragmente wurde mittels 2%-Agarosegelelektrophorese detektiert.

## 4.8 Wachstum auf Kupferplatten

Die Deletion von *HUB1* in den Stämmen yJU75 und KH46 erfolgte durch homologe Rekombination einer natMX6-Deletionskassette (pAG25; oGD67/68) für yNM540, bzw. einer HIS3MX6-Deletionskassette (pYM2; oGD67/68) für KH46- $\Delta$ hub1. Die Mutation in *PRP8* wurde durch Kreuzen von

yJU75 und yMD352, Tetradenanalyse und der Selektion auf eine kupfersensitive Kolonie mit Auxotrophie für Uracil und Lysin (yMD460) verfügbar gemacht. Die Stämme KH46 und KH46- $\Delta nam8$ , sowie die Plasmide PRS316AMA1-CUP1, pRS316CF7B-G1A und R1070 wurden von Dr. M. Spingola freundlicherweise zur Verfügung gestellt, der Stamm yJU75 und die Plasmide pCC-71, pMA-A3C, pMA-BS-C und pMM-41 von Dr. C. Query. Die verschiedenen Stämme wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert, als Kulturen einer  $OD_{600}$  von 0,3 in Mikrotiterplatten überführt und als Verdünnungsreihen auf Platten gestempelt. Die Platten, mit einer Kupferkonzentration zwischen 0 und 0,2 mM (Lesser et al. 1993b), wurden drei Tage bei 30°C inkubiert und danach ausgewertet.

#### 4.9 $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Die Plasmide pLGSD5, pHZ18, pHZ12, pHZ8 und pLint-Nde°Acc° wurden von Dr. M. Rosbash freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pLGSD5 (kein Intron), pHZ18 (Wildtyp-Intron), pHZ12 (5'-GUAUAU) und pHZ8 (BS-UAUUAAC) wurden in die Hefestämme W303-1A, yGD141 und yMD348 transformiert, die Plasmide pLGSD5 und pLint-Nde°Acc° (Export-Reporter) in die Stämme BY4742,  $\Delta hub1$ ,  $\Delta pml1$  sowie  $\Delta pml39$ . Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Kulturen über Nacht bei 30°C in Selektionsmedium mit 2% Raffinose bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 geschüttelt. Die Transkription der Reporterkonstrukte wurde durch Zugabe von 2% Galaktose induziert und die Zellen weitere 2 Stunden bei 30°C geschüttelt. Für die Messung wurden 40  $\mu$ l der Zellsuspension in 800  $\mu$ l Z-Puffer verdünnt, mit 1 Tropfen 0,1% SDS-Lösung und 2 Tropfen Chloroform versetzt und intensiv geschüttelt. Die lysierten Zellen wurden 30 min bei 30°C inkubiert und mit 200  $\mu$ l ONPG-Lösung vermischt. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert, bis eine leichte Gelbfärbung zu beobachten war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400  $\mu$ l 1 M Natriumkarbonatlösung beendet und die Absorption der Zellsuspension bei 420 nm und 550 nm gemessen. Alle Werte wurden dreifach bestimmt und gemittelt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Miller (1972). Die Aktivitäten der Reporter mit Intron wurde auf die Enzymaktivität der Intron-losen Kontrolle normiert. Werte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt. Durch einen t-Test wurde geprüft, ob sich die Werte der veränderten Hefestämme signifikant vom Wildtyp unterscheiden.

Z-Puffer:

0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0  
 10 mM KCl  
 1 mM MgSO<sub>4</sub>  
 50 mM β-Mercaptoethanol

ONPG-Lösung:

4 mg/ml ONPG (Sigma)  
 in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

#### 4.10 N- und C-terminale Erweiterungen von Hub1

Für den Funktionstest von Hub1-Fusionsproteinen mit N- oder C-terminalen Erweiterungen wurde das Plasmid pMD032 generiert, durch Umsetzen des *HUB1*-Promotors (pMD019; SacI/EcoRI) und Terminators (oMD160/151; Sali/ApaI), vor den zusätzlich Stopcodons in allen Leserahmen eingefügt wurden. Für das Plasmid pMD055 wurde die Sequenz von *HUB1* aus dem Plasmid pMD019 in pMD032 eingefügt (EcoRI/Sali), so dass der C-Terminus um die Codons der Schnittstelle erweitert wurde. Zur Kontrolle diente das Plasmid pMD023, das *HUB1* mit originalem Stopcodon (oGD163/oMD156; EcoRI/Sali) trägt. Für das Plasmid pMD022 wurde das *HUB1-klTRP1*-Fragment, inklusive Promoter und Terminator (SacI/ApaI), in pRS415 überführt. Diese und weitere Plasmide (pGD83, pGD85, pGD99, pGD218, pGD243, pGD240, pGD244, pCH1) wurden in den Hefestamm 13-115 transformiert und das Wachstum der Kolonien auf 5-FOA-Platten dokumentiert.

#### 4.11 Mutagenese von *HUB1* und Charakterisierung der Mutanten

##### 4.11.1 Mutagenese und Isolation der Mutanten

Für die *HUB1*-Mutagenese wurde das Plasmid pMD019 erstellt, in dem ein Fusionskonstrukt aus *HUB1* ohne Stopcodon (oGD163/oMD147; EcoRI/Sali) und *klTRP1* ohne Startcodon aber mit 3 N-terminalen Glyzincodons (oMD148/149; Sali/XhoI) in den bakteriellen Vektor pBluescript KS(-) integriert wurde, umgeben vom genomischen *HUB1*-Promotor (oMD78/146; SacI/EcoRI) und Terminator (oMD150/151; XhoI/ApaI). Das Plasmid pMD027 wurde durch Integration des genomischen *HUB1*-Promotors, des *klTRP1*-Konstrukts und des genomischen *HUB1*-Terminators in den Hefektor pRS413 generiert. Dabei blieben Schnittstellen für EcoRI und Sali zwischen Promotor und *klTRP1* erhalten. Durch fehlerbehaftete PCR (Wilson u. a. 2000; pMD019; oMD153/159) wurde eine Bibliothek von mutierten *HUB1*-Kopien generiert, die durch homologe Rekombination in pMD027 integriert werden konnten. Die Mutationsrate wurde dabei auf den Austausch einer Basenpaarung für eine Produktgröße von 400 bp eingestellt. 0,5 µg der *HUB1*-Mutantenbibliothek und 0,5 µg des geschnittenen Vektors pMD027 (EcoRI/Sali) wurden in den Stamm 13-115 transformiert und auf

Tryptophan-Mangelmedium auf die Expression des Hub1-*klTrp1* Fusionskonstruktes selektiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf 5-FOA-Medium replikaplattiert. Aus Kolonien, die die Selektion gegen das enthaltene Plasmid pMD004 nicht überlebten wurden die Plasmide isoliert und die Mutation in *HUB1* durch Sequenzierung bestimmt. Die Sequenz der *HUB1*-Mutanten wurden ohne *klTRP1* amplifiziert (oMD214/215; oMD226-233) und durch Rekombination in den Gateway®-Vektor pDONR221 umgesetzt (pMD139 – 150, pMD163 – 186).

#### 4.11.2 Vergleich der zellulären Hub1-Proteinlevel

Für den Vergleich der Menge an Hub1 in nicht-synchronisierten Kulturen der frühen exponentiellen Wachstumsphase wurde das Plasmid pGD251 durch Umsetzen des *HUB1*-Promoters und Terminators (pMD019; SacI/ApaI) in den Hefevektor pRS414 und anschließender homologer Rekombination der Gateway®-Konversionskassette (pDESTco; oMD237/238) erstellt. Die Hub1-Mutanten wurden durch Rekombination aus den Donor-Vektoren in diesen Vektor umgesetzt (pMD211-246) und in den Hefestamm yGD139 transformiert. 50 OD der jeweiligen Kulturen wurden lysiert und die zytosolischen Extrakte mit Methanol gefällt. Die Äquivalente zu 2 OD Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Menge an eingesetztem Material wurde anhand der Stärke der Pgc1-Signale angepasst und danach die Stärke der Hub1-Signale bestimmt.

##### Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,5 mM EDTA

Proteaseinhibitoren (Complete-Mini, Roche)

#### 4.11.3 Vergleich der Hub1-Halbwertszeiten

Für Galaktose-induzierbare Expression wurden Wildtyp-Hub1 (pMD284) und die Mutante E58V (pMD285) in den Vektor pSV52 umgesetzt (Rub2-1f/-1r; BamHI/HindIII) und in den Hefestamm yGD139 transformiert. Die Kolonien wurden bei 30°C in Selektionsmedium mit 2% Raffinose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geschüttelt und die Expression für 2 Stunden durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen gewaschen und weitere 4 Stunden in Selektionsmedium mit 2% Glukose inkubiert. Jede Stunde wurden 50 OD Zellen abzentrifugiert, lysiert und die zytosolischen Extrakte anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Trans-

fer auf Nitrozellulose und Immunodetektion wurden die Fluoreszenzsignale für Pgk1 und Hub1 quantifiziert. Die Signalstärke von Hub1 wurde auf den Wert für Pgk1 normiert und die Abnahme seit der Repression berechnet. Die Werte aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt.

#### 4.11.4 Bindung der Mutanten an Snu66 im Two-Hybrid-System

Das Plasmid pMR29 wurde homologe Rekombination von Snu66 (oMR1/2) in den Vektor pOB-D2 erstellt und die Hub1-Mutanten durch Klonierung (*klTRP1*-Fusionskonstrukte; EcoRI/SalI) in den Vektor pOAD umgesetzt (pMR7-28, pMR30-33, pMR35-44). Die Plasmide, inklusive Kontrollen, wurden paarweise in den Reporterstamm PJ69-4 $\alpha$  transformiert und deren Wachstum auf Trp/Leu-, Trp/Leu/His- sowie Trp/Leu/Ade-Mangelmedien beobachtet.

#### 4.11.5 *in-vitro* Bindung der Mutanten an Snu66(1-107)

Für die Expression des N-terminalen Snu66-Fragments wurde das Plasmid pMD127 durch Klonierung der Sequenz (oMD208/209; BamHI/EcoRI) in den Expressionsvektor pGEX4T-1 eingefügt. Die Hub1-Mutanten wurden aus den Donorplasmiden durch Rekombination in den Expressionsvektor pDESTco (pMD151-162, pMD192-210) überführt. Sowohl GST-Snu66(1-107) als auch die Hub1-Mutanten wurden exprimiert und gereinigt. Die angegebenen Proteinnengen wurden in 1 ml Bindepuffer für 1 Stunde bei 4°C rotiert, gewaschen und die Proteine von der Säulenmatrix durch Erhitzen in SDS-Probenpuffer eluiert. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und die Farbdichte der Hub1-Banden quantifiziert. Die Scan-Bilder der Gele wurden durch das Programm ImageJ (Abramoff et al. 2004) ausgewertet und auf das Signal des Hub1-Wildtyps normiert. Die Werte aus drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt, deren Standardabweichung bestimmt und mittels eines t-Tests die Signifikanz des Unterschieds zum Wildtyp geprüft.

##### Bindepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
150 mM NaCl  
1 mM DTT  
2% BSA (Sigma)

##### Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
150 mM NaCl  
1 mM DTT

#### 4.11.6 Komplementation der genetischen Interaktionen

Die Plasmide der Hub1-Mutanten mit der Expression unter eigenem Promoter (pMD211-246) wurden in den Hefestamm 13-115 transformiert und das Wachstum der Zellen auf 5-FOA-Medium dokumentiert. Für die thermosensitiven Stämme wurden ein Plasmid pMD290 generiert, wobei der *HUB1*-Promotor, die Gateway<sup>®</sup>-Konversionskassette und der *HUB1*-Terminator aus pGD251 (SnaBI/DraIII) durch homologe Rekombination in pRS416 umgesetzt wurde. Die Hub1-Mutanten wurde durch Rekombination aus den Donorplasmiden in diesen Vektor überführt (pMD304-339) und in die thermosensitiven Stämme transformiert. Die Stämme wurden als Verdünnungsreihen auf Vollmedium mit 2% Glukose getüpfelt, 3 Tage bei 30°C, bzw. 37°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abelson, J., Trotta, C. R., und Li, H. (1998). tRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* 273, 12685-12688.
- Abramoff, M., Magelhaes, P., und Ram, S. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.
- Amberg, D. C., Burke, D. J., und Strathern, J. N. (2006a). Ethyl Methane Sulfonate (EMS) Mutagenesis. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, pdb.prot4180.
- Amberg, D. C., Burke, D. J., und Strathern, J. N. (2006b). Yeast RNA Isolation: Small-Scale. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, pdb.prot4155.
- Andrade, M. A., Daruvar, A., Casari, G., Schneider, R., Termier, M., und Sander, C. (1997). Characterization of new proteins found by analysis of short open reading frames from the full yeast genome. *Yeast* 13, 1363-1374.
- Arenas, J., und Hurwitz, J. (1987). Purification of a RNA debranching activity from HeLa cells. *J Biol Chem* 262, 4274-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J., Smith, J. A., und Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., und McCarty, M. (1995). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *Mol Med.* 1, 344-365.
- Azfer, A., Niu, J., Rogers, L. M., Adamski, F. M., und Kolattukudy, P. E. (2006). Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1411-1420.
- Bachenheimer, S., und Darnell, J. E. (1975). Adenovirus-2 mRNA is transcribed as part of a high-molecular-weight precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 4445-4449.
- Baker, B. S., Carpenter, A. T., Esposito, M. S., Esposito, R. E., und Sandler, L. (1976). The genetic control of meiosis. *Annu Rev Genet* 10, 53-134.
- Balzer, R. J., und Henry, M. F. (2008). Snu56p Is Required for Mer1p-Activated Meiotic Splicing. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2497-2508.

- Bender, A., und Pringle, J. R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1295-1305.
- Benedetti, C., Haynes, C. M., Yang, Y., Harding, H. P., und Ron, D. (2006). Ubiquitin-Like Protein 5 Positively Regulates Chaperone Gene Expression in the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Genetics* 174, 229-239.
- Bennett, M., Michaud, S., Kingston, J., und Reed, R. (1992). Protein components specifically associated with pre-spliceosome and spliceosome complexes. *Genes and Development* 6. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/6/10/1986.abstract> [Zugegriffen Dezember 11, 2008].
- Ben-Yehuda, S., Dix, I., Russell, C. S., McGarvey, M., Beggs, J. D., und Kupiec, M. (2000). Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 156, 1503-1517.
- Berget, S. M., Moore, C., und Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 3171-3175.
- Bernstein, H., Lendeckel, U., Dobrowolny, H., Stauch, R., Steiner, J., Grecksch, G., Becker, A., Jirkowski, G. F., und Bogerts, B. (2008). Beacon-like/ubiquitin-5-like immunoreactivity is highly expressed in human hypothalamus and increased in haloperidol-treated schizophrenics and a rat model of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 33, 340-51.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., und Luhrmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452, 846-850.
- Biggins, S., Ivanovska, I., und Rose, M. D. (1996). Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *J Cell Biol.* 133, 1331-1346.
- Boeke, J. D., Croute, F., und Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular and General Genetics MGG* 197, 345-346.
- Bozaoglu, K. u. a. (2006). Association of genetic variation within UBL5 with phenotypes of metabolic syndrome. *Hum. Biol* 78, 147-59.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.

- Brody, E., und Abelson, J. (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228, 963-7.
- Brooks, M. A., Dziembowski, A., Quevillon-Cheruel, S., Henriot, V., Faux, C., van Tilbeurgh, H., und Seraphin, B. (2008). Structure of the yeast Pml1 splicing factor and its integration into the RES complex. *Nucl. Acids Res. Advance Access*. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gkn894v1> [Zugegriffen Dezember 11, 2008].
- Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36, 333-60.
- Brown, J. D., und Beggs, J. D. (1992). Roles of PRP8 protein in the assembly of splicing complexes. *EMBO J.* 11, 3721-3729.
- Chan, S., und Cheng, S. (2005). The Prp19-associated Complex Is Required for Specifying Interactions of U5 and U6 with Pre-mRNA during Spliceosome Activation. *J. Biol. Chem.* 280, 31190-31199.
- Chan, S., Kao, D., Tsai, W., und Cheng, S. (2003). The Prp19p-Associated Complex in Spliceosome Activation. *Science* 302, 279-282.
- Chen, C., Kao, D., Chan, S., Kao, T., Lin, J., und Cheng, S. (2006). Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA* 12, 765-774.
- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., und Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.
- Colgan, D. F., und Manley, J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11, 2755-66.
- Collier, G. R. u. a. (2000). Beacon: a novel gene involved in the regulation of energy balance. *Diabetes* 49, 1766-71.
- Collins, C. A., und Guthrie, C. (1999). Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev.* 13, 1970-1982.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-3.

- Crick, F. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138-63.
- Crick, F., Barnett, L., Brenner, S., und Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192, 1227-32.
- Crispino, J. D., Blencowe, B. J., und Sharp, P. A. (1994). Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* 265, 1866-9.
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M., und Huibregtse, J. M. (2006). Herc5, an Interferon-induced HECT E3 Enzyme, Is Required for Conjugation of ISG15 in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 4334-4338.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C. L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., und Lührmann, R. (2006). Protein Composition and Electron Microscopy Structure of Affinity-Purified Human Spliceosomal B Complexes Isolated under Physiological Conditions. *Mol Cell Biol.* 26, 5528-5543.
- Desterro, J. M. P., Rodriguez, M. S., und Hay, R. T. (1998). SUMO-1 Modification of I[ $\kappa$ ]B[ $\alpha$ ] Inhibits NF-[ $\kappa$ ]B Activation. *Molecular Cell* 2, 233-239.
- Díaz-Martínez, L. A., Kang, Y., Walters, K. J., und Clarke, D. J. (2006). Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control. *Cell Div.* 1, 28.
- Dittmar, G. A. G., Wilkinson, C. R. M., Jedrzejewski, P. T., und Finley, D. (2002). Role of a Ubiquitin-Like Modification in Polarized Morphogenesis. *Science* 295, 2442-2446.
- Dziembowski, A., Ventura, A., Rutz, B., Caspary, F., Faux, C., Halgand, F., Laprévotte, O., und Séraphin, B. (2004). Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J* 23, 4847-56.
- Eaton, E. M., und Sealy, L. (2003). Modification of CCAAT/Enhancer-binding Protein- $\beta$  by the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Family Members, SUMO-2 and SUMO-3. *J. Biol. Chem.* 278, 33416-33421.
- Elsasser, S. u. a. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4, 725-730.
- Farrell, P. J., Broeze, R. J., und Lengyel, P. (1979). Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* 279, 523-5.

- Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I., und Hill, C. P. (2003). Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* 278, 28976-84.
- Frank, D., Patterson, B., und Guthrie, C. (1992). Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol Cell Biol.* 12, 5197-5205.
- Frendewey, D., und Keller, W. (1985). Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell* 42, 355-67.
- Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., und Ohsumi, Y. (2000). A Protein Conjugation System in Yeast with Homology to Biosynthetic Enzyme Reaction of Prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 275, 7462-7465.
- Galy, V., Gadai, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., und Nehrbass, U. (2004). Nuclear Retention of Unspliced mRNAs in Yeast Is Mediated by Perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63-73.
- Gao, M., und Karin, M. (2005). Regulating the Regulators: Control of Protein Ubiquitination and Ubiquitin-like Modifications by Extracellular Stimuli. *Molecular Cell* 19, 581-593.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., und Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Goehring, A. S., Rivers, D. M., und Sprague, G. F. (2003). Attachment of the Ubiquitin-Related Protein Urm1p to the Antioxidant Protein Ahp1p. *Eukaryotic Cell* 2, 930-936.
- Goodson, H., Anderson, B., Warrick, H., Pon, L., und Spudich, J. (1996). Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 133, 1277-1291.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., und Sal, G. D. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J.* 18, 6462-6471.
- Gottschalk, A., Bartels, C., Neubauer, G., Lührmann, R., und Fabrizio, P. (2001). A Novel Yeast U2 snRNP Protein, Snu17p, Is Required for the First Catalytic Step of Splicing and for Progression of Spliceosome Assembly. *Mol Cell Biol.* 21, 3037-3046.
- Gozani, O., Patton, J. G., und Reed, R. (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.* 13, 3356-3367.

- Grabowski, P. J., Padgett, R. A., und Sharp, P. A. (1984). Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* 37, 415-27.
- Grainger, R. J., und Beggs, J. D. (2005). Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA* 11, 533-557.
- Guthrie, C., und Fink, G. R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*.
- Hagiwara, M. (2005). Alternative splicing: a new drug target of the post-genome era. *Biochim Biophys Acta* 1754, 324-31.
- Hall, K. B., und Konarska, M. M. (1992). The 5' splice site consensus RNA oligonucleotide induces assembly of U2/U4/U5/U6 small nuclear ribonucleoprotein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10969-10973.
- Hardy, S. F., Grabowski, P. J., Padgett, R. A., und Sharp, P. A. (1984). Cofactor requirements of splicing of purified messenger RNA precursors. *Nature* 308, 375-7.
- Hatakeyama, S., und Nakayama, K. I. (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 635-45.
- Haugen, P., Simon, D. M., und Bhattacharya, D. (2005). The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21, 111-119.
- Haynes, C. M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., und Ron, D. (2007). ClpP Mediates Activation of a Mitochondrial Unfolded Protein Response in *C. elegans*. *Developmental Cell* 13, 467-480.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- He, F., Peltz, S. W., Donahue, J. L., Rosbash, M., und Jacobson, A. (1993). Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNAs in a yeast *upf1*- mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7034-8.
- Hernandez, N., und Keller, W. (1983). Splicing of in vitro synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell extracts. *Cell* 35, 89-99.
- Hesselberth, J. R., Miller, J. P., Golob, A., Stajich, J. E., Michaud, G. A., und Fields, S. (2006). Comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* WW domains and their interacting proteins. *Genome Biol* 7, R30.

- Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30, 183-7.
- Hurley, J. H., Lee, S., und Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-72.
- Ichimura, Y. u. a. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
- Imamoto, F., und Ito, J. (1968). Simultaneous initiation of transcription and translation at internal sites in the tryptophan operon of *E. coli*. *Nature* 220, 27-31.
- Jacquier, A., Rodriguez, J. R., und Rosbash, M. (1985). A quantitative analysis of the effects of 5' junction and TACTAAC box mutants and mutant combinations on yeast mRNA splicing. *Cell* 43, 423-430.
- James, P., Halladay, J., und Craig, E. A. (1996). Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jensen, T. H., Dower, K., Libri, D., und Rosbash, M. (2003). Early Formation of mRNP: License for Export or Quality Control? *Molecular Cell* 11, 1129-1138.
- Johnson, P. R., und Hochstrasser, M. (1997). SUMO-1: Ubiquitin gains weight. *Trends Cell Biol* 7, 408-13.
- Johnson, T. L., und Abelson, J. (2001). Characterization of U4 and U6 interactions with the 5' splice site using a *S. cerevisiae* in vitro trans-splicing system. *Genes & Development* 15, 1957-1970.
- Jones, E., und Fink, G. (1982). Regulation of Amino Acid and Nucleotide Biosynthesis in Yeast. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Jurica, M. S., und Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Molecular Cell* 12, 5-14.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A., und Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-37.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., und Yeh, E. T. (1997). Characterization of NEDD8, a Developmentally Down-regulated Ubiquitin-like Protein. *J. Biol. Chem.* 272, 28557-28562.

- Kandels-Lewis, S., und Séraphin, B. (1993). Involvement of U6 snRNA in 5' splice site selection. *Science* 262, 2035-9.
- Kantham, L. u. a. (2003). Beacon interacts with cdc2/cdc28-like kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 125-129.
- Kassir, Y., Granot, D., und Simchen, G. (1988). IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52, 853-862.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., und Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-80.
- Kim, J., Sharma, S., Li, Y., Cobos, E., Palvimo, J. J., und Williams, S. C. (2005). Repression and Coactivation of CCAAT/Enhancer-binding Protein {epsilon} by Sumoylation and Protein Inhibitor of Activated STATx Proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 12246-12254.
- Klionsky, D. J., und Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 1-32.
- Komatsu, M. u. a. (2004). A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* 23, 1977-1986.
- Konarska, M. M., und Sharp, P. A. (1987). Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* 49, 763-74.
- Konforti, B. B., Koziolkiewicz, M. J., und Konarska, M. M. (1993). Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly. *Cell* 75, 863-73.
- Kong, S., und Chock, P. (1992). Protein ubiquitination is regulated by phosphorylation. An in vitro study. *J. Biol. Chem.* 267, 14189-14192.
- Korant, B., Blomstrom, D., Jonak, G., und Knight, E. (1984). Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J. Biol. Chem.* 259, 14835-14839.
- Krämer, A. (2003). The Structure and Function of Proteins Involved in Mammalian Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem* 65, 367-409.
- Kuhn, A. N., und Brow, D. A. (2000). Suppressors of a cold-sensitive mutation in yeast U4 RNA define five domains in the splicing factor Prp8 that influence spliceosome activation. *Genetics* 155, 1667-82.

- Kuhn, A. N., Li, Z., und Brow, D. A. (1999). Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol Cell* 3, 65-75.
- Kuhnel, M., Strickland, R., und Palmer, J. (1990). An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* 250, 1570-1573.
- Kumar, S., Yoshida, Y., und Noda, M. (1993). Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 393-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lambowitz, A. M., und Belfort, M. (2003). Introns as Mobile Genetic Elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 587-622.
- Lawrence, C. W. (2002). Classical mutagenesis techniques. In Part B: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Academic Press), S. 189-199. Available at: <http://www.science-direct.com/science/article/B7CV2-4B7P7NJ-6C/2/43ee3cd478f76173fab16afe1188e7e7> [Zugegriffen September 1, 2008].
- Lee, K., und Myung, K. (2008). PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells* 26, 5-11.
- Legrain, P., und Rosbash, M. (1989). Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57, 573-583.
- Lengyel, P. (1966). Problems in Protein Biosynthesis. *J Gen Physiol.* 49, 305-330.
- Lesser, C. F., und Guthrie, C. (1993). Mutations in U6 snRNA that alter splice site specificity: implications for the active site. *Science* 262, 1982-8.
- Lesser, C. F., und Guthrie, C. (1993). Mutational Analysis of Pre-mRNA Splicing in *Saccharomyces Cerevisiae* Using a Sensitive New Reporter Gene, Cup1. *Genetics.* 133, 851-863.
- Lewis, J. D., Görlich, D., und Mattaj, I. W. (1996). A yeast cap binding protein complex (yCBC) acts at an early step in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 24, 3332-3336.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., und Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J.* 17, 2208-2214.

- Lin, D., Tatham, M. H., Yu, B., Kim, S., Hay, R. T., und Chen, Y. (2002). Identification of a Substrate Recognition Site on Ubc9. *J. Biol. Chem.* 277, 21740-21748.
- Liu, L., Query, C. C., und Konarska, M. M. (2007). Opposing classes of prp8 alleles modulate the transition between the catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nat Struct Mol Biol* 14, 519-526.
- Loeb, K., und Haas, A. (1992). The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 7806-7813.
- Long J, und Caceres J (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 417, 15-27.
- Longtine, M. S., III, A. M., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lopez, P. J., und Séraphin, B. (1999). Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *RNA*. 5, 1135-1137.
- Lüders, J., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2003). The ubiquitin-like protein HUB1 forms SDS-resistant complexes with cellular proteins in the absence of ATP. *EMBO Rep* 4, 1169-74.
- Lu, H., Yang, Y., Allister, E. M., Wijesekara, N., und Wheeler, M. B. (2008). The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 7, 1434-51.
- Madhani, H. D., und Guthrie, C. (1992). A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* 71, 803-17.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Makarov, E. M., Makarova, O. V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C. L., Wilm, M., und Luhrmann, R. (2002). Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science* 298, 2205-2208.
- Marinovic, A. C., Zheng, B., Mitch, W. E., und Price, S. R. (2007). Tissue-specific regulation of ubiquitin (UbC) transcription by glucocorticoids: in vivo and in vitro analyses. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F660-666.

- Maroney, P. A., Romfo, C. M., und Nilsen, T. W. (2000). Functional Recognition of the 5' Splice Site by U4/U6.U5 tri-snRNP Defines a Novel ATP-Dependent Step in Early Spliceosome Assembly. *Molecular Cell* 6, 317-328.
- Martinez-Noel, G., Niedenthal, R., Tamura, T., und Harbers, K. (1999). A family of structurally related RING finger proteins interacts specifically with the ubiquitin-conjugating enzyme UbcM4. *FEBS Lett* 454, 257-61.
- Matunis, M., Coutavas, E., und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135, 1457-1470.
- McCracken, S. u. a. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 3306-18.
- McNally, T., Huang, Q., Janis, R. S., Liu, Z., Olejniczak, E. T., und Reilly, R. M. (2003). Structural analysis of UBL5, a novel ubiquitin-like modifier. *Protein Sci* 12, 1562-1566.
- Michaud, S., und Reed, R. (1991). An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev* 5, 2534-46.
- Michel, F., Kazuhiko, U., und Haruo, O. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns -- a review. *Gene* 82, 5-30.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Miranda, M., und Sorkin, A. (2007). Regulation of Receptors and Transporters by Ubiquitination: New Insights into Surprisingly Similar Mechanisms. *Mol. Interv.* 7, 157-167.
- Mizushima, N., Noda, T., und Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 18, 3888-3896.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., und Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
- Mogk, A., Schmidt, R., und Bukau, B. (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* 17, 165-72.
- Moore, M. J., und Sharp, P. A. (1993). Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* 365, 364-8.

- Moteki, S., und Price, D. (2002). Functional Coupling of Capping and Transcription of mRNA. *Molecular Cell* 10, 599-609.
- Müller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2001). Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-213.
- Newman, A. J. (1997). The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 16, 5797-5800.
- Newman, A. J., und Norman, C. (1992). U5 snRNA interacts with exon sequences at 5' and 3' splice sites. *Cell* 68, 743-54.
- Oeffinger, M., Wei, K. E., Rogers, R., DeGrasse, J. A., Chait, B. T., Aitchison, J. D., und Rout, M. P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods* 4, 951-6.
- Ohi, M. D., und Gould, K. L. (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA.* 8, 798-815.
- Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S., und Sharp, P. A. (2003). Splicing of Messenger RNA Precursors. *Annu Rev Biochem* 55, 1119-1150.
- Palancade, B., Zuccolo, M., Loeillet, S., Nicolas, A., und Doye, V. (2005). Pml39, a Novel Protein of the Nuclear Periphery Required for Nuclear Retention of Improper Messenger Ribonucleoparticles. *Mol. Biol. Cell* 16, 5258-5268.
- Parker, R., und Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11, 121-127.
- Pedrioli, P. G. A., Leidel, S., und Hofmann, K. (2008). Urm1 at the crossroad of modifications. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* 9, 1196-202.
- Peebles, C., Belcher, S., Zhang, M., Dietrich, R., und Perlman, P. (1993). Mutation of the conserved first nucleotide of a group II intron from yeast mitochondrial DNA reduces the rate but allows accurate splicing. *J. Biol. Chem.* 268, 11929-11938.
- Pena, V., Rozov, A., Fabrizio, P., Lührmann, R., und Wahl, M. C. (2008). Structure and function of an RNase H domain at the heart of the spliceosome. *EMBO J.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843295> [Zugegriffen Oktober 11, 2008].

- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotech* 21, 921-926.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20.
- Pikielny, C. W., und Rosbash, M. (1986). Specific small nuclear RNAs are associated with yeast spliceosomes. *Cell* 45, 869-77.
- Query, C. C., und Konarska, M. M. (2004). Suppression of Multiple Substrate Mutations by Spliceosomal prp8 Alleles Suggests Functional Correlations with Ribosomal Ambiguity Mutants. *Molecular Cell* 14, 343-354.
- Rader, S. D., und Guthrie, C. (2002). A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA* 8, 1378-92.
- Raghuathan, P. L., und Guthrie, C. (1998). A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science* 279, 857-60.
- Rain, J. C., und Legrain, P. (1997). In vivo commitment to splicing in yeast involves the nucleotide upstream from the branch site conserved sequence and the Mud2 protein. *EMBO J* 16, 1759-71.
- Ramelot, T. A., Cort, J. R., Yee, A. A., Semesi, A., Edwards, A. M., Arrowsmith, C. H., und Kennedy, M. A. (2003). Solution structure of the yeast ubiquitin-like modifier protein Hub1. *Journal of Structural and Functional Genomics* 4, 25-30.
- Ritchie, K. J., und Zhang, D. (2004). ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol* 15, 237-46.
- Roman, H. (1956). Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21, 175-85.
- Rosas-Acosta, G., Russell, W. K., Deyrieux, A., Russell, D. H., und Wilson, V. G. (2005). A Universal Strategy for Proteomic Studies of SUMO and Other Ubiquitin-like Modifiers. *Mol Cell Proteomics* 4, 56-72.
- Rosbash, M., Harris, P. K., Woolford, J. L., und Teem, J. L. (1981). The effect of temperature-sensitive RNA mutants on the transcription products from cloned ribosomal protein genes of yeast. *Cell* 24, 679-86.

- Ruskin, B., Krainer, A. R., Maniatis, T., und Green, M. R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 38, 317-331.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M., und Khochbin, S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 90, 306-12.
- Sawa, H., und Abelson, J. (1992). Evidence for a base-pairing interaction between U6 small nuclear RNA and 5' splice site during the splicing reaction in yeast. *PNAS* 89, 11269-11273.
- Scherrer, F. W., und Spingola, M. (2006). A subset of Mer1p-dependent introns requires Bud13p for splicing activation and nuclear retention. *RNA* 12, 1361-1372.
- Schlieker, C. D., Veen, A. G. V. D., Damon, J. R., Spooner, E., und Ploegh, H. L. (2008). A functional proteomics approach links the ubiquitin-related modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 18255-18260.
- Schmidt, D., und Müller, S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 60, 2561-74.
- Schmitz, J., Chowdhury, M. M., Hänzelmann, P., Nimtz, M., Lee, E., Schindelin, H., und Leimkühler, S. (2008). The sulfurtransferase activity of Uba4 presents a link between ubiquitin-like protein conjugation and activation of sulfur carrier proteins. *Biochemistry* 47, 6479-89.
- Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S., und Buchberger, A. (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cd-c48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep.* 5, 818-824.
- Senapathy, P., Shapiro, M. B., und Harris, N. L. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183, 252-78.
- Seraphin, B., und Rosbash, M. (1989). Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing. *Cell* 59, 349-58.
- Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645-653.
- Siatecka, M., Reyes, J. L., und Konarska, M. M. (1999). Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev.* 13, 1983-1993.
- Sigismund, S., Polo, S., und Di Fiore, P. P. (2004). Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol* 286, 149-85.

- Sloper-Mould, K. E., Jemc, J. C., Pickart, C. M., und Hicke, L. (2001). Distinct Functional Surface Regions on Ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 276, 30483-30489.
- Smith, H. E., und Mitchell, A. P. (1989). A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9, 2142-52.
- Sontheimer, E., und Steitz, J. (1993). The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science* 262, 1989-1996.
- Spingola, M., und Ares, M. (2000). A Yeast Intronic Splicing Enhancer and Nam8p Are Required for Mer1p-Activated Splicing. *Molecular Cell* 6, 329-338.
- Spingola, M., Armisen, J., und Jr, M. A. (2004). Mer1p is a modular splicing factor whose function depends on the conserved U2 snRNP protein Snu17p. *Nucleic Acids Res.* 32, 1242-1250.
- Stevens, S. W., Barta, I., Ge, H. Y., Moore, R. E., Young, M. K., Lee, T. D., und Abelson, J. (2001). Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6 x U5 small nuclear ribonucleoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 7, 1543-1553.
- Tanaka, T., Kawashima, H., Yeh, E. T. H., und Kamitani, T. (2003). Regulation of the NEDD8 Conjugation System by a Splicing Variant, NUB1L. *J. Biol. Chem.* 278, 32905-32913.
- Tanji, K., Tanaka, T., und Kamitani, T. (2005). Interaction of NUB1 with the proteasome subunit S5a. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 116-120.
- Teem, J. L., und Rosbash, M. (1983). Expression of a beta-galactosidase gene containing the ribosomal protein 51 intron is sensitive to the rna2 mutation of yeast. *PNAS* 80, 4403-4407.
- Thomas, B. J., und Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* Vol 56, 619-630.
- Tong, A. H. Y. u. a. (2001). Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants. *Science* 294, 2364-2368.
- Trowitzsch, S., Weber, G., Lührmann, R., und Wahl, M. C. (2008). Crystal Structure of the Pml1p Subunit of the Yeast Precursor mRNA Retention and Splicing Complex. *Journal of Molecular Biology* In Press, Corrected Proof. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-4TW14YY-1/2/90722f1d605180892f9adf8ed4d79611> [Zugegriffen Dezember 11, 2008].
- Tsai, W. u. a. (1999). Cef1p Is a Component of the Prp19p-associated Complex and Essential for Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* 274, 9455-9462.

- Umen, J. G., und Guthrie, C. (1996). Mutagenesis of the Yeast Gene Prp8 Reveals Domains Governing the Specificity and Fidelity of 3' Splice Site Selection. *Genetics*. 143, 723–739.
- Vertegaal, A. C. O., Ogg, S. C., Jaffray, E., Rodriguez, M. S., Hay, R. T., Andersen, J. S., Mann, M., und Lamond, A. I. (2004). A Proteomic Study of SUMO-2 Target Proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 33791-33798.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., und Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Wahle, E., und Rügsegger, U. (1999). 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 277-295.
- Wang, Q., He, J., Lynn, B., und Rymond, B. C. (2005). Interactions of the Yeast SF3b Splicing Factor. *Mol Cell Biol.* 25, 10745–10754.
- Watkins, J. F., Sung, P., Prakash, L., und Prakash, S. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol Cell Biol.* 13, 7757–7765.
- Watson, J. D., und Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-8.
- Weiss, S. B., und Nakamoto, T. (1961). The Enzymatic Synthesis of RNA: Nearest-Neighbor Base Frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47, 1400–1405.
- Westhof, E. (2001). Group I introns and RNA folding. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1149-1152.
- von Wettstein, D., Rasmussen, S. W., und Holm, P. B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* 18, 331-413.
- Wilkinson, C. R., Dittmar, G. A., Ohi, M. D., Uetz, P., Jones, N., und Finley, D. (2004). Ubiquitin-like Protein Hub1 Is Required for Pre-mRNA Splicing and Localization of an Essential Splicing Factor in Fission Yeast. *Current Biology* 14, 2283-2288.
- Wilmes, G. M. u. a. (2008). A Genetic Interaction Map of RNA-Processing Factors Reveals Links between Sem1/Dss1-Containing Complexes and mRNA Export and Splicing. *Mol Cell* 32, 735-46.

- Wilson, D. S., und Keefe, A. D. (2000). Unit 8.3 Random Mutagenesis by PCR. In *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- Winzeler, E. A. u. a. (1999). Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* 285, 901-906.
- Woolford, J. L. (1989). Nuclear pre-mRNA splicing in yeast. *Yeast* 5, 439-57.
- Wu, J. A., und Manley, J. L. (1991). Base pairing between U2 and U6 snRNAs is necessary for splicing of a mammalian pre-mRNA. *Nature* 352, 818-21.
- Wyndham, A. M., Baker, R. T., und Chelvanayagam, G. (1999). The Ubp6 family of deubiquitinating enzymes contains a ubiquitin-like domain: SUB. *Protein Sci.* 8, 1268-1275.
- Yang, K., Zhang, L., Xu, T., Heroux, A., und Zhao, R. (2008). Crystal structure of the  $\beta$ -finger domain of Prp8 reveals analogy to ribosomal proteins. *PNAS* 105, 13817-13822.
- Yashiroda, H., und Tanaka, K. (2004). Hub1 is an essential ubiquitin-like protein without functioning as a typical modifier in fission yeast. *Genes to Cells* 9, 1189-1197.
- Zhuang, Y., und Weiner, A. M. (1989). A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation. *Genes Dev* 3, 1545-52.
- Ziolkowska, A., Carraro, G., Rebuffat, P., Nussdorfer, G., Rucinski, M., und Malendowicz, L. (2004). Beacon[47-73] inhibits glucocorticoid secretion and growth of cultured rat and human adrenocortical cells. *Int J Mol Med* 14, 457-61.
- Zou, W., und Zhang, D. (2006). The Interferon-inducible Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase (E3) EFP Also Functions as an ISG15 E3 Ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 3989-3994.
- Zubay, G. (1958). A Possible Mechanism for the Initial Transfer of the Genetic Code from Deoxyribonucleic Acid to Ribonucleic Acid. *Nature* 182, 112-113.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

(m/sn) RNP	(messenger/small nuclear) Ribonucleoprotein Particle
(m/t) RNS	(messenger/transfer) Ribonukleinsäure
(RT-) PCR	(Reverse Transcriptase-) Polymerase Chain Reaction
5-FOA	5'-Fluoro-orotic acid
5'-/3'-SS	5'-/3'-Spleißstelle
AD	Activating Domain
ATP	Adenosin-Triphosphat
BD	Binding Domain
BS	Branch Site
CBC	Cap Binding Complex
CC	Commitment Complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EMS	Ethylmethansulfonat
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetate
NaCl	Natriumchlorid
NMD	Nuclear Mediated Decay
NTC	Nineteen Complex
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside
PAP	Peroxidase gekoppelter anti-Peroxidase Antikörper
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PQ	Paraquat
ProA	Protein A
RES	prä-mRNS-Retention und Exportsystem
SDS(-PAGE)	Sodium-Dodecylsulfat(-Polyacrylamid Gelelektrophorese)
TAP	Tandem Affinity Purification
TEL (-PEG)	Tris-EDTA-Lithiumacetat (-Polyethylenglycol)
UBA	Ubiquitin Associated Domain
UDP	Ubiquitin Domain Protein
UIM	Ubiquitin Interaction Motif
ULM	Ubiquitin Like Modifier
UPR (ER/MT)	Unfolded Protein Response (Endoplasmic Reticulum/Mitochondrium)
YP (D/G)	Yeast Extract Peptone (Dextrose/Glycerol)

## 6.2 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich Dissertation mit dem Thema „Die Funktion des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Hub1 in *S. cerevisiae*“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

## 6.3 Danksagung

Ich möchte hier die Gelegenheit nutzen, meinen Dank an folgende Personen und Einrichtungen auszudrücken:

Dr. Gunnar Dittmar, der mir die Gelegenheit gab an diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Vielen Dank sowohl für die fachliche Betreuung dieser Arbeit, als auch für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Hilfe bei auftretenden Schwierigkeiten.

Prof. Dr. Thomas Sommer und Arbeitsgruppe, ohne deren Hilfe viele Experimente gar nicht möglich gewesen wären. Besonderer Dank geht an Ernst Jarosch, Birgit Meußner und Christian Hirsch, für die Bereitschaft zur Diskussion technischer Probleme, sowie an Corinna Volkwein und Angelika Wittstruck, die in kniffligen Situationen gekonnt auszuhelfen wussten.

Dr. Katrin Stade und Anja Neuber, für guten Rat und technische Hilfe.

Nieves Martínez-Marshall, für ihr offenes Ohr und helfende Hand im Labor.

Des weiteren möchte ich Dr. J. D. Beggs, Dr. C. Query und Dr. M. Spingola für Hefestämme und Plasmide danken, die für dieses Projekt wertvolle Dienste leisteten. Danke auch an Hyun-Mi Ryu, die mich während ihres Praktikums bei der Vorbereitung der „two hybrid“-Interaktion mit Snu66 unterstützt hat. Mein Dank gilt ebenfalls der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Investitionsbank Berlin und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, für ihre finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Zum Schluß, aber dafür von ganzem Herzen, danke ich meinen Eltern für ihr Interesse und seelischen Beistand, meiner Schwester zusätzlich für ihre Motivierung und neue Blickwinkel, und vor allem Christel für ihre Unterstützung, Anteilnahme aber auch Geduld.

Berlin, den 18. Dezember 2008

Mathias Dahlmann