

**Nachweis und Charakterisierung von Crp1p,  
einem neuen Holliday-Struktur bindenden Protein  
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Ulrich Rass  
aus Saarlouis

Köln, 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Börries Kemper

Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2004

## Abstract

A central intermediate of genetic recombination is the four-way DNA junction termed Holliday-junction. For *in vitro* experiments this DNA-structure is replaced by an analogous synthetic substrate, the so-called X-DNA. A number of very different proteins has been found to specifically bind to this structure. Some of them are clearly connected to recombination. This work describes a new X-DNA-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Using different chromatography media, it was purified from yeast extracts to an extent that allowed for identification. After detection by Southwestern analysis the protein was isolated for sequencing. It turned out to be an as yet uncharacterized product of the open reading frame *YHR146W*. The protein of 465 amino acids was given the functional name Cruciform DNA-Recognising Protein 1 (Crp1p).

The respective gene was cloned, expressed in *E. coli* and the product was analysed in electromobility shift assays. The observed substrate specificity confirmed that Crp1p is indeed responsible for the X-DNA-binding activity observed in yeast extracts. Recombinant Crp1p proved instable and was shown to be posttranslationally cleaved at around amino acid 160. This leads to an N-terminal subpeptide with intrinsic X-DNA-binding activity and a C-terminal subpeptide that is capable of binding X-DNA only in the absence of competitor DNA. The structure specificity of the N-terminal peptide is mediated by a novel X-DNA-binding domain. This domain – as determined so far– is made up by 22 amino acids and of positive charge. When expressed as an independent subpeptide, it showed autonomous X-DNA-binding capacity. Up to now, phenotypic analysis of *crp1* mutants gave no hint of Crp1p participating in recombination. Thus, no elevated UV- or X-ray-sensitivity and no meiotic defect could be detected. To further investigate in which molecular process Crp1p might function, interaction partners were sought for by yeast 2-hybrid analysis. Interestingly, two RNA-binding proteins, Drs1p and Gno1p, were identified. Both of them function in pre-rRNA processing in ribosome synthesis, which raises the possibility that the *in vivo* target for Crp1p is structured RNA rather than structured DNA.

# Inhaltsverzeichnis

<i>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</i> .....	V
<i>Abkürzungen und Begriffe</i> .....	VII
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. ABLAUF DER HOMOLOGEN REKOMBINATION.....	1
1.2. PROTEINE DER SPÄTEN PHASE DER HOMOLOGEN REKOMBINATION: DAS RUVABC PARADIGMA.....	6
1.3. PROTEINE DER SPÄTEN PHASE DER HOMOLOGEN REKOMBINATION BEI EUKARYOTEN .....	8
1.3.1. <i>Die Suche nach branch migration- und X-Solvase-Funktionen</i> .....	9
1.3.2. <i>Die Suche nach X-DNA bindenden Proteinen</i> .....	10
1.4. GRUNDLAGEN UND ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
2.1. MATERIAL.....	15
2.1.1. <i>Chemikalien</i> .....	15
2.1.2. <i>Grundstoffe und Zusätze für Nährmedien</i> .....	15
2.1.3. <i>Radioisotope</i> .....	16
2.1.4. <i>Puffer und Lösungen</i> .....	16
2.1.5. <i>Stämme</i> .....	17
2.1.6. <i>Plasmide</i> .....	18
2.1.7. <i>Oligonukleotide</i> .....	19
2.1.8. <i>DNA-Substrate</i> .....	21
2.1.9. <i>Geräte und Apparaturen</i> .....	22
2.2. METHODEN .....	23
2.2.1. <i>Mikrobiologische Methoden</i> .....	23
2.2.2. <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	24
2.2.3. <i>Methoden der Hefegenetik</i> .....	55
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>59</b>
3.1. IDENTIFIZIERUNG VON CRP1P .....	59
3.1.1. <i>Chromatographische Reinigung der X-DNA bindenden Aktivität</i> .....	59
3.1.2. <i>Bestimmung der relativen Molekülmasse des X-DNA bindenden Proteins</i> .....	63
3.1.3. <i>Identifizierung des X-DNA bindenden Proteins als Yhr146wp</i> .....	67
3.2. CHARAKTERISIERUNG VON CRP1P .....	71
3.2.1. <i>Rekombinantes Crp1p bindet spezifisch X-DNA</i> .....	71
3.2.2. <i>Rekombinantes Crp1p wird proteolytisch gespalten</i> .....	73
3.2.3. <i>Untersuchungen an Crp1p-Derivaten</i> .....	78
3.3. PHÄNOTYPISCHE ANALYSE VON CRP1Δ-ZELLEN .....	88
3.3.1. <i>Deletion von CRP1</i> .....	89
3.3.2. <i>Bestrahlung mit Röntgenstrahlung</i> .....	90
3.3.3. <i>Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen</i> .....	92
3.3.4. <i>Sporulation von crp1Δ-Zellen</i> .....	94
3.4. UNTERSUCHUNGEN ZU PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN VON CRP1P .....	95
3.4.1. <i>Hefe-2-Hybrid-Analyse</i> .....	95
3.4.2. <i>Biochemische Analyse der gefundenen Interaktionen</i> .....	104
3.5. WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE .....	111
3.5.1. <i>Crp1p und Mdg1p</i> .....	111
3.5.2. <i>Crp1p stimuliert die X-Solvase-Aktivität der Endonuklease VII</i> .....	117
3.5.3. <i>Subzelluläre Lokalisation von GFP-Crp1p</i> .....	120
3.5.4. <i>Untersuchungen zur Spaltung von Crp1p</i> .....	121

---

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>123</b>
4.1.	REINIGUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON CRP1P.....	123
4.2.	POSTTRANSLATIONALE SPALTUNG VON CRP1P.....	124
4.3.	BINDUNG VON CRP1P AN DNA.....	127
4.4.	DIE X-DNA BINDENDE DOMÄNE VON CRP1P.....	128
4.5.	TEILNAHME VON CRP1P AN REKOMBINATIONSPROZESSEN.....	129
4.5.1.	<i>Mitotische Rekombination.....</i>	<i>129</i>
4.5.2.	<i>Mitotische Rekombination und DNA-Replikation.....</i>	<i>133</i>
4.5.3.	<i>Meiotische Rekombination.....</i>	<i>135</i>
4.5.4.	<i>Fazit.....</i>	<i>137</i>
4.6.	MÖGLICHE PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN VON CRP1P.....	138
4.6.1.	<i>Ergebnisse der Hefe-2-Hybrid-Analyse.....</i>	<i>138</i>
4.6.2.	<i>Biochemische Untersuchung der gefundenen Hefe-2-Hybrid-Interaktionen.....</i>	<i>140</i>
4.6.3.	<i>Implikationen der Hefe-2-Hybrid-Interaktionen für die Rolle von Crp1p.....</i>	<i>143</i>
4.7.	AUSBLICK.....	146
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>148</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>150</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des DSB-Modells der homologen Rekombination. ....	2
Abbildung 2: Konfigurationen der Holliday-Struktur und Wirkungsweise des RuvABC-Resolvasoms .....	7
Abbildung 3: Substratspezifität der untersuchten X-DNA bindenden Aktivität der Hefe <i>S. cerevisiae</i> . ....	12
Abbildung 4: Die untersuchte X-DNA bindende Aktivität der Hefe <i>S. cerevisiae</i> stimuliert die X-Solvase-Aktivität von Endo VII. ....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pGBKT7. ....	41
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pGADT7. ....	42
Abbildung 7: Schematische Darstellung des X-DNA-Substrats CF110. ....	60
Abbildung 8: Reinigungsschema und EMSA-Analyse der X-DNA bindenden Aktivität. ....	61
Abbildung 9: Nachweis der X-DNA bindenden Aktivität mit Hilfe der Southwestern Technik. ....	64
Abbildung 10: Nachweis möglicher X-DNA bindender Proteine in Heparin-Sepharose Fraktionen. ....	66
Abbildung 11: Nachweis und Präparation möglicher X-DNA bindender Proteine. ....	67
Abbildung 12: Aminosäuresequenz von Crp1p. ....	70
Abbildung 13: Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinantem Crp1p. ....	72
Abbildung 14: Substratspezifität von rekombinantem Crp1p. ....	73
Abbildung 15: Proteolytische Spaltung von rekombinantem Crp1p. ....	76
Abbildung 16: Lage der proteolytischen Spaltstelle in rekombinantem Crp1p. ....	79
Abbildung 17: Vergleichende EMSA-Analyse von Crp1p-Derivaten zur Kartierung der X-DNA bindenden Domäne. ....	82
Abbildung 18: Lage der X-DNA bindenden Domäne von Crp1p. ....	84
Abbildung 19: Bestimmung von Dissoziationskonstanten für Crp1p-DNA-Komplexe. ....	86
Abbildung 20: Volle-Länge-Crp1p bindet X-DNA. ....	88
Abbildung 21: Wachstum von <i>crp1Δ</i> -Mutanten unter verschiedenen Bedingungen. ....	89
Abbildung 22: Röntgenstrahlungstoleranz von <i>crp1Δ</i> -Mutanten. ....	91
Abbildung 23: UV-Strahlungstoleranz einer <i>crp1Δmdg1Δ</i> -Mutante. ....	93
Abbildung 24: <i>crp1Δ</i> -Zellen bilden lebensfähige Sporen. ....	94
Abbildung 25: GAL4-DND-BD-Crp1p Fusionsproteine. ....	96
Abbildung 26: Kontrolle der Hefe-2-Hybrid-Interaktionen von Crp1p <sup>aal-160</sup> mit Fragmenten der Proteine Drs1p, Gno1p und Egt2p. ....	102
Abbildung 27: Schematische Darstellung der bestätigten Hefe-2-Hybrid-Interaktionspartner von Crp1p. ....	103
Abbildung 28: In vitro Translation und Co-Immunopräzipitationsexperimente. ....	106
Abbildung 29: In <i>S. cerevisiae</i> exprimierte Köder- und Beuteproteine für Co-Immunopräzipitationsexperimente. ....	108
Abbildung 30: Co-Immunopräzipitationsexperiment von in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten Köder- und Beuteproteinen mit einem Anti-Myc Antikörper. ....	109
Abbildung 31: Co-Immunopräzipitationsexperiment von in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten Köder- und Beuteproteinen mit einem Anti-HA Antikörper. ....	110
Abbildung 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Crp1p und Mdg1p. ....	113
Abbildung 33: Mdg1p bindet X-DNA. ....	114
Abbildung 34: Mutationsanalyse von Crp1p. ....	116
Abbildung 35: Rekombinantes Crp1p stimuliert die X-Solvase-Aktivität von Endo VII. ....	118
Abbildung 36: Die Stimulation von Endo VII durch rekombinantes Crp1p lässt die Schnittpositionen unbeeinflusst. ....	119
Abbildung 37: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Crp1p. ....	120
Abbildung 38: In vitro translatiertes Crp1p bleibt stabil. ....	121
Abbildung 39: Immunologischer Nachweis von Crp1p in <i>S. cerevisiae</i> -Lysat. ....	122
Abbildung 40: Schematische Darstellung des synthesis-dependent strand annealing. ....	131
Abbildung 41: Mechanismen zum Neustart von Replikationsgabeln. ....	134

---

**Tabellen**

<i>Tabelle 1: Verwendete S. cerevisiae-Stämme</i> .....	17
<i>Tabelle 2: Verwendete E. coli-Stämme</i> .....	18
<i>Tabelle 3: Expressionsplasmide zur Verwendung in E. coli</i> .....	18
<i>Tabelle 4: Expressionsplasmide zur Verwendung in S. cerevisiae</i> .....	19
<i>Tabelle 5: Verwendete Primer zur Konstruktion von Expressionsplasmiden bzw. von Matrizen für die in vitro Expression von Proteinen</i> .....	19
<i>Tabelle 6: Oligonukleotide für DNA-Substrate</i> .....	20
<i>Tabelle 7: Primer für Deletionen und Modifikationen von Hefegenen</i> .....	20
<i>Tabelle 8: Verwendete DNA-Substrate</i> .....	21
<i>Tabelle 9: Stämme mit Deletion oder Modifikation von CRP1</i> .....	56
<i>Tabelle 10: Häufigkeiten von Codonen mit stark unterschiedlicher Bevorzugung in E. coli und S. cerevisiae und ihre jeweilige Häufigkeit in CRP1</i> .....	75
<i>Tabelle 11: Identifizierte Beuteproteine aus der genomischen Hefe-DNA-Bank</i> .....	99
<i>Tabelle 12: Beutegene aus der c-DNA-Bank mit bestätigter Hefe-2-Hybrid-Interaktion mit Crp1p<sup>aa1-160</sup></i> .....	101

## Abkürzungen und Begriffe

aa	<i>amino acid(s)</i> ; engl.: Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>break induced replication</i> ; engl.: „Bruch-induzierte Replikation“; Bezeichnung eines Modells zur genetischen Rekombination
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BPB	Bromphenolblau
Bq	Becquerel
% C	Gewichtsprozent des Crosslinkers N,N'-Methylenbisacrylamid
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure
Ci	Curie
CF	hier: Cruziforme (im Sinne eines X-DNA-Substrates)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Symbol für eine genetische Deletion
Da	Dalton
DSB	Doppelstrangbruch (in der DNA)
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur; Bezeichnung eines Modells zur genetischen Rekombination
DTT	Dithiothreitol
Durchfluss	hier: Anteil einer Proteinlösung, der beim Ladevorgang einer Säulenchromatographie nicht an die Säule bindet
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electromobility shift assay</i> ; engl.: Gel-Retentionsanalyse
Endo VII	Endonuclease VII des Bakteriophagen T4
FPLC	Flüssigkeitschromatographie (engl.)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H <sub>2</sub> O <sup>mp</sup>	vollentsalztes, sterilisiertes Millipore-Reinstwasser
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.)
I	Inosin-5'-phosphat
<i>Input</i>	hier: Proteinlösung, die mittels Säulenchromatographie fraktioniert werden soll (engl.)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LC-ESI MS-MS	<i>liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry</i> ; engl.: Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisation-Tandem-Massenspektroskopie
MALDI-TOF MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectroscopy</i> ; engl.: Matrix assistierte Laserdesorption/ionisation-Flugzeitmassenspektroskopie
MMS	Methylmethansulfonat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-Terminus	Amino-Terminus
p.A.	<i>per analysis</i> ; lat.: zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl.)
PBS	phosphatgepufferte Saline (engl.)

---

PBST	phosphatgepufferte Saline (engl.) mit Tween20
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-TOF MS	<i>quadrupole-time of flight mass spectroscopy</i> ; engl.: Quadrupol-Flugzeitmassenspektroskopie
RT	Raumtemperatur
SD	Selektionsmedium (engl.)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.)
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i> ; engl.: „syntheseabhängige Stranganlagerung“; Bezeichnung eines Modells zur genetischen Rekombination
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetraethylamin
Tris	Tris-[Hydroxymethyl-]aminoethan
üN	über Nacht
Wasch	hier: Anteil einer Proteinlösung, der beim Ladevorgang einer Säulenchromatographie nur schwach an die Säule bindet und unmittelbar nach dem Ladevorgang mit Ladepuffer von der Säule gewaschen werden kann
X- $\alpha$ -Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\alpha$ -D-galaktoside
XC	Xylencyanol

# 1. Einleitung

Das grundlegende Thema der vorliegenden Arbeit ist die genetische Rekombination, im speziellen die homologe Rekombination (HR). Dieser Prozess erlaubt den Austausch von genetischer Information zwischen homologen DNA-Doppelsträngen und wird von der Natur zur Instandhaltung des genetischen Materials und der Schaffung genetischer Variabilität genutzt.

Während des Austauschprozesses bilden die rekombinierenden DNA-Doppelstränge hybride Bereiche aus, in denen sich DNA-Einzelstränge beider Moleküle miteinander paaren. Dadurch entsteht ein charakteristischer Knotenpunkt, an dem vier doppelsträngige DNA-Segmente zusammenlaufen. Dieses Rekombinationsintermediat wurde 1964 von Robin Holliday postuliert (Holliday, 1964) und wird daher als Holliday-Struktur bezeichnet. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die in der Lage sind, mit solchen Holliday-Strukturen spezifisch in Wechselwirkung zu treten.

## 1.1. Ablauf der homologen Rekombination

Die HR ist ein präziser operativer Eingriff ins Erbmaterial. Sie wird durch eine Reihe spezialisierter Proteinfaktoren, sog. Rekombinasen, katalysiert und verläuft bis auf das Basenpaar genau. Ihr Mechanismus ist zwischen Viren, Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryoten hoch konserviert. Das von Szostak, Orr-Weaver, Rothstein und Stahl vorgeschlagene Modell der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR, Szostak *et al.*, 1983) gilt als kanonisches Modell zum molekularen Ablauf. Es ist eine Weiterentwicklung der Modellvorstellungen von Holliday (Holliday, 1964) und von Meselson und Radding (Meselson & Radding, 1975). Das Modell basiert auf den Ergebnissen genetischer Untersuchungen der Meiose in der Hefe.

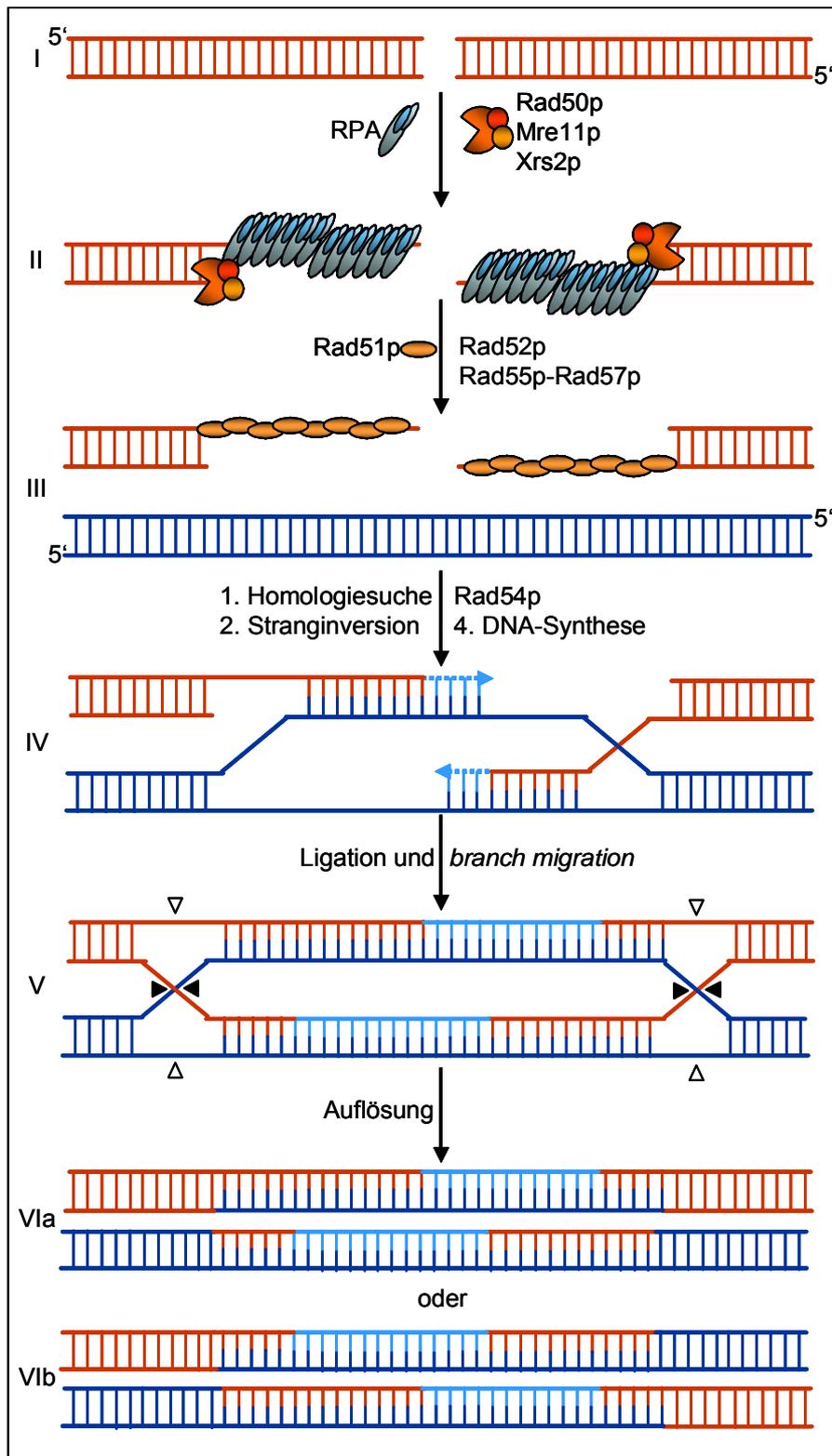
Im Folgenden wird das DSBR-Modell unter Einbeziehung der wichtigsten Faktoren aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorgestellt. Sie ist das wichtigste Modellsystem für eukaryotische Rekombinationsvorgänge und Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit. Viele anhand dieses Fallbeispiels erklärten Vorgänge haben allgemeingültigen Charakter (Abbildung 1; Paques & Haber, 1999; Sung *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2003).

Auslöser der HR sind Doppelstrangbrüche (DSBs) in der DNA. Diese können auf verschiedene Weise entstehen. In der Meiose werden sie gezielt durch die spezialisierte Topoisomerase Spo11p eingeführt (Keeney *et al.*, 1997). Damit sind Ereignisse der HR vorprogrammiert, die sowohl die ordentliche Segregation der Chromosomen in der Meiose I als auch die genetische Vielfalt der Tochterzellen garantieren (Roeder, 1997). DSBs treten aber auch ungewollt auf, wenn ein DNA-Bereich mit einem Einzelstrangbruch repliziert wird, eine Replikationsgabel auf ein unüberwindbares Hindernis aufläuft oder exogene Faktoren wie chemische Agenzien oder ionisierende Strahlung auf die DNA einwirken. Ein einmal entstandener DSB ist potentiell letal und muss zum Erhalt der Zelle repariert werden. Dabei greift die Hefe fast ausschließlich auf die HR zurück. Die Alternative, das einfache Fusionieren der Doppelstrangenden, auch *non-homologous end-joining* (NHEJ) genannt, spielt, anders als in Säugerzellen, kaum eine Rolle. NHEJ fixiert einen eventuellen Verlust von Sequenzmaterial vor der Fusion der DNA-Enden als Mutation. Damit stellt sie kein fehlerfreies Reparatursystem dar. Die HR hingegen stellt die volle Sequenzinformation unter Zuhilfenahme eines sog. Donormoleküls, das eine zum betroffenen, sog. Akzeptormolekül homologe Sequenz aufweist, wieder her.

---

**Abbildung 1 (folgende Seite): Schematische Darstellung des DSBR-Modells der homologen Rekombination.**

Das Rekombinationsereignis findet zwischen einem rot (Akzeptormolekül) und einem blau (Donormolekül) dargestellten DNA-Doppelstrang statt (der blaue DNA-Doppelstrang ist zur Vereinfachung der Darstellung um seine Längsachse gedreht). Nach Auftreten eines DNA-DSB (I) werden die Bruchenden vom (II) Rad50p-Mre11p-Xrs2p-Komplex abgebaut, so dass rekombinogene 3'-Einzelstrangüberhänge entstehen, die zunächst vom RPA-Komplex bedeckt werden. Das Strangtransferprotein Rad51p ersetzt RPA und bildet so aktive Nukleoproteinfilamente, die mit komplementären Bereichen des Donormoleküls paaren (IV). In den daraus entstehenden Heteroduplex-DNA-Bereichen dienen die 3'-Enden als Primer für eine DNA-Reparatursynthese. Unter Bildung zweier Holliday-Strukturen werden die neu synthetisierten Stränge mit den ursprünglich prozessierten 5'-Enden des Akzeptormoleküls ligiert (V). *Branch migration* führt im dargestellten Fall zu Vergrößerung der Heteroduplex-DNA-Bereiche. Die Rekombinationsprodukte entstehen hier durch Auflösung an den mit schwarzen Pfeilen markierten Stellen (VIa), oder alternativ durch Auflösung an den mit weißen (links) und mit schwarzen (rechts) Pfeilen markierten Stellen (VIb), wobei es zur Genkonversion bzw. zur Genkonversion mit reziprokem Informationsaustausch (*cross-over*) kommt. Die graphisch dargestellten und namentlich erwähnten Proteine sind Genprodukte der *RAD52*-Epistasegruppe, die unabdingbar für den dargestellten Prozess sind (neu synthetisierte DNA ist hellblau, Basenpaare sind als vertikale Linien dargestellt; rot-blaue Basenpaare kennzeichnen Heteroduplex-DNA-Bereiche; weitere Erklärungen im Text).



In der frühen Phase der HR werden zunächst mehrere hundert Nukleotide an den 5'-Enden des DSB durch einen multifunktionalen Proteinkomplex aus Rad50p, Mre11p (Nukleaseaktivität) und Xrs2p abgebaut (Abbildung 1, I, II). Die dabei entstehenden 3'-Überhänge werden vom Einzelstrang-DNA bindenden RPA-Heterotrimer aus Rfa1p, Rfa2p und Rfa3p gebunden. Dieser Schritt entfernt mögliche Sekundärstrukturen der Einzelstränge und erlaubt die Ausbildung eines gleichmäßigen Nukleoproteinfilaments, wenn im Folgenden RPA gegen Rad51p ausgetauscht wird (Sugiyama & Kowalczykowski, 2002; Abbildung 1, III). Dieser Austausch wird durch die hohe Affinität von RPA zu Einzelstrang-DNA behindert und muss durch Rad52p unterstützt werden. Ein weiterer Hilfsfaktor für diesen Schritt ist das Rad55p-Rad57p Heterodimer. Rad51p, das nun einen Komplex mit den Einzelsträngen bildet, vermittelt die Suche nach einem homologen Donormolekül. Ist es gefunden, katalysiert Rad51p die Inversion des gebundenen Einzelstrangs. Dies erlaubt die Paarung mit dem komplementären Strang des Donormoleküls, während der homologe Strang in einer sog. *displacement loop* (D-loop) verdrängt wird. Dieser Strang wiederum paart mit dem zweiten Einzelstrang des Akzeptormoleküls. Dadurch bilden sich Hybrid-Doppelstränge, sog. Heteroduplex-DNA, mit je einem Strang aus zwei unterschiedlichen DNA-Molekülen. An den Donorsträngen als Matrize beginnt nun an beiden 3'-Enden eine DNA-Neusynthese zur Wiederherstellung des verlorenen Sequenzmaterials (Abbildung 1, IV). Der Übergang vom Stadium der Paarung zur Synthese wird von Rad54p unterstützt (Sugawara *et al.*, 2003). Nach abgeschlossener Synthese führt die Ligation der neu synthetisierten Stränge mit den zu Anfang prozessierten 5'-Enden zur Bildung eines sog. *joint molecule* (engl.: verbundenes Molekül) aus Donor- und Akzeptormolekül. Beide werden durch zwei der bereits erwähnten Holliday-Strukturen zusammengehalten. Diese können ihre Lage durch die Wanderung der Kreuzungspunkte verändern (*branch migration*) und damit die Ausdehnung der Heteroduplex-DNA beeinflussen.

Um die HR abzuschließen und die Rekombinationspartner wieder zu trennen, müssen die Holliday-Strukturen aufgelöst werden. Dies geschieht durch spezialisierte Endonukleasen (X-Solvasen; der Buchstabe X symbolisiert die Kreuzung von DNA-Strängen in der Holliday-Struktur) und führt je nach Orientierung der Schnitte zu unterschiedlichen Rekombinationsprodukten. Schnitte können in den ausgetauschten oder nicht ausgetauschten Strängen erfolgen (Abbildung 1, V, durch schwarze bzw.

weiße Pfeile gekennzeichnet). Wenn beide Holliday-Strukturen in gleicher Orientierung geschnitten werden, entstehen Produkte, die außerhalb des rekombinierten Bereiches den Ausgangsmolekülen entsprechen. Im Bereich der ursprünglichen Lücke tragen nun beide Moleküle die Sequenz des Donors (Abbildung 1, VIa). Da in diesem Bereich die Sequenz eines Moleküls in die eines anderen verwandelt wurde, spricht man von Genkonversion. Wenn die Holliday-Strukturen in unterschiedlicher Orientierung aufgelöst werden, ergeben sich sog. *cross-over*-Produkte, bei denen auch flankierende Bereiche (Sequenzen die jenseits der Holliday-Strukturen lagen) ausgetauscht werden (Abbildung 1, VIb). Man spricht dann von einem reziproken Informationsaustausch. Proteine, welche die einzelnen, im DSBR-Modell geforderten Schritte steuern können, wurden aus einer Vielzahl von Organismen und Viren isoliert. Mit ihrer Hilfe können Teile der DSBR *in vitro* rekonstituiert werden.

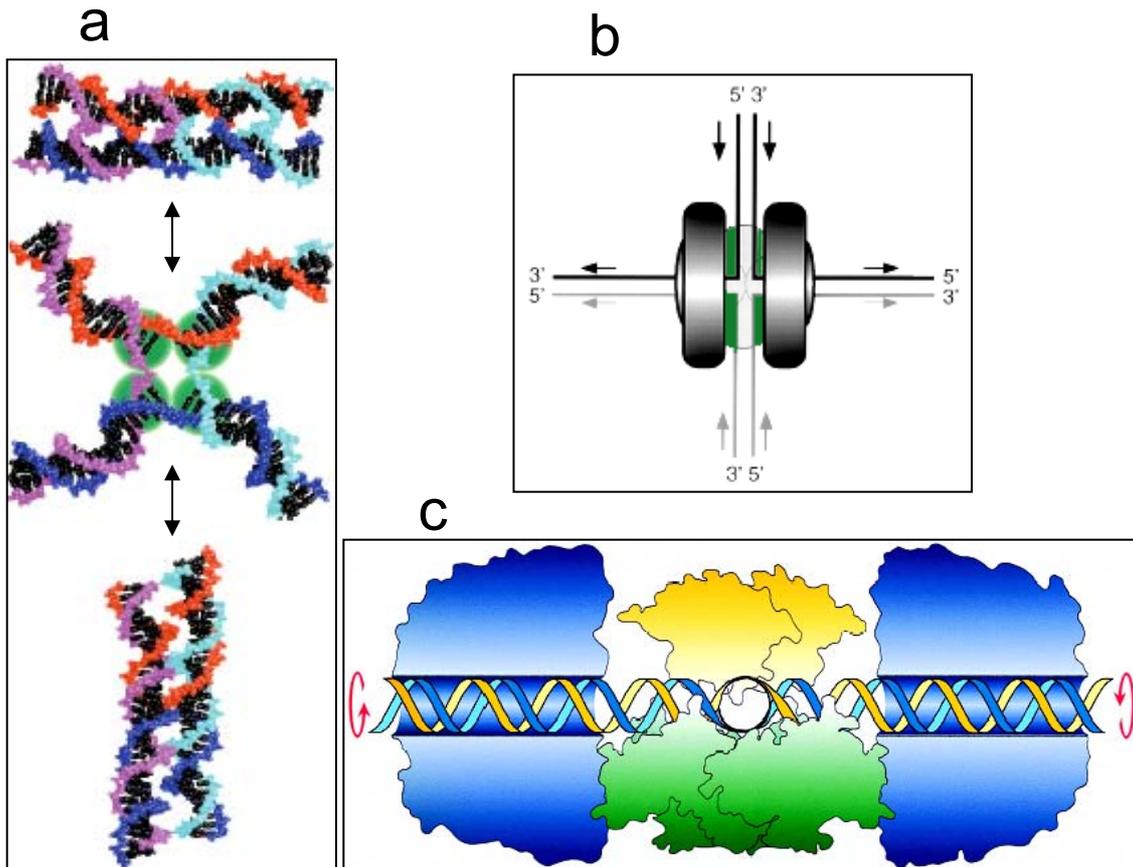
In *S. cerevisiae* sind es die Genprodukte der *RAD52*-Epistasegruppe, welche die Rad51p-abhängige HR katalysieren. In diese Gruppe fallen die Gene *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD53*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD56*, *RAD57*, *MRE11*, *XRS2* und *RFA1*. Ihre Mitglieder wurden ursprünglich aufgrund einer durch ihre Mutation hervorgerufene Sensitivität gegen ionisierende Strahlung entdeckt (Namensgebung nach dem englischen Begriff *radiation sensitive*; Symington, 2002). Durch eine Vielzahl an genetischen und biochemischen Untersuchungen stellte sich die zentrale Rolle der Untergruppe aus den bereits beschriebenen Proteinen Rad52p, Rad50p, Mre11p, Xrs2p, RPA, Rad51p (in Abbildung 1 durch Symbole dargestellt) mit den Hilfsproteinen Rad54p, Rad55p und Rad57p heraus (in Abbildung 1 namentlich aufgeführt). Neben diesen Genprodukten der *RAD52*-Epistasegruppe ist die HR auf DNA-Reparatursynthese-, DNA-Topoisomerase- und DNA-Ligase-Funktionen angewiesen.

Damit reicht das heutige Wissen über den Ablauf der eukaryotischen HR auf biochemischer Ebene bis zum Erscheinen des *joint molecule*, dem bereits erwähnten Rekombinationsintermediat aus zwei DNA-Doppelsträngen, die über zwei Holliday-Strukturen miteinander verbunden sind (vgl. Abbildung 1, V). Die Faktoren der späten Phase der HR, welche die *branch migration* und die Auflösung der Holliday-Strukturen katalysieren, konnten bei Eukaryoten trotz intensiver Forschung bis heute nicht isoliert werden.

## 1.2. Proteine der späten Phase der homologen Rekombination: das RuvABC Paradigma

Bei *Escherichia coli* liegen im Vergleich zu Eukaryoten umfassendere biochemische Erkenntnisse zur HR vor. Hier kann der gesamte Prozess vom DSB bis zum reparierten DNA-Molekül biochemisch nachvollzogen werden (Eggleston & West, 1996; Snyder & Champness, 2003). Dabei finden sich auch Prototypen der Funktionen der späten Phase der HR, die Proteine RuvA, RuvB und RuvC. Gemeinsam bilden sie das sog. Resolvasom mit gekoppelter *branch migration*/X-Solvase-Aktivität. RuvA erkennt und bindet Holliday-Strukturen aufgrund ihrer speziellen Architektur. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Holliday-Struktur in der sog. *stacked-X*-Form vor (Lilley & Norman, 1999 und Zitate darin). Diese Konfiguration zeichnet sich durch eine durchgehende Basenstapelung in den aus je zwei Armen zusammengesetzten Achsen aus. Pro Achse folgt ein DNA-Einzelstrang kontinuierlich dem Achsenverlauf, während der andere DNA-Einzelstrang zwischen den Achsen ausgetauscht wird. Die kontinuierlichen Stränge verlaufen antiparallel, was bedeutet, dass sich die ausgetauschten Stränge nicht überkreuzen (vgl. Abbildung 2a). Durch die Wechselwirkung mit einem RuvA-Tetramer geht die *stacked-X*-Form in eine vierfach symmetrische, planare Konfiguration über, wobei im Zentrum die Basenstapelung verloren geht (Hargreaves *et al.*, 1998; Abbildung 2a).

Diese planare Konfiguration ist Voraussetzung für den effizienten Ablauf der folgenden Schritte, die das Rekrutieren von RuvB durch RuvA eingeleitet werden. RuvB, der ATP-abhängige Motor der *branch migration*, lagert sich in Form zweier Hexamer-Ringe auf gegenüberliegenden Seiten des Kreuzungspunktes an. Diese üben eine gegenläufige Helikaseaktivität aus und pumpen dadurch DNA durch den Kreuzungspunkt (Abbildung 2b). Der Prozess kommt zum Abschluss, wenn die X-Solvase RuvC die Holliday-Struktur auflöst und die Rekombinationsprodukte freisetzt. RuvC schneidet dazu je einen Einzelstrang diesseits und jenseits des Kreuzungspunktes an exakt symmetrischen Positionen der planaren Holliday-Struktur, so dass die entstandenen Brüche ohne weitere Prozessierung ligiert werden können. Da man davon ausgeht, dass der RuvAB-Holliday-Struktur-Komplex zwei RuvA-Tetramere beinhaltet, die den Knotenpunkt für RuvC unzugänglich machen, wird angenommen, dass RuvC eines der beiden RuvA-Tetramere verdrängt, um seine Aktivität in einem kombinierten RuvABC-Resolvasom auszuüben (West, 1997; Sharples *et al.*, 1999; Abbildung 2c).



**Abbildung 2: Konfigurationen der Holliday-Struktur und Wirkungsweise des RuvABC-Resolvasoms**

(a) Die Holliday-Struktur liegt unter physiologischen Bedingungen in der *stacked-X*-Form vor (siehe Text). Ausgehend von der mittleren Darstellung gibt es zwei Alternativen für die *stacked-X*-Form: durchgehende Basenstapelung in zwei nebeneinander liegenden Armen (oben) oder zwei übereinander liegenden Armen (unten). Die ausgetauschten DNA-Einzelstränge ändern am Kreuzungspunkt ihre Verlaufsrichtung und überschneiden sich nicht (oben: hellblau und lila; unten: dunkelblau und rot). Das Protein RuvA (grün) zwingt die Holliday-Struktur in eine planare Konfiguration (Mitte), wobei am Kreuzungspunkt die Basenstapelung verloren geht. (b) Schematische Darstellung einer planaren Holliday-Struktur im Komplex mit RuvA (grün) und RuvB (grau). RuvB lagert sich in Form von Hexamer-Ringen an und pumpt unter ATP-Verbrauch DNA durch den Kreuzungspunkt. Hier ist die Bildung von Heteroduplex-DNA dargestellt: ein grauer und ein schwarzer DNA-Doppelstrang werden angezogen, während Hybrid-DNA (grau-schwarz) entlassen wird. Durch Anlagerung von RuvB an den vertikal verlaufenden Doppelsträngen würde der gegenläufige Prozess katalysiert. (c), Zur Freisetzung der Rekombinationsprodukte kann die Holliday-Struktur (hier in Seitenansicht) durch einen RuvC-Dimer aufgelöst werden. In dieser Darstellung sind die Umrisse von RuvA (grün) und RuvC (gelb) den Kristallstrukturen dieser Proteine (Rafferty *et al.*, 1996; Ariyoshi *et al.*, 1994) nachgebildet. Die Struktur von RuvB (blau) ist von einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Parsons *et al.*, 1995) abgeleitet. (a, verändert nach Heyer *et al.*, 2003; b, verändert nach West, 1996; c, verändert nach Sharples *et al.*, 1999).

### 1.3. Proteine der späten Phase der homologen Rekombination bei Eukaryoten

Wie bereits erwähnt, sind die eukaryotischen Proteine der *branch migration* und Holliday-Struktur-Auflösung bislang unbekannt. Da bei Eukaryoten keine eindeutigen Orthologe zum RuvABC-Resolvasom identifiziert wurden und bisher keine strahlungssensitiven Mutanten mit Defekten in späten Rekombinationsfunktionen gefunden wurden, versucht man, äquivalente Aktivitäten biochemisch nachzuweisen, um dann eine mögliche Rolle in der HR zu untersuchen.

Dazu nutzt man die angenommene Substratspezifität der gesuchten Faktoren, die sich vom RuvABC-Resolvasom ableiten lässt. Hier gibt es, wie beschrieben, zwei Faktoren, RuvA und RuvC, die strukturspezifisch Holliday-Strukturen erkennen. RuvA wirkt dabei strukturell auf das gebundene Substrat, während RuvC enzymatisch als X-Solvase wirkt. Diese Effekte lassen sich *in vitro* mit synthetischen, vierarmigen DNA-Substraten (X-DNA), die modellhaft für echte Holliday-Strukturen stehen, in Gel-Retentionsanalysen (*electromobility shift assay*, Abk. EMSA) und durch den Nachweis von DNA-Abbauprodukten auf Polyacrylamidgelen nachweisen (Parsons *et al.*, 1992; Bennett *et al.*, 1993; Benson & West, 1994). Der Nachweis der Dissoziation einer X-DNA in zwei DNA-Doppelstränge durch die RuvB-Funktion ist ebenfalls gelelektrophoretisch möglich, allerdings nur bei Anwesenheit von RuvA (Parsons *et al.*, 1992; Parsons & West, 1993). Diese Kopplung der RuvAB-Funktion muss bei der Suche nach neuen RuvB-Funktionen als zusätzliche Schwierigkeit berücksichtigt werden. Zur biochemischen Identifikation von RuvABC-ähnlichen Funktionen verfolgt man zwei Strategien:

(1) Man versucht, in Lysaten entsprechende Aktivitäten nachzuweisen und mittels Proteinreinigung zu isolieren. Bei Isolierung einer genügenden Menge an Protein kann dieses durch Proteinsequenzierung einem Gen zugeordnet werden. Alternativ kann das entsprechende Gen durch reverse Genetik identifiziert werden, wenn der Verlust der beobachteten Aktivität in einer Mutante nachgewiesen werden kann.

(2) Ausgehend von einem genetischen Befund oder einer bekannten Wechselwirkung, die ein Gen/Protein als wahrscheinlichen Kandidaten für eine RuvABC-Funktion erscheinen lässt, testet man gezielt die biochemischen Eigenschaften dieses speziellen Proteins.

Beide Strategien haben in der Vergangenheit zu Teilerfolgen geführt.

### 1.3.1. Die Suche nach *branch migration*- und X-Solvase-Funktionen

Durch biochemischen Nachweis der Aktivität und reverse Genetik konnte eine X-Solvase der Hefe *S. cerevisiae*, Cce1p identifiziert werden (Symington & Kolodner, 1985; Kleff *et al.*, 1992). Cce1p ist allerdings ein mitochondriales Enzym und gehört deshalb nicht zu den gesuchten nukleären Funktionen. Interessanterweise haben RuvC und Cce1p die gleiche evolutionäre Abstammung (Lilley & White, 2001).

Kürzlich wurde ein Kandidat, der als nukleäre X-Solvase der HR in Frage kommt, gefunden: Mus81p. Das Protein wurde untersucht, da bei *Schizosaccharomyces pombe* eine Interaktion mit Cds1p (Boddy *et al.*, 2000), dem Homolog zu Rad53p aus *S. cerevisiae*, und mit Rad54p bei *S. cerevisiae* nachgewiesen wurde (Interthal & Heyer, 2000). Es zeigte sich, dass das Mus81-Protein aus *S. pombe*, *S. cerevisiae* und aus menschlichen Zellen (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001) einige, aber nicht alle Voraussetzungen für eine *bona fide* X-Solvase erfüllt. Es ist zwar eine strukturabhängige Endonuklease, aber bevorzugt deutlich bestimmte andere verzweigte DNA-Strukturen der X-DNA. Weiterhin sind die Schnitte, welche sie in X-DNA einführt, nicht ohne weitere Prozessierung ligierbar. Dies ist untypisch für eine X-Solvase. Die *in vivo* Rolle von Mus81p wird zur Zeit genauer untersucht.

Ausgehend von Lysaten aus Hefe- und Säugerzellen wurden eukaryotische X-Solvase-Aktivitäten mehrfach nachgewiesen (Symington & Kolodner, 1985; Jensch *et al.*, 1989; West & Korner, 1985; Jeyaseelan & Shanmugam, 1988; Elborough & West, 1990; Hyde *et al.*, 1994; Constantinou *et al.*, 2001; Constantinou *et al.*, 2002). Außer im Falle von Cce1p (siehe oben), konnte keiner dieser Aktivitäten ein Protein zugeordnet werden. Die jüngsten Befunde von Constantinou *et al.* könnten allerdings richtungsweisend sein. Sie zeigen erstmals die Existenz einer gekoppelten, eukaryotischen *branch migration*/X-Solvase-Aktivität (Constantinou *et al.*, 2001).

Zusätzlich zeigen die Autoren, dass die X-Solvase (Resolvase A genannt) in dieser gekoppelten Aktivität nicht das kontrovers diskutierte Mus81 Protein ist (Constantinou *et al.*, 2002).

Damit wurde die Vermutung, dass die Prozessierung von Holliday-Strukturen in Pro- und Eukaryoten zumindest mechanistisch konserviert ist, bestätigt. Man kann also davon ausgehen, dass die in Hefe nachgewiesenen, über zwei Holliday-Strukturen verbundenen Rekombinationsintermediate (Collins & Newlon, 1994; Schwacha & Kleckner, 1994; Schwacha & Kleckner, 1995) zumindest teilweise entsprechend des RuvABC Paradigmas aufgelöst werden. Dies ist auch deshalb plausibel, da *in vivo* die natürliche Konfiguration von Holliday-Strukturen und die Packung der DNA in Nukleosomen den Prozess der *branch migration* behindern (Panyutin *et al.*, 1995; Grigoriev & Hsieh, 1997). Obwohl der Prozess an sich keine Energie verbraucht, da für jedes getrennte Basenpaar auf einer Seite des Kreuzungspunktes ein neues Basenpaar auf der anderen Seite entsteht, müssen diese strukturellen Hindernisse durch eine enzymatische Katalyse überwunden werden.

### 1.3.2. Die Suche nach X-DNA bindenden Proteinen

Angesichts der Schwierigkeiten die Urheberproteine der RuvB- und RuvC-ähnlichen Aktivitäten der Eukaryoten zu identifizieren, bietet sich die Suche nach RuvA-ähnlichen X-DNA bindenden Proteinen an. Die Erfolgchancen, ein solches X-DNA bindendes Protein ohne eigene katalytische Aktivität zu identifizieren, sind aufgrund der Erwartung einer stärkeren Expression im Vergleich zu X-Solvasen höher einzuschätzen. Bei *E. coli* z.B. liegt die Anzahl der RuvA-Moleküle pro Zelle mit ~700, die der RuvC-Moleküle bei ~100. Bei Induktion der SOS-Antwort erhöht sich die Zahl der RuvA-Moleküle auf ~5600, während sie bei RuvC konstant bleibt (West, 1997).

Die gezielte Suche nach Proteinen, die synthetische X-DNA Substrate binden, ohne selbst katalytisch auf diese zu wirken, geht auf Arbeiten aus den späten achtziger Jahren zurück, in denen eine Nachweismethode mittels EMSA entwickelt wurde (Bianchi, 1988; Elborough & West, 1988). Danach wurde die Verbindung aus EMSA-Nachweis von X-DNA-Bindung und Proteinreinigung mehrfach mit Erfolg angewendet (Bianchi *et al.*, 1989; Kotani *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1995; Dutta *et al.*, 1997; Todd *et al.*, 1998; Whitby & Dixon, 2001; diese Arbeit). Die gefundenen Proteine gehören zu

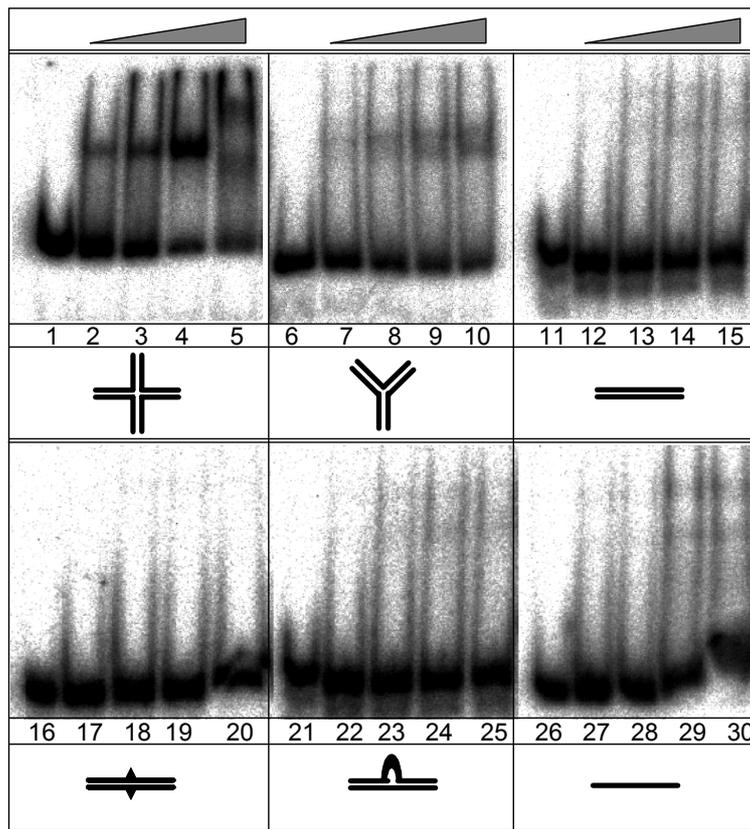
einer stetig wachsenden, heterogenen Gruppe, die mit unterschiedlich stark ausgeprägter Spezifität X-DNA bindet (siehe Anhang). Unter ihnen finden sich z.B. Mitglieder der HMG1 und HMG2 Proteinfamilie, deren Rolle in der Vermittlung komplexer DNA-Konfigurationen in diversen Vorgängen des DNA-Metabolismus gesehen wird (Thomas, 2001). Dabei zeichnet sich die Tendenz ab, dass DNA-Architektur vermittelnde Proteine auch eine Vorliebe für die Bindung strukturierter DNA zeigen (Zlatanova & Van Holde, 1998).

Daneben gehören Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie dieser Gruppe an. Sie sind an der Kontrolle von Replikationsvorgängen beteiligt, und binden *in vivo* die sog. cruziforme DNA, die beim Ausstülpfen palindromischer Sequenzen an Replikationsursprüngen entsteht (Zannis-Hadjopoulos *et al.*, 2002). Cruziforme DNA beinhaltet wie die Holliday-Struktur einen Knotenpunkt, an dem vier doppelsträngige DNA-Segmente zusammenlaufen. Außerdem gehören Proteine wie p53 (Lee *et al.*, 1997) oder das DNA-Reparaturprotein Msh2p (Alani *et al.*, 1997), die möglicherweise auch *in vivo* direkt mit Holliday-Strukturen reagieren, zu den X-DNA bindenden Proteinen.

Diese Beispiele zeigen, dass strukturspezifische X-DNA-Bindung nicht ausschließlich mit der Holliday-Struktur und damit der HR verbunden ist. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass eine *in vitro* nachgewiesene Bindung an X-DNA die Bindung von Proteinen an Holliday-Struktur-ähnliche DNA-Konfigurationen *in vivo* widerspiegelt. Daher muss jeder Einzelfall einer detaillierten Untersuchung unterzogen werden.

#### **1.4. Grundlagen und Ziel der vorliegenden Arbeit**

In unserer Arbeitsgruppe wurden in der Vergangenheit mehrfach mögliche Funktionen der späten HR in *S. cerevisiae*-Extrakten nachgewiesen. So wurde die X-Solvase Endo X3 entdeckt, angereinigt und charakterisiert (Jensch *et al.*, 1989). Das die Aktivität ausübende Protein konnte dabei jedoch nicht identifiziert werden (Jensch, 1989; Kupfer, 1999). Darüber hinaus wurde die bislang einzig zweifelsfreie X-Solvase der Hefe, Cce1p (siehe oben), identifiziert (Kleff *et al.*, 1992).

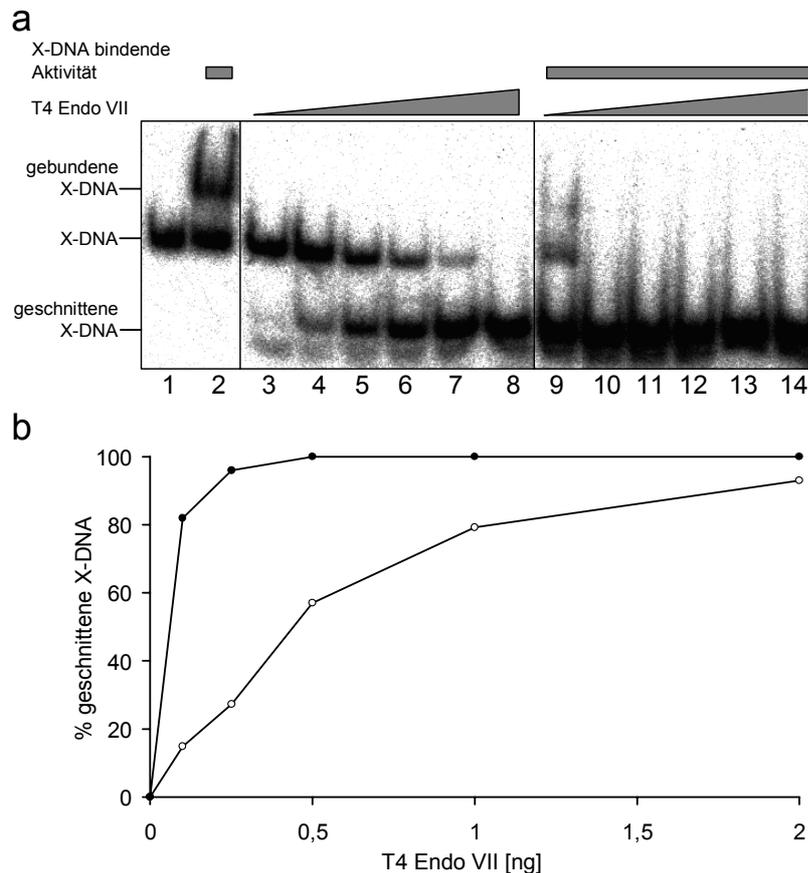


**Abbildung 3: Substratspezifität der untersuchten X-DNA bindenden Aktivität der Hefe *S. cerevisiae*.**

Gleiche Mengen verschiedener DNA-Substrate wurden mit ansteigenden Volumina von fraktioniertem Hefe-Extrakt inkubiert und einer EMSA-Analyse unterzogen. Für jedes DNA-Substrat (X-DNA, Y-DNA, doppelsträngige DNA, doppelsträngige DNA mit einer CC-Fehlpaarung, doppelsträngige DNA mit einem ungepaarten Bereich von 8 Nukleotiden und einzelsträngige DNA; je durch ein Symbol gekennzeichnet, vgl. Tabelle 8) sind 5 Spuren dargestellt. Die erste beinhaltet jeweils das unbehandelte Substrat, die nachfolgenden 1, 2, 4, und 5  $\mu\text{l}$  des fraktionierten Extraktes. Die im Extrakt vorhandene Aktivität bindet ausschließlich die verzweigten X- und Y-DNA-Substrate (Rass, 1999).

Neben der Arbeit an X-Solvasen wurde auch nach X-DNA bindenden Proteinen gesucht. Frank Thiemann setzte dazu, nach Vorarbeiten von Katrin Lukowsky (Lukowsky, 1991), ein X-DNA-Substrat ein, dessen Doppelstrangenden mit Einzelstrangschleifen „versiegelt“ waren, um exonukleolytischem Abbau vorzubeugen. Dies führte zur Isolierung der Lysyl-tRNA-Synthetase. Es stellte sich aber heraus, dass die Lysyl-tRNA-Synthetase kein „echtes“ X-DNA bindendes Protein ist, da die Substratbindung von den Einzelstrangbereichen abhängig war (Thiemann, 1995). In der gleichen Arbeit wurde in einer Testreihe mit einem X-DNA-Substrat ohne Einzelstrangbereiche eine X-DNA-bindende Aktivität nachgewiesen, aber nicht weiter untersucht.

Diese Arbeiten wurden in meiner Diplomarbeit wieder aufgegriffen (Rass, 1999). Darin wurde eine X-DNA bindende Aktivität in Hefe-Rohextrakten mittels EMSA nachgewiesen. Durch Proteinfractionierung und Messung der spezifischen Aktivität wurde ein Reinigungsprotokoll für die X-DNA bindende Aktivität ausgearbeitet.



**Abbildung 4: Die untersuchte X-DNA bindende Aktivität der Hefe *S. cerevisiae* stimuliert die X-Solvase-Aktivität von Endo VII.**

(a) EMSA-Analyse von unbehandeltem (Spur 1) bzw. von mit fraktioniertem Hefe-Extrakt vorinkubiertem (Spur 2) X-DNA Substrat nach einer Schnittreaktion mit T4 Endo VII (Spuren 3 bis 14). Spuren 3 bis 8 zeigen das unbehandelte und 9 bis 14 das vorinkubierte Substrat, welches jeweils mit 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 und 10 ng Endo VII geschnitten wurde. Die EMSA-Analyse zeigt, dass die Vorinkubation mit der X-DNA bindenden Aktivität zu einer erhöhten Abbaurrate führt. (b) Graphische Darstellung dieses Effektes nach Quantifizierung des Anteils an geschnittenem Substrat je Spur. Schwarze Punkte repräsentieren mit der X-DNA bindenden Aktivität vorinkubierte Proben, weiße Punkte Proben ohne X-DNA bindende Aktivität (Rass, 1999).

Eine Charakterisierung der Proteinfraction am Ende der Reinigung zeigte, dass die Präferenz der Aktivität für X-DNA spezifisch ist. Aus einer Reihe von angebotenen DNA-Substraten band die Aktivität nur das X-förmige Substrat und, weniger stark, ein dreifach verzweigtes Substrat (Y-DNA). Unverzweigte Substrate wurden auch dann nicht gebunden, wenn Störungen des Doppelstrangs in Form einer Basenfehlpaarung

oder eines ungepaarten Einzelstrangbereiches vorlagen (Abbildung 3). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die X-DNA bindende Aktivität die X-Solvase Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 (T4 Endo VII; Mizuuchi *et al.*, 1982) stimuliert (Abbildung 4). Dieser Befund legt nahe, dass die beobachtete Aktivität gleichzeitig mit anderen Proteinen an einer Holliday-Struktur wirken kann, und dass die Holliday-Struktur durch Bindung der Aktivität in eine Konfiguration gebracht wird, die leichter durch eine X-Solvase prozessiert werden kann. Somit könnte sie als Hilfsfaktor der HR dienen.

In einem ersten Versuch, das hinter der Aktivität stehende Protein zu identifizieren, wurden die am stärksten vertretenen Proteine der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität isoliert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Nach Heranziehen bekannter experimenteller Daten wurden die identifizierten Proteine bis auf eines als Urheber für die beobachtete Aktivität ausgeschlossen, da sich in keiner Weise ein Bezug zum DNA-Metabolismus herstellen ließ. Bei der Ausnahme handelte es sich um Zuotin, das bereits als strukturabhängig DNA-bindendes Protein beschrieben worden war (Zhang *et al.*, 1992). Eine nähere Untersuchung ergab jedoch, dass Zuotin kein spezifisch X-DNA bindendes Protein ist (Schmiemann, 2001). Die X-DNA bindende Aktivität gehörte also zu den unterrepräsentierten Proteinen in der untersuchten Proteinfraction und blieb weiter unentdeckt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Identifizierung des Proteins, welches die beobachtete X-DNA bindende Aktivität ausübte, voranzutreiben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Neben den im Folgenden aufgeführten Materialien, finden sich einzelne Angaben zu Material und Pufferlösungen in den Methodenbeschreibungen ab Seite 23.

#### 2.1.1. Chemikalien

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien, die im Folgenden nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, oder Sigma, Deisenhofen, mit der Qualität p.A. bezogen.

Acrylamid/Bis (2,6 %C)	Biorad, München
Acrylamid/Bis (5 %C)	Serva, Heidelberg
Agarose Seakam LE	Biorad, München
<i>Protein Assay</i> Lösung	Biorad, München
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
Didesoxy-Nukleotide	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL 1 und 2	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler-Lösung G135 A, B	Agfa Deutschland, Köln
Ethidiumbromid	Calbiochem, San Diego, USA
Fixierer-Lösung G354	Agfa Deutschland, Köln
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim
<i>complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail</i>	Roche, Mannheim
Triton X-100	Calbiochem, San Diego, USA
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Xylencyanol (XC)	Serva, Heidelberg

#### 2.1.2. Grundstoffe und Zusätze für Nährmedien

Alle in der Arbeit verwendeten Grundstoffe und Zusätze für Nährmedien, die im Folgenden nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma, Deisenhofen, oder Difco, Detroit, USA, bezogen.

Stickstoffbasis	Gibco BRL, Paisley, Schottland
X- $\alpha$ -Gal	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA

### 2.1.3. Radioisotope

Für die radioaktive 5'-Markierung von Oligonukleotiden (DNA) wurde  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (>185 TBq/mmol), für die radioaktive Markierung von Proteinen L- $^{35}\text{S}$ -Methionin (>1000 Ci/mmol bei 10 mCi/ml) der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, eingesetzt.

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8 100 mM NaCl 0,1% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 10% (v/v) Glyzerin 1 mM PMSF 1 Tablette <i>complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail</i> je 10 ml Puffer
Hefe-Lysepuffer	50 mM HEPES, pH 7,5 150 mM NaCl 1mM EDTA 0,5 mM PMSF 1 Tablette <i>complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail</i> je 10 ml Puffer
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
PBST	PBS + 0,05% (v/v) Tween 20
Puffer A (Zellaufschlusspuffer)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 10 mM $\text{MgCl}_2$ 10 % (v/v) Glyzerin 2 mM PMSF
Puffer B	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glyzerin
Puffer C	10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 1 mM EDTA 10 mM $\beta$ - Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glyzerin
Silber-Lösung I	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2mM EDTA 1% (w/v) SDS 1mM $\beta$ -Mercaptoethanol 0,025% (w/v) BPB 20% Glyzerin

Silber-Lösung II	30 % (v/v) Methanol 0,5 M Natriumacetat, pH 6,0 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd 0,2 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silber-Lösung III	0,1 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> 0,01 % (v/v) Formaldehyd
Silber-Lösung IV	2,5 % (w/v) NaCO <sub>3</sub> 0,01 % (v/v) Formaldehyd
TBE-Puffer	8,9 mM Tris 8,9 mM Borat 2 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA

## 2.1.5. Stämme

**Tabelle 1: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.**

Stamm	Nr.**	Genotyp	Abstammung	Referenz/Herkunft
RS190		<i>MATa; top1-8; ade2; ura3; his3; trp1; can'</i>	Ausgangsstamm	R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA)
$\Delta crp1$ (1)		<i>MATa; top1-8; ade2; ura3; his3; trp; can'; crp1::HIS3</i>	RS190	diese Arbeit
$\Delta crp1$ (2)		<i>MATa; top1-8; ade2; ura3; his3; trp; can'; crp1::HIS3</i>	RS190	diese Arbeit
BY4741*	Y00000	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Ausgangsstamm	EUROSCARF
BY4742*	Y10000	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Ausgangsstamm	EUROSCARF
BY4743*	Y20000	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0/MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>	Ausgangsstamm	EUROSCARF
URY4	Y07089	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YHR146w::kanMX4</i>	BY4741	EUROSCARF
URY5	Y17089	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YHR146w::kanMX4</i>	BY4742	EUROSCARF
URY7	Y37089	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0/LYS2; MET15/met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0; YHR146w::kanMX4/YHR146w::kanMX4</i>	BY4743	EUROSCARF
URY8	Y02039	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YNL173c::kanMX4</i>	BY4741	EUROSCARF
URY9	Y12039	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YNL173c::kanMX4</i>	BY4742	EUROSCARF
URY13		<i>mdg1crp1</i>	BY4741	diese Arbeit
URY24		<i>GFP-CRP1</i>	BY4741	diese Arbeit
URY34		<i>CRP1-13Myc</i>	BY4741	diese Arbeit
$\Delta rad6$	Y04425	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL058w::kanMX4</i>	BY4741	EUROSCARF
$\Delta rad51$	Y06401	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YER095w::kanMX4</i>	BY4741	EUROSCARF
W303-1A		<i>MATa; ura3-52; trp1<math>\Delta</math>2; leu2-3, 112; his3-11; ade2-1; can1-100</i>	Ausgangsstamm	Thomas & Rothstein, 1989

AH109		<i>MATa; trp1-901; leu2-3, 112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3; GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2; URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Ausgangsstamm	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
-------	--	---	---------------	---

\*BY-Serie (Brachmann *et al.*, 1998) von Wildtyp-Ausgangsstämmen, die im Rahmen des internationalen Programms zur systematischen Deletion der Gene von *S. cerevisiae* (Winzeler *et al.*, 1999) im europäischen Programmteil EUROFAN II benutzt werden. Die Serie ist isogenisch zu S288c, dem Hefestamm dessen Genom sequenziert wurde (Goffeau *et al.*, 1996). \*\*Referenznummer zur Bestellung der jeweiligen Stämme der BY-Serie bei EUROSCARF (*European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis*) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Institut für Mikrobiologie, Marie-Curie-Str. 9, 60439 Frankfurt (<http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>).

**Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme.**

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5α	<i>F-; deoR endA1gyrA(Nal<sup>r</sup>) hsdR17(rK- mK+) recA1 relA supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argFV169) ϕ-80ΔlacZΔM15</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B; <i>F-; dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal λ (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B; <i>F-; ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) dcm+ Tet<sup>r</sup> gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(Nal<sup>r</sup>) hsdR17(rK- mK+) recA1 relA1 supE44 thi-1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene, La Jolla, USA

## 2.1.6. Plasmide

**Tabelle 3: Expressionsplasmide zur Verwendung in *E. coli*.**

Basisplasmid	Name	codierende Fremd-DNA	für die Klonierung verwendete Primer	durch die Fremd-DNA codiertes Proteinfragment
pET11a-His-Tev	pUR101	<i>CRP1</i> Basen 1-1395	UR013; UR015	Crp1p: komplett
	pUR103	<i>CRP1</i> Basen 1-789	UR013; UR016	Crp1p: aa 1-263
	pUR112	<i>CRP1</i> Basen 1-1224	UR013; UR043	Crp1p: aa 1-408
	pUR113	<i>CRP1</i> Basen 1-1056	UR013; UR042	Crp1p: aa 1-352
	pUR115	<i>CRP1</i> Basen 1-360	UR013; UR014	Crp1p: aa 1-120
	pUR116	<i>CRP1</i> Basen 385-1395	UR044; UR015	Crp1p: aa 120-465
	pUR117	<i>CRP1</i> Basen 778-1395	UR045; UR015	Crp1p: aa 260-465
	pUR119	<i>CRP1</i> Basen 424-1395	UR059; UR015	Crp1p: aa 142-465
	pUR120	<i>CRP1</i> Basen 1-423	UR013; UR058	Crp1p: aa 1-141
	pUR125	<i>CRP1</i> Basen 358-480	UR044; UR063	Crp1p: aa 120-160
	pUR126	<i>CRP1</i> Basen 1-480	UR013; UR063	Crp1p: aa 1-160
	pUR128	<i>CRP1</i> Basen 1-600	UR013; UR061	Crp1p: aa 1-200
	pUR130	<i>CRP1</i> Basen 358-423	UR044; UR058	Crp1p: aa 120-141
	pUR131	<i>CRP1</i> Basen 424-480	UR059; UR063	Crp1p: aa 142-160
	pUR132	<i>CRP1</i> Basen 478-1395	UR065; UR015	Crp1p: aa 160-465
	pUR107	<i>MDG1</i> Basen 1-360	UR017; UR020	Mdg1p: aa 1-120
	pUR108	<i>MDG1</i> Basen 1-789	UR017; UR019	Mdg1p: aa 1-263
pUR109	<i>MDG1</i> Basen 1-1098	UR017; UR018	Mdg1p: komplett	
pET11a-Thrombin-His	pUR111	<i>CRP1</i> Basen 1-1395	UR014; UR039. UR064; UR050	Crp1p: komplett

**Tabelle 4: Expressionsplasmide zur Verwendung in *S. cerevisiae***

Plasmidname	codierende Fremd-DNA	für die Klonierung verwendete Primer	durch die Fremd-DNA codiertes Proteinfragment
pJD-CEX1-LEU	Basisvektor	-	-
pJD-CEX1-LEU-Egt2p	<i>EGT2</i> , Basen 1-3123	UR082; UR084	Egt2p: komplett
pJD-CEX1-LEU-Egt2p <sup>aa1-1001</sup>	<i>EGT2</i> , Basen 1-3003	UR119; UR082	Egt2p: aa 1-1001
pJD-CEX1-LEU-Egt2p <sup>aa14-285</sup>	<i>EGT2</i> , Basen 40-855	UR120; UR121	Egt2p: aa 14-285
pJD-CEX1-LEU-Drs1p <sup>aa538-752</sup>	<i>DRS1</i> , Basen 1612-2256	UR117; UR116	Drs1p: aa 538-752
pJD-CEX1-LEU-Gno1p	<i>GNO1</i> , Basen 1-813	UR085; UR086	Gno1p: komplett
pJD-CEX1-TRP	Basisvektor	-	-
pJD-CEX1-TRP-Crp1p <sup>aa1-160</sup>	<i>CRP1</i> Basen 1-480	UR089; UR090	Crp1p: aa 1-160
pGBKT7	Basisvektor	-	-
pGBKT7-p53	murines p53	-	p53: komplett
pGBKT7-T	großes T-Antigen von SV40	-	T-Antigen: komplett
pGBKT7-Crp1p	<i>CRP1</i> Basen 1-480	UR067; UR070	Crp1p: aa 1-160
pGBKT7-Crp1p <sup>aa1-160</sup>	<i>CRP1</i> Basen 478-1395	UR068; UR069	Crp1p: aa 160-465
pGBKT7-Crp1p <sup>aa160-465</sup>	<i>CRP1</i> Basen 1-1195	UR067; UR069	Crp1p: komplett

### 2.1.7. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Amersham Biosciences, Freiburg, und Thermo Life Sciences, Ulm, bezogen. Sie wurden als Lyophilisat geliefert und auf eine Endkonzentration von 100 pM/µl in TE-Puffer resuspendiert.

**Tabelle 5: Verwendete Primer zur Konstruktion von Expressionsplasmiden bzw. von Matrizen für die *in vitro* Expression von Proteinen.**

UR013	5'-TCCTCCCCGCGGATGAGTAGTGAACCTCATGTTCAAC
UR014	5'-TCCTCCTCCCATATGAGTAGTGAACCTCATGTTCAAC
UR015	5'-TCCTCCGGTACCTCACTTAAATAGCTTCTTCAATTTGC
UR016	5'-TCCTCCGGTACCTCAAACAATAGGGCCAGCAACGGG
UR017	5'-TCCTCCCCGCGGATGCAATCGAGCTTACCTCAATTTAC
UR018	5'-AAGAAGGGATCCTCACTTCAAAGCTGGGCCAACTT
UR019	5'-AAGAAGGGATCCTCATGAAGCTTCAGCGTCTGCACTTGT
UR020	5'-AAGAAGGGATCCTCATGGTTTCGATAAGAGGGGCATTCTTT
UR039	5'-TCCTCCGGTACCTCATCAGTGATGGTGATGGTGATGAGCTCGCGGAACCA GCTTAAATAGCTTCTTCAATTTGCCG
UR042	5'-TCCTCCGGTACCTCATTTGGAACCGTCTAATACACCTTCA
UR043	5'-TCCTCCGGTACCTCATTTAGAGCCTTTTCTTGCTTCTTT
UR044	5'-TCCTCCCCGCGGGCAGGTCCTCCTTCTACAAGTAATAG
UR045	5'-TCCTCCCCGCGGGCCCTATTGTTGAATCATCAGTTAC
UR050	5'-TTCTTCGAGCTCGCGGACCCAGCTTAAATAGCTTCTTCAATTTGCCGAAG
UR058	5'-TCCTCCGGTACCTCATTTAGATCTTCTTTCTTATTGTTACGC
UR059	5'-TCCTCCCCGCGGTTGAAGAAAAAGAGTACTAAGAACAAC
UR061	5'-TTCTTCGGTACCTCAAATATGGAAATTGCCCGGAGCTTC
UR063	5'-TTCTTCGGTACCTCAATTATCGTCTAAACTTTTCATTTGACTTC
UR064	5'-GGAAATTTTCGAAATTACTATGCCCGTGAAACTAGCCAAC
UR065	5'-TTCTTCCC GCGGAATGAAGAAGAAGACGGGGTGACTG
UR067	5'-GCCGAATTCATGAGTAGTGAACCTCATGTCCACC
UR068	5'-GCCGAATTC AATGAAGAAGAAGACGGGGTGACTG
UR069	5'-GCCGTCGACTCACTTAAATAGCTTCTTCAATTTGC
UR070	5'-GCCGTCGACTCAATTATCGTCTAAACTTTTCATTTGACTTC
UR071	5'-GCAGGTCCTCCTTCTACAAGTAATAGAGCGGCAAACAAGCGTAACAAT AAGAAAAG

UR072	5'-CTTTTCTTATTGTTACGCTTGTTGCCGCTCTATTACTTGTAGAAGGAGG ACCTGC
UR073	5'-GCAGGTCCTCCTTCTACAAGTAATAGAAAGAAAAACGCGGCTAACAAAT AAGAAAAGAAG
UR074	5'-CTTCTTTTCTTATTGTTAGCCGCGTTTTTCTTCTATTACTTGTAGAAGGAG GACCTGC
UR075	5'-CCTTCTACAAGTAATAGAAAGAAAAACAAGCGTAACAATAAGGCAGCA AGATCTAAATTGAAGAAAAAGAG
UR076	5'-CTCTTTTTCTTCAATTTAGATCTTGCTGCCTTATTGTTACGCTTGTTTTTCT TTCTATTACTTGTAGAAGG
UR077	5'-TCCTCCCCGCGGGAGATCTGGAATTCGGATCCTCG
UR078	5'-TCCTCCGGTACCGGGGTTTTTTCAGTATCTACGATTC
UR079	5'-AAAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCCGCCACCATGTACCC ATACGACGTTCCAGATTACGCTGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGGC
UR082	5'-TCCTCCTCTAGACCGCGGATGAATAAACTATTGTTA
UR084	5'-TCCTCCCCGGGTTAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGTTACTGCAGGA GAAATGAGATTAACCCTAG
UR085	5'-TCCTCCCCGCGGATGGGTTTTGGCAGCTACAAGAAC
UR086	5'-TCCTCCCTGCAGGTCGTTTTGTTATCATAAAGATCTCAT
UR089	5'-TCCTCCTCTAGAATGGAGGAGCAGAAGCTGATCT
UR090	5'-TCCTCCGGGCCCTCACTGCAGGTCGACTCAATTATCG
UR116	5'-TCCTCCGCACTGCAGCCTACGGCTTTTGAAGCCCTTC
UR117	5'-TCCTCCTCCTCTAGACCGCGGATGTTGGCCTCCAGAGGTCTTGATA
UR119	5'-TCCTCCTCCCTGCAGTATTGTAGATAGAGATGTGCTGG
UR120	5'-TCCTCCTCTAGACCGCGGATGATACTCGGCCTAGCAAACGCTC
UR121	5'-TCCTCCTCCCTGCAGTGTACCTTCATCGGGATATGTTAA

**Tabelle 6: Oligonukleotide für DNA-Substrate**

1	5'-TCAAAGAATTCCGGGTTAGAGATCTCC
2	5'-AGGAGATCTCTAATCTCCGATCGATGTAG
3	5'-GCTACATCGATCGGAGAGGCTAGGCCTA
4	5'-CTAGGCCTAGCCCCCGGAATTCTTTG
5	5'-TCAAAGAATTCCGGGTCTCCGATCGATGTAG
6	5'-GCTACATCGATCGGAGACCCGGAATTCTTTG
7	5'-AGGAGATCTCTAAGGCTAGGCCTA
8	5'-CTAGGCCTAGCCTTAGAGATCTCC
9	5'-GCTACATCGATCGGACACCCGGAATCTTTG
10	5'-GCTACATCCCATCCAGGATCGGAGACCCGGAATTCTTTG

**Tabelle 7: Primer für Deletionen und Modifikationen von Hefegenen.**

UR021-F1	5'-ATAAAAGATACAAAAATCACTAAGAAAATAATCTA TCAATAAAACGGATCCCCGGGTTAATTAA
UR022-F2	5'-AAGAAGAAAACCTGGTTTCTTCGGCAAATTGAAGAAG CTATTTAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA
UR023-R1	5'-TTATATTTCTATGATTCGGCAACATGAGACCAATCCTT AGATAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
UR024-R5	5'-AGCAGGCCAGCTAAAAGTATAGTTGAACATGAGTTC ACTACTCATTGTTATAGTTCATCCATGC
UR025-F4	5'-GATTTGAACAAGGTTTTATCATTTTCTGATACGTTT TTTGTACTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
UR-II	5'-CCCATAGCCTGCTTGAATGC
UR-O1	5'-GAACAAGGTTTTATCATTTTCTGA
UR-O3	5'-CGGCAACATGAGACCAATCCTTAG

### 2.1.8. DNA-Substrate

Das in dieser Arbeit verwendete X-DNA-Substrat besteht aus 110 Nukleotiden und wird durch die Hybridisierung von vier Oligonukleotiden (1 bis 4) hergestellt. Die Sequenz des Substrates stimmt mit dem von Frank Thiemann (Thiemann, 1995) verwendeten X-DNA-Substrat überein und wird nach seiner Nomenklatur CF110 genannt (vgl. Abbildung 7). Die einzelnen Arme besitzen keine Sequenzhomologien, so dass der Kreuzungspunkt fixiert ist und keine *branch migration* stattfinden kann. Jeder Arm der X-DNA besitzt eine nur hier vorkommende Restriktionsschnittstelle, die verwendet werden kann, um die vollständige Hybridisierung durch Spaltung des jeweiligen Armes zu kontrollieren. Die X-förmige Struktur kann mit Hilfe der X-Solvase Endo VII geprüft werden. Eine solche Charakterisierung von CF110 kann in meiner Diplomarbeit eingesehen werden (Rass, 1999, darin Abbildung 6). Die Sequenzen der übrigen Substrate wurden von CF110 abgeleitet. Die beiden Doppelstrang-Substrate, die aus Oligonukleotiden 5 und 6 bzw. 7 und 8 bestehen, decken gemeinsam die gesamte Sequenz des X-DNA-Substrates ab.

**Tabelle 8: Verwendete DNA-Substrate**

Substrate	Oligonukleotid-Zusammensetzung	DNA-Struktur
X-DNA	*1+2+3+4	
Y-DNA	3+4+*5	
Doppelstrang	*5+6	
Doppelstrang	*7+8	
Doppelstrang mit CC-Fehlpaarung	*5+9	
Einzelstrang	*5	
Doppelstrang mit ungepaartem Bereich	*5+10	

Das mit einem Stern gekennzeichnete Oligonukleotid ist jeweils am 5'-Ende mit P<sup>32</sup> radioaktiv markiert.

### 2.1.9. Geräte und Apparaturen

Agarosegelelektrophoresekammer	Anfertigung der Institutswerkstatt
Brutschrank T 6030	Heraeus, Glashütten
Dialyseschläuche ZelluTrans	Roth, Karlsruhe
Dialysemembranen	BRL, Neu-Isenburg
Disintegrator S	BIOMatik GmbH, Rodgau
Durchflussdialysekammer MD	BRL, Neu-Isenburg
½ Mikroküvetten	Ratiolab, Dreieich
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa Deutschland, Köln
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 5000 TD	Beckman, München
FPLC-Anlage (computergesteuert)	Amersham Biosciences, Freiburg
FPLC-Kühlschrank Unichromat 1400	UniEquip, Martinsried
FPLC-Steereinheit LCC 500-Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
PAA-Gelelektrophoresekammern	Anfertigung der Institutswerkstatt
Gelelektrophoresesystem Mini Protean II	Biorad, München
Gasperlen (Ø 5 mm)	BIOMatik GmbH, Rodgau
Heizgerät Thermostat 5320	Eppendorf, Engelsdorf
NAP-5 Säulen	Amersham Biosciences, Freiburg
PCR-Maschine	MJ Research, Waltham, USA
Phosphoimager Fuji X BAS 1000	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
Photometer Ultrospec III	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Meter $\Phi$ 220	Beckman, München
PVDF-Membran Westran	Millipore, Eschborn
Quarzküvetten Suprasil	Hellma, Müllheim
Röntgenfilme X Omat AR	Kodak, Stuttgart
Schlauchpumpe	Millipore, Eschborn
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Sterilfilter Millex GV (0,22 $\mu$ m)	Millipore, Eschborn
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf, Engelsdorf
Ultrazentrifuge L8 70M	Beckman, München
UV-Transilluminator 2020	Herolab, Wiesloch
Vakuumkonzentrator Univapo 150 H	UniEquip, Martinsried
Vortex Mischer Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Wasserkühlsystem RC 6	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Glashütten
Zentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Mikroorganismen *S. cerevisiae* und *E. coli* kultiviert. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter aeroben Bedingungen mit komplexen Medien oder synthetischen Minimalmedien in Form von Nährlösungen bzw. Nährböden. Die Nährböden setzten sich wie Nährlösungen zusammen, enthielten 2% (w/v) Agar und wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 8,5 cm angesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C bei *E. coli* und –falls nicht anders angegeben – 30°C bei *S. cerevisiae*. Als Gefäße für Flüssigkulturen dienten Erlenmeyerkolben und Reagenzgläser verschiedener Größe, die in einem Schüttelinkubator bei 220 U/min (*E. coli*) bzw. 180 U/min (*S. cerevisiae*) inkubiert wurden. Die Bestimmung der Zellzahl in einer Flüssigkultur erfolgte als Abschätzung anhand der sich proportional verhaltenden optischen Dichte, die photometrisch als Absorption bei 600 nm gemessen wurde. Lebendzellzahl-Bestimmungen als Richtwerte für eine optisch bestimmte Zellzahl sowie zur Erstellung von Überlebenskurven von *S. cerevisiae* wurden durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen und Auszählen der entstehenden Kolonien durchgeführt.

Die Anzucht des *S. cerevisiae* Stammes RS190 wurde von der Gesellschaft für biotechnologische Forschung in Braunschweig mit Hilfe eines 200 l Fermenters durchgeführt. Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet und bei -80°C gelagert (Thiemann, 1995).

Alle Nährmedien wurden in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gelöst und autoklaviert. Glukose und Galaktose (in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gelöst und sterilfiltriert), einzeln zuzugebende Aminosäuren und Nukleinsäurebasen (Vorratslösungen nach Burke *et al.*, 2000), X-α-Gal (gelöst in Dimethylformamid, Endkonzentration 20 µg/ml), Methylmethansulfonat (MMS) und die Antibiotika Ampicillin (gelöst in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup>, Endkonzentration 100 µg/ml), Chloramphenicol (gelöst in Ethanol, Endkonzentration 83 µg/ml) und Kanamycin (gelöst in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup>, Endkonzentration 50 µg/ml) wurden den entsprechenden Medien bei ca. 50°C nach dem Autoklavieren zugesetzt.

*S. cerevisiae* wurde in YPDA-Vollmedium (1% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glukose 0,004 % (w/v) Adeninsulfat) kultiviert. Die Selektion von plasmidcodierten Auxotrophiemarkern erfolgte mit Hilfe synthetischer Minimalmedien (0,67% (w/v) Stickstoffbasis, 2% (w/v) Glukose, 0,04% (w/v) Uracil, 0,02% (w/v) Adenin, mit verschiedenen Aminosäuren: 0,02% (w/v) Arginin, 0,01% (w/v) Histidin, 0,01% (w/v) Methionin, 0,04% (w/v) Lysin, 0,04% (w/v) Tryptophan, 0,05% (w/v) Threonin, 0,06% (w/v) Isoleucin, 0,06% (w/v) Phenylalanin) je in Abwesenheit der zur Selektion verwendeten Aminosäuren (Selektionsmedium oder *synthetic drop out medium*, Abk.; SD). Zur Induktion P<sub>GAL</sub>-kontrollierter Proteinexpression wurde in YP-Medium (1% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Pepton) mit 2% (w/v) Galaktose kultiviert. Zur Induktion der Sporenbildung wurden GNA-Präsporulationsnährböden (1% (w/v) Hefe-Extrakt, 3% (w/v) Nährbullion, 5% (w/v) Glukose) und flüssiges Sporulationsmedium (1% (w/v) Kaliumacetat, 0,005% (w/v) Zinkacetat, 0,04% (w/v) Uracil, 0,01% (w/v) Histidin, 0,01% (w/v) Leucin) verwendet. Nährböden mit einem MMS-Gradienten von 0 bis 0,2% (w/v) wurden hergestellt, indem zunächst ein YPDA-Nährboden mit 0,2% (w/v) MMS in eine schräg stehende Petrischale (einseitig auf einer 0,3 mm hohen Unterlage aufsitzend) gegossen wurde. Nach Erhärtung wurde die Schale eben aufgestellt und mit regulärem YPDA-Nährboden ausgegossen, so dass die schräge MMS-enthaltende Schicht am höchsten Punkt gerade die Oberfläche des Nährbodens erreichte. Zur blau-weiß Selektion von X- $\alpha$ -Galaktosidase exprimierenden *S. cerevisiae*- oder *E. coli*- Zellen wurden X- $\alpha$ -Gal-Indikatorplatten verwendet.

*E. coli* wurde in Luria-Bertani- (LB) Medium (0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl) kultiviert. Die Selektion von plasmidvermittelten Antibiotika-Resistenzen erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika in das jeweilige Kulturmedium.

### 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

Methoden des standardmäßigen Umgangs mit DNA (z.B. Lagerung, Fällung) und allgemeine Techniken der Molekularbiologie wurden gemäß der Protokollsammlung von Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) bzw. Sambroock (Sambrook *et al.*, 1989) angewandt. In einigen Fällen wurde hier auf eine nähere Beschreibung verzichtet.

### 2.2.2.1. Methoden zur Herstellung rekombinanter DNA und zur Analyse von DNA

#### ***In-vitro* Amplifikation von DNA**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, Abk.: PCR) erlaubt die *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Dabei werden Primer, die den zu amplifizierenden Bereich flankieren und die sich nach der Hitzedenaturierung der Matrize an die ihnen komplementären Bereiche anlagern, an den in Richtung des zu amplifizierenden Bereiches orientierten 3'-OH-Enden verlängert. Es erfolgt eine weitere Runde der Hitzedenaturierung, Hybridisierung der Primer (jetzt auch an die in der vorherigen Runde erzeugte DNA) und Synthese. Nach ca. 30 Zyklen ist das spezifische DNA-Fragment millionenfach angereichert. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden sowohl für molekulares Klonieren und die Integration ins Hefegenom als auch für analytische Zwecke zur Charakterisierung von modifizierten Loci im Hefegenom genutzt (diagnostische PCR). Ferner wurde eine methodische Variante mit nur einem Primer verwendet, um Einzelstrang-DNA für die Sequenzanalyse zu erzeugen (vgl. DNA-Sequenzierung, Seite 27). Zur Generierung von doppelsträngigen PCR-Produkten wurde entweder die *Pwo*-Polymerase von *Pyrococcus woesei* (mit eigener 3'-5' Korrekturlesefähigkeit) oder das *Expand High Fidelity PCR System*, eine Mischung aus *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* und einer korrekturlesenden Polymerase (Barnes, 1994) der Firma Roche, Mannheim, benutzt. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben zusammengesetzt und enthielten bei Verwendung der *Pwo*-Polymerase 2 mM MgSO<sub>4</sub> und bei Verwendung des *Expand High Fidelity PCR System* 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Der Einsatz des *Expand High Fidelity PCR System* erlaubte die Verwendung von PCR-Primern mit 5'-Überhängen von mehr als 50 Nukleotiden. Diese Art von Primer konnte von der *Taq*-Polymerase nicht verlängert werden. Als Matrizen wurden je nach Bedarf DNA-Plasmide, genomische Hefe-DNA oder PCR-Fragmente benutzt. Das jeweilige PCR-Programm richtete sich nach den im Begleitmaterial der Polymerasen zu findenden Richtlinien.

#### **Reinigung von doppelsträngiger DNA (100 bp bis 10 kb)**

Um doppelsträngige DNA zu reinigen, wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben verwendet. Diese Form der Reinigung diente der Abtrennung von Proteinen, Primern und Verunreinigungen zur

Vorbereitung einer Restriktion oder Ligation sowie der Abtrennung kurzer DNA-Fragmente, die als Produkt einer Restriktion von Plasmid-DNA getrennt werden sollten.

### **Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Um spezifische DNA-Fragmente (bis ca. 25 µg) aus einer Mischung von DNA-Fragmenten (speziell nach einer Restriktion) zu isolieren, wurde das Gemisch elektrophoretisch in einem Agarosegel getrennt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels *High Pure PCR Product Purification kit* der Firma Roche, Mannheim, nach Herstellerangaben gereinigt. Alternativ wurde ein DEAE-Membranstück, das vorher 10 min in 0,5 M Natronlauge gebadet und dann mit H<sub>2</sub>O<sup>mpp</sup> gespült wurde, unterhalb der gewünschten DNA-Bande in das Gel eingesetzt, und die Elektrophorese fortgesetzt. Die Bindung der DNA an die Membran wurde unter UV-Licht kontrolliert. Die Membran wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Niedrigsalz-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) überschichtet. Nach 2 min wurde der Puffer gegen 400 µl eines Hochsalz-Puffers (20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA) ausgetauscht. Nach 10-minütiger Inkubation bei 65°C wurde die Membran verworfen und die in wässriger Lösung befindliche DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt. Dazu wurden 400 µl eines Phenol-Chloroform-Gemisches mit gleichen Volumenanteilen zugesetzt und der Ansatz geschüttelt und zentrifugiert (14.000 g, 5 min). Die Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (Volumenanteile 24:1) versetzt. Der Ansatz wurde erneut geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 µl H<sub>2</sub>O<sup>mpp</sup> mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) resuspendiert.

### **Restriktion und Ligation von DNA**

Restriktionsendonukleasen und T4-DNA-Ligase wurden von der Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main, bezogen und gemäß der Herstellerangaben verwendet. Analytische Restriktion erfolgte im allgemeinen bei 1-stündiger Inkubation, präparative Restriktion bei Inkubation über Nacht. Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10 µl, bei 1-stündiger Inkubation bei RT oder bei Inkubation ün

bei 4°C. Je Ligation wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA und ein vierfacher molarer Überschuss an zu ligierendem Fragment eingesetzt.

### **DNA-Sequenzierung**

Die Analyse von DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe einer auf der Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) beruhenden Fluoreszenz-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurde das *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA, verwendet. Dieses beinhaltet Desoxynukleosidtriphosphate, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate als Terminatoren, eine spezielle Taq-Polymerase (*AmpliTaq*) sowie einen geeigneten Reaktionspuffer und MgCl<sub>2</sub>. Das *Kit* wurde mit der zu analysierenden DNA in einer PCR-Reaktion nach Herstellerangaben eingesetzt (PCR-Programm: 25 Zyklen mit je 30 s Hitzedenaturierung bei 96°C, 15 s Hybridisierung bei 50°C und 4 min Synthese bei 60°C). Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgte durch eine Serviceabteilung der Universität zu Köln mit Hilfe eines ABI PRISM 377- oder ABI PRISM 3100 Sequenziergerätes der Firma Applied Biosystems.

#### **2.2.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien- und Hefezellen**

Um Fremd-DNA in eine Bakterien- oder Hefezelle einbringen zu können, müssen die Empfängerzellen in einen für die Transformation kompetenten Zustand gebracht werden, das heißt einen Zustand, der es den Zellen erlaubt, freie DNA aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen.

#### **Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen**

*E. coli* Zellen wurden aus einer üN-Kultur in 1 l LB-Medium überimpft (bei Plasmid-tragenden Zellen in Anwesenheit des zur Selektion notwendigen Antibiotikums), so dass eine optische Dichte von 0,02 (gemessen bei 600 nm) erreicht wurde. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,6 inkubiert, dann 30 min auf Eis gekühlt und bei 4°C zentrifugiert (650 g, 20 min). Das Zellpellet wurde zwei mal mit dem ursprünglichen Kulturvolumen an eisgekühltem H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> (Zentrifugation wie oben) und ein mal mit 1/25 des ursprünglichen Kulturvolumens an eisgekühltem 10% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gewaschen (Zentrifugation bei 1500 g, 20 min) und schließlich in 1/500 des ursprünglichen Kulturvolumens an eisgekühltem 10% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C in Aliquots von 60 µl.

### **Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen**

*E. coli* Zellen wurden aus einer  $\bar{u}N$ -Kultur in 1 l LB-Medium überimpft (bei Plasmid-tragenden Zellen in Anwesenheit des zur Selektion notwendigen Antibiotikums), so dass eine optische Dichte von 0,1 (gemessen bei 600 nm) erreicht wurde. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,7 inkubiert, dann 30 min auf Eis gekühlt und bei 4°C zentrifugiert (650 g, 20 min). Das Zellpellet wurde ein mal in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens an eisgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gewaschen, wie oben gekühlt und zentrifugiert. Anschließend wurde es in 1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens an eisgekühltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 15% (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C in Aliquots von 60  $\mu$ l.

### **Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae* Zellen**

*S. cerevisiae* Zellen wurden aus einer  $\bar{u}N$ -Kultur in 50 ml YPDA-Medium (bei Plasmid-tragenden Zellen Minimalmedium ohne die zur Selektion des plasmidcodierten Auxotrophiemarkers notwendige Aminosäure) überimpft, so dass eine optische Dichte von 0,25 (gemessen bei 600 nm) erreicht wurde. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von ca. 1 inkubiert, zentrifugiert (3000 g, 5 min), das Zellpellet mit 25 ml H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1/50 des ursprünglichen Kulturvolumens an Lithiumacetat-Lösung (100 mM Lithiumacetat, 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert, bei 4°C gelagert und nicht länger als eine Woche verwendet.

## **2.2.2.3. Transformation von Bakterien- und Hefezellen mit DNA**

### **Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen**

Die Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurde durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988), bei der eine kurzzeitig angelegte Hochspannung den Durchtritt von DNA-Molekülen durch die Zellmembran erlaubt, vorgenommen. Dazu wurden 50  $\mu$ l Zellsuspension elektrokompetenter Zellen in einer Elektroporationsküvette (*Gene Pulser cuvette*, Biorad, München), mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm, mit 6  $\mu$ l aus Hefe präparierter Plasmid-DNA-Lösung (vgl. Seite 31) auf Eis versetzt. Das Volumen der aus Hefe präparierter DNA-Lösungen, das für diese Methode geeignet war, wurde in einer Testreihe ermittelt. Dabei waren zwei Dinge ausschlaggebend: Einerseits musste genug DNA für eine effiziente

Transformation eingesetzt werden (10-200 Kolonien bildende Transformanden pro Ansatz), andererseits musste das Volumen gering gehalten werden, um einen Stromfluss durch die mit dem Volumen ansteigende Ionenkonzentration in der Mischung zu verhindern. Die Hochspannung von 1,8 kV wurde unter Verwendung eines *Gene Pulser II* der Firma Biorad, München, (bei einer vorgewählten Kapazität von 25  $\mu\text{F}$  und einem Widerstand von 200  $\Omega$ ) für durchschnittlich 4 s nach Herstellerangaben angelegt. Danach wurde der Küvetteninhalt in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml vorgewärmten LB-Medium überführt und 1 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 6000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf LB-Platten, die das zur Selektion des plasmidcodierten Markers notwendige Antibiotikum enthielten, ausplattiert.

### **Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen**

Der Hitzeschock wurde angewandt, um Zellen zu transformieren, die vorher chemisch kompetent gemacht wurden. Die anwesenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen umgeben die zugegebene, negativ geladene Fremd-DNA, was die Anlagerung an die negativ geladenen Zellmembran erlaubt. Danach wird die Membran durch Hitze temporär geöffnet, wobei die DNA in die Zellen eindringen kann. Bei dieser Methode wurden 10  $\mu\text{l}$ -Ligationsansätze oder 10 bis 100 ng gereinigte Plasmid-DNA verwendet. Dazu wurde die DNA mit 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension kompetenter Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gemischt und 5 bis 15 min inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock bei 44°C für 40 bis 45 s. Nach weiteren 5 min bei RT wurde das Gemisch mit 50  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und auf LB-Platten, die das zur Selektion des plasmidcodierten Markers notwendige Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Die Zahl der Transformanden wurde, wenn nötig, dadurch erhöht, dass die Zellen vor dem Ausplattieren 1 h bei 37°C in LB-Medium regeneriert wurden.

### **Transformation von *S. cerevisiae* Zellen**

Die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen mit linearer doppelsträngiger DNA für die Integration in das Genom erfolgte nach der Methode von Gietz zum Erreichen einer hohen Transformationseffizienz (Gietz *et al.*, 1995). Diese Methode verwendet Lithiumacetat, um die Zellwand der Hefe für den Durchtritt von DNA vorzubereiten und beinhaltet einen 15-minütigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C.

Transformanden werden auf Minimalmedium plattiert, dem die zur Selektion des durch die integrierte DNA codierten Auxotrophiemarkers notwendige Aminosäure fehlt.

Das Protokoll zur Transformation einer DNA-Bank wurde mehrfach modifiziert, um möglichst hohe Transformationseffizienzen zu erreichen. Das optimierte Protokoll sah folgende Schritte vor: 25-50 µg Gesamt-DNA der Bank wurden mit 2 mg hitzedenaturierter Fischspermien-DNA (*molecular biology grade*, der Firma Roche, Mannheim) versetzt und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 1 ml Zellsuspension kompetenter Zellen kräftig gemischt (*vortex*). Nach Zugabe von 6 ml einer Lithiumacetat-Lösung (100 mM LiAc, 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 40% (v/v) Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht > 3000 g/mol) wurde der Ansatz 30 s kräftig gemischt (*vortex*) und 1 h bei 30°C im Schüttelinkubator bei 175 U/min inkubiert. Dann wurden 700 µl DMSO zugegeben, der Ansatz gemischt und im Wasserbad einem 25-minütigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Alle 5 Minuten wurde der Ansatz gemischt, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gesetzt und dann bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4,2 ml YPDA resuspendiert. Damit waren die Transformanden zur Plattierung vorbereitet (vgl. Hefe-2-Hybrid Methode, Seite 40). Für die Transformation mit einzelnen, zu testenden Plasmiden wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA mit 60 µg hitzedenaturierter Fischspermien-DNA versetzt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 20 µl Zellsuspension kompetenter Zellen kräftig gemischt. Dann wurde dem oben angegebenen Protokoll unter Anpassung an den kleineren Maßstab gefolgt.

#### **2.2.2.4. Isolierung von DNA**

##### **Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNA (ca. 10 µg) zu analytischen Zwecken wurden 1,5 ml einer üN-Kultur als Ausgangsmaterial verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (6000 g, 1 min). Der Überstand wurde so abgenommen, dass etwa 100 µl Flüssigkeit über dem Zellpellet verblieben. In diesen 100 µl wurden die Zellen resuspendiert und für die alkalische Lyse mit 300 µl TENS-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% (w/v) SDS) versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig durch mehrmaliges Kippen des Reaktionsgefäßes gemischt und 5 min bei RT inkubiert.

Nach Zugabe von 190  $\mu\text{l}$  3M Kaliumacetat (pH 5,5) wurde der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (14.000 g, 5 min), um ausgefallene genomische DNA und Proteine zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene Plasmid-DNA mit vorgekühltem Ethanol (-20°C) gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}^{\text{mp}}$  mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) resuspendiert.

Um hochreine Plasmid-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren, wurden Materialien der Firma Qiagen, Hilden, gemäß der Herstellerangaben verwendet (*Qiagen Plasmid Purification Kits*). Die Isolierung folgt dem gleichen Prinzip, allerdings erlaubt die zwischenzeitliche Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscher-Medium die effiziente Abtrennung von Verunreinigungen. Bei Verwendung des *Qiagen Plasmid Midi Kit* bzw. *QIASpin Minprep Kit* wurden 50 ml bzw. 10 ml einer *E. coli* üN-Kultur als Ausgangsmaterial verwendet. Die jeweilige Methode lieferte durchschnittlich 125  $\mu\text{g}$  bzw. 25  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA.

### **Isolierung von genomischer- und Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Ward (Ward, 1990) präpariert.

Zur Präparation von genomischer DNA wurden 5 ml üN-Kultur als Ausgangsmaterial verwendet. Die Kultur wurde zentrifugiert (3000 g, 1 min), die abgesetzten Zellen mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}^{\text{mp}}$  gewaschen, in 500  $\mu\text{l}$  Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde bis zur Marke von 1 ml mit Glasperlen gefüllt und das Gemisch ca. 2 min stark geschüttelt (*vortex*). Das Lysat wurde zentrifugiert (12.000 g, 2 min), die flüssige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 275  $\mu\text{l}$  7 M Ammoniumacetat (pH 7) versetzt und erst 5 min bei 65°C, dann 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Chloroform wurde das Lysat gut geschüttelt und erneut wie oben zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde getrocknet und die DNA in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}^{\text{mp}}$  resuspendiert.

### 2.2.2.5. Expression rekombinanter Proteine

#### Protein-Expression in *E. coli*

Die Proteinexpression in *E. coli* wurde über Expressionsvektoren auf der Basis von pET-11a in den Stämmen BL21(DE3)pLysS und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL durchgeführt. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol mit Zellen aus einer üN-Kultur auf eine optische Dichte von 0,2 bei 600 nm beimpft und inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,7 bis 0,8 bei 600 nm wurde die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 2,5 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 g, 10 min, 10°C) geerntet und das Zellpellet in 1/50 des ursprünglichen Kulturvolumens an Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bis zur Proteinreinigung bei -80°C eingefroren.

#### Protein-Expression in *S. cerevisiae*

Die Expression von Proteinen für Immunopräzipitationen erfolgte im Stamm W303-1A auf Basis der Expressionsvektoren pJD-CEX1-LEU und pJD-CEX1-TRP. Ihre Herstellung und Beschaffenheit ist auf Seite 54 beschrieben. Dazu wurden 50 ml Selektionsmedium mit Zellen aus einer üN-Kultur auf eine optische Dichte von 0,2 bei 600 nm beimpft und inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 1 bei 600 nm wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 g, 5 min, 5°C) geerntet und das Zellpellet in 1/40 des ursprünglichen Kulturvolumens an Hefe-Lysepuffer resuspendiert. Je 500 µl Zellsuspension wurden dann in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Glasperlen gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer Schwingmühle in Intervallen von 2, 4 und wieder 4 min bei 4°C. Zwischen den Aufschlussphasen wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt. Das entstandene Zellhomogenat wurde zentrifugiert (14.000 g, 10 min, 4°C) und der Überstand als fertiges Lysat abgenommen.

Die Proteinexpression in AH109 im Rahmen der 2-Hybrid-Analyse ist auf Seite 40 näher beschrieben. Die Expression von genomisch mit Epitopmarkierungen versehenen *CRPI*-Varianten (vgl. Seite 55) erfolgte in YPDA-Medium (unter dem geneigenen Promotor) oder YP-Medium mit Galaktose zur Induktion der GAL1-Promotors.

### **Protein-Expression *in vitro***

Die T7-Promotor-abhängige *in vitro* Expression von Proteinen wurde mit Hilfe des *TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems* oder des *TNT T7 Quick for PCR DNA Systems* der Firma Promega, Mannheim, nach Herstellerangaben in 50 µl-Ansätzen durchgeführt. Das zuerst erwähnte System erlaubt die Expression plasmidcodierter Proteine, während das zweite für die Expression von Proteinen von linearer Doppelstrang-DNA geeignet ist. Für die radioaktive Markierung der Produkte wurde L-[<sup>35</sup>S]-Methionin verwendet.

#### **2.2.2.6. Biochemisch-physikalische Analysemethoden**

##### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden durch photometrische Messung der Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm durchgeführt, die durch die heterozyklischen Basen bedingt wird. Dabei gilt, dass eine Absorption von 1 einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml, und einer Einzelstrang-DNA-Konzentration von etwa 33 µg/ml entspricht. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette, wobei die Lösung so mit H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> verdünnt wurde, dass Werte im Bereich 0,05 bis 1 erreicht wurden. Alternativ wurde der Doppelstrang-DNA-Gehalt einer Probe durch Vergleich mit einer definierten DNA-Menge auf einem Agarosegel abgeschätzt.

##### **Konzentrationsbestimmung von Protein**

Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die Messungen wurden in ½ Mikroküvetten mit 1 ml Messvolumen vorgenommen. Dazu wurden 950 µl 5-fach verdünnte *Protein Assay* Lösung vorgelegt, 1 bis 50 µl der zu untersuchenden Proteinlösung zugegeben und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> auf 1 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde anhand einer BSA-Kalibrierungsgeraden extrapoliert. Die Messungen erfolgten durch entsprechende Verdünnung der Proteinlösungen im linearen Bereich der Kalibrierungsgeraden.

## **Proteinsequenzierung und Analyse des tryptischen Peptidmassenspektrums**

Sequenzanalysen von Proteinen wurden von Dr. Markus Macht und später von Dr. Stefan Müller in der zentralen Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin Köln vorgenommen. N-terminale Sequenzierungen nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (Edman & Begg, 1967) wurden mittels ABI Procise 491 Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems mit anschließender Analyse abgespaltener Aminosäuren in einer Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (Messung aminosäurespezifischer Retentionszeiten) durchgeführt. Zu analysierende Proteine wurden im Tanksystem (vgl. *Western* Technik, Seite 39) auf Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Trägermembran der Firma Millipore, Eschborn, transferiert. Als Transferpuffer diente CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol, mit 5 M NaOH auf pH 11 eingestellt), um auf Glycin verzichten zu können, das später das Sequenzsignal überlagert hätte. Nach dem Proteintransfer erfolgte die Färbung der Proteine mit Ponceau S oder Coomassie Brilliant Blau. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten, die entsprechenden Trägermembranstücke in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, und bis zur Sequenzierung bei -80°C gelagert.

Zur Identifizierung anhand des spezifischen Peptidmusters nach tryptischem Verdau wurden die entsprechenden Proteine direkt aus einem mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-PAA-Gel ausgeschnitten. Die entsprechenden PAA-Gelstücke wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Nach Alkylierung der enthaltenen Proteine und Behandlung mit Trypsin wurden die Peptidmassen durch MALDI-TOF MS mit Hilfe eines Bruker Reflex III Gerätes ermittelt. In einem zweiten Schritt wurden einzelne Peptide LC-ESI MS-MS (Roepstorff, 1997) mit Hilfe eines Q-TOF MS Gerätes der Firma Micromass einer Sequenzanalyse unterzogen. Für beide Sequenzierungsmethoden wurden  $\geq 50$  pmol des jeweiligen Proteins präpariert.

## **Größenbestimmung von Proteinen durch Massenspektroskopie**

Die Molekulargewichtsbestimmung von Crp1p-Derivaten wurde mittels MALDI-TOF MS durch Anja Hochheiser und Dr. Shivani Chatterjee im Labor von Professor Dr. Schomburg am Institut für Biochemie der Universität zu Köln durchgeführt.

### **Nachweis von Radioaktivität durch *Phosphorimaging***

Radioaktiv markierte DNA in PAA-Gelen oder in membrangebundener Form sowie radioaktiv markierte Proteine in SDS-PAA-Gelen wurden durch *Phosphorimaging* nachgewiesen. Die Expositionszeit einer *Imager*-Platte betrug bei den in Standard-EMSA-Analysen eingesetzten Mengen an Radioaktivität 30 min, bei anderen Anwendungen variierte die Zeit von einigen Sekunden bis mehreren Stunden in Abhängigkeit der Signalstärke. Zur Visualisierung des Signals wurden die *Imager*-Platten durch einen X BAS 1000 *Phosphorimager* der Firma Fuji Europe GmbH, Düsseldorf, gelesen und die Daten mit Hilfe des Computerprogramms *BAS-Reader 2.7* der Firma raytest Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt, auf einen Computer übertragen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *TINA 2.08* der gleichen Firma.

#### **2.2.2.7. Proteinfärbungen**

##### **Färbung mit Coomassie Brilliant Blau**

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung können Proteinbanden mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blau R250 oder -G250 in PAA-Gelen angefärbt werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei ca. 200 ng Protein in einer Bande. Zunächst wurde das PAA-Gel für 1 bis 2 h in Coomassiefärbelösung (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 40% (v/v) Methanol, 20% (v/v) Essigsäure) gelegt, wobei es vollständig blau eingefärbt wird. Durch die Behandlung mit Coomassie-Schnellentfärber (10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) verliert das Gel die blaue Farbe wieder, wobei die Proteinbanden gefärbt bleiben. Die Färbe- und Entfärbezeit richteten sich nach der Menge an Protein in den zu untersuchenden Banden.

##### **Färbung mit Silbernitrat**

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung können Proteinbanden mit Hilfe von Silbernitrat in einem nicht-quantitativen Verfahren in PAA-Gelen angefärbt werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei ca. 10 ng Protein in einer Bande. Die Gele wurden 5 min in Silber-Lösung I fixiert, 30 min in Silber-Lösung II inkubiert, 3 mal 10 min in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gewaschen, 15 min in Silber-Lösung III inkubiert und schließlich

in Silber-Lösung IV entwickelt, bis einzelne Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe einer 50 mM EDTA-Lösung gestoppt.

### **Färbung mit Ponceau S**

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran können diese reversibel mit Hilfe von Ponceau S (0,1% (w/v) Ponceau S in 5%-iger Essigsäure) angefärbt werden. Dieses Verfahren erlaubt eine Kontrolle des Protein-Transfers bzw. das Ausschneiden einzelner Banden zur Proteinsequenzierung. Die Membranen wurden 10 Min. in Ponceau-Lösung gelegt und überschüssiger Farbstoff mit H<sub>2</sub>O abgewaschen. Die Entfärbung erfolgte durch Waschen mit PBS.

### **2.2.2.8. Gelelektrophoresen**

#### **Denaturierende PAA-Gele**

Um die durch die Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 eingeführten Schnitte im X-DNA Substrat CF110 nachzuweisen, wurden denaturierende PAA-Gele verwendet. Nach dem Zerfall des Substrates und der Auftrennung der Oligonukleotide im Gel konnte ein Schnitt im radioaktiv markierten Strang des Substrats durch Auswertung mit dem *Phosphorimager* ermittelt werden. Weiterhin wurden sie für die Reinigung von Oligonukleotiden verwendet. Ein 50 ml Ansatz zum Gießen eines Gels enthielt 7 M Harnstoff und 15% (w/v) Acrylamid/Bis (5% C) in TBE. Nach dem Lösen des Harnstoffs wurde das Gemisch durch einen Faltenfilter gegeben. Dann wurden 65 mg APS darin gelöst und die Polymerisierungsreaktion durch Zugabe von 20 µl TEMED gestartet. Das Gel wurde zwischen 2 Glasplatten in das Format 33 x 44 cm mit einer Dicke von 0,3 mm gegossen. Durch das Einstecken eines Platzhalters wurden 10 Kammern mit 100 µl Fassungsvermögen für das Auftragen der Proben geformt. Die Polymerisationszeit betrug mind. 45 min bei RT. Als Laufpuffer diente TBE. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel auf 60°C vorgeheizt. Dazu wurde die Anordnung 60 min mit 65 W in Betrieb genommen. Die Probenauftrennung erfolgte mit 35 W über einen Zeitraum von 2 h bei RT.

### Native PAA-Gele zur Reinigung von DNA-Substraten

Zur Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Substraten wurden native PAA-Gele verwendet. Ein 50 ml Ansatz zum Gießen eines Gels enthielt 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (w/v) Acrylamid/Bis (5% C) und 65 mg APS in TBE. Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 20 µl TEMED gestartet. Das Gel wurde zwischen 2 Glasplatten in das Format 33 x 44 cm mit einer Dicke von 0,3 mm gegossen. Durch das Einstecken eines Platzhalters wurden 4 Kammern mit 100 µl Fassungsvermögen für das Auftragen der Proben geformt. Die Polymerisationszeit betrug mind. 45 min bei RT. Als Laufpuffer diente TBE mit 12 mM MgCl<sub>2</sub>. DNA-Substrat-Lösungen wurden nach ihrer Hybridisierung mit 10 µl eines nativen Ladepuffers (50 mM EDTA, 0,25% (w/v) BPB, 0,25% (w/v) XC, 50% (v/v) Glycerin) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum 15 bis 18 Stunden bei RT bei einer Spannung ≤ 150 V. Durch dieses Vorgehen blieben die diversen DNA-Substrate intakt.

### Denaturierende Proteingele

SDS-PAA-Gele wurden verwendet, um die Komponenten eines Proteingemisches entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) eingesetzt. Als Molekülmassenmarker dienten vorgefärbte Proteinmarker der Firma Biorad, München. In Abhängigkeit der gewünschten Trennschärfe in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich enthielten die Gele verschiedene Mengen an Acrylamid/Bis und setzten sich wie folgt zusammen:

	Sammelgel 5% (w/v) PAA	Trenngel 12% (w/v) PAA	Trenngel 15% (w/v) PAA	Trenngel 20% (w/v) PAA
50% (w/v) Acrylamid/Bis (2,6% C)	1 ml	2,4 ml	3 ml	4 ml
1M Tris/HCl	1,25 ml (pH 6,8)	3,75 ml (pH 8,8)	3,75 ml (pH 8,8)	3,75 ml (pH 8,8)
H <sub>2</sub> O <sup>mp</sup>	7,6 ml	3,7 ml	3,1 ml	2,1 ml
10% (w/v) APS	50 µ	50 µl	50 µl	50 µl
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µ
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µ

Nach den aufgeführten Rezepten wurden jeweils zwei Gele hergestellt. APS und TEMED wurden unmittelbar vor dem Gießen zugesetzt. Die Gele wurden zwischen je zwei Glasplatten in das Format 7,2 x 10 cm mit einer Dicke von 0,5 mm gegossen. Zuerst wurde das Trenngel auf 4/5 der Gesamthöhe eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 1 h Polymerisationszeit wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel auf das erhärtete Trenngel gegossen. Durch das Einstecken eines

Platzhalters wurden 10 bzw. 15 Kammern mit etwa 25  $\mu$ l bzw. 15  $\mu$ l Fassungsvermögen für das Auftragen der Proben geformt. Die Polymerisationszeit betrug ca. 45 min bei RT. Als Laufpuffer diente SDS-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Die Elektrophorese erfolgte in einer Mini Protean II Kammer der Firma Biorad bei 100 V bei RT.

### **Native PAA-Gele für Gel-Retentionsanalysen (EMSAs)**

Native 8%-ige (w/v) PAA-Gele wurden verwendet, um EMSAs mit radioaktiv markierten DNA-Substraten durchzuführen. Ein Ansatz für zwei Gele enthielt 8% (w/v) Acrylamid/Bis (2,6% C), 130  $\mu$ l einer 10%-igen (w/v) APS-Lösung und 12  $\mu$ l TEMED in EMSA-Puffer (6,7 mM Tris-HCl, pH 8, 3,3 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA). Die Gele wurden zwischen je zwei Glasplatten in das Format 7,2 x 10 cm mit einer Dicke von 0,5 mm gegossen. Durch das Einstecken eines Platzhalters wurden 10 bzw. 15 Kammern mit etwa 25  $\mu$ l bzw. 15  $\mu$ l Fassungsvermögen für das Auftragen der Proben geformt. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 45 min bei RT. Als Laufpuffer diente EMSA-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 2 bis 2,5 h bei 70 V bei 4°C.

### **Agarosegele**

0,5 bis 1%-ige (w/v) Agarosegele wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von doppelsträngiger DNA verwendet. Eine entsprechende Menge Agarose wurde in TBE gegeben und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden 0,5  $\mu$ g Ethidiumbromid pro ml Gel zugegeben. Die Gele wurden in Elektrophoresekammern mit den Formaten 7,5 x 10 cm bzw. 7,5 x 20 cm mit einer Dicke von 0,5 cm gegossen. Durch das Einstecken eines Platzhalters wurden die Kammern für das Auftragen der Proben geformt. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 30 min bei RT. Als Laufpuffer diente TBE. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA kann diese durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die 1-kb-Leiter der Firma BRL, Neu-Isenburg, oder die 123-bp-Leiter der Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main, verwendet.

### 2.2.2.9. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

#### **Western Technik**

Die *Western* Technik ermöglicht die positionsgenaue Übertragung von Proteinen aus einem SDS-PAA-Gel auf eine geeignete Trägermembran. Der Transfer erfolgte in einem *Mini Protean II* Tanksystem oder in einer *Trans-Blot SD semi-dry transfer cell* der Firma Biorad, München. Die Transferdauer betrug 2 h im Tanksystem (bei 2 mA/cm und 4 °C) und 45 min in der *semi-dry* Zelle (bei 15 V und RT). Um zu prüfen, ob die Proteine vollständig transferiert wurden, wurden die PAA-Gele nach dem *blot* mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Bei unvollständigem Transfer wurden die Transferzeiten im Einzelfall erhöht.

#### **Immuno-blot**

Für den immunologischen Nachweis membrangebundener Proteine, dem sog. *Immuno-blot*, erfolgte der *Western-blot* in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) auf *Hybond-C-* oder *Hybond-ECL* Nitrozellulose-Membran der Firma Amersham Biosciences, Freiburg. Dabei blieb die Immunoreaktivität der Proteine erhalten. Freie Protein-Bindungsstellen auf der Trägermembran wurden durch 1-stündige Inkubation in 5%-iger (w/v), fettfreier Milchlösung in PBST blockiert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper in 25%-iger (w/v), fettfreier Milchlösung in PBST. Beim Einsatz von konjugierten Antikörpern (monoklonaler Anti-c-Myc-Peroxidase Antikörper aus der Maus, Klon 9E10, Arbeitsverdünnung 1:1000 bzw. monoklonaler Anti-HA-*High Affinity* Antikörper aus der Ratte, Klon 3F10, Arbeitsverdünnung 1:2000, beide von der Firma Roche, Mannheim), die selbst eine Meerrettich-Peroxidaseaktivität tragen, wurde die Membran danach 3 mal 20 min in PBST gewaschen, um unmittelbar mit dem chemischen Nachweis fortzufahren. Als Substrat für die Peroxidaseaktivität diente das Chemilumineszenz-Substrat ECL, mit dem die Membran 1 min inkubiert wurde. Dann wurde die Trägermembran 10 min trocknen gelassen, mit Plastikfolie bedeckt und sofort die Lumineszenz auf Röntgenfilmen festgehalten. Die Expositionszeit wurde der jeweiligen Signalstärke angepasst, und die Filme vollautomatisch mit Hilfe einer Entwicklermaschine der Firma Agfa entwickelt.

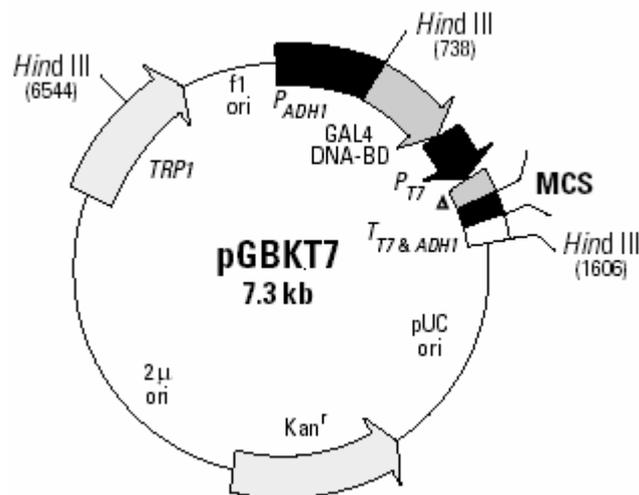
Der immunologische Nachweis His-tag tragender Proteine erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Anti-His Antikörpers (ohne eigene HRP-Aktivität) der Firma Novagen, Madison, USA. Er wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde ein HRP-gekoppelter sekundärer Ziege-Anti-Maus Antikörper statt eines HRP-konjugierten ersten Antikörpers verwendet. Statt PBST wurde TBSTT (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20, 0,2% (v/v) Triton X-100) verwendet.

### 2.2.2.10. Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen

#### Hefe 2-Hybrid Methode

**Prinzip und Reporterkonstrukte.** Die Hefe 2-Hybrid Methode erlaubt die Detektion von Protein-Interaktionen *in vivo* in Hefe (Fields & Song, 1989). Um potentielle Interaktionspartner von Crp1p ausfindig zu machen, wurde das Protein als Köder beim Durchmustern verschiedener Hefe-DNA-Banken eingesetzt. Dabei wurde Crp1p als Fusion mit der DNA-Bindedomäne von Gal4p mit durch die DNA-Bank codierten Fusionsproteinen der Gal4p-Aktivierungsdomäne exprimiert. Im Falle einer Interaktion kommen die beiden Gal4p Domänen zusammen und erlauben die Transkription von Reportergenen. Die Methode wurde im Wesentlichen nach dem Benutzerhandbuch *BD MATCHMAKER Gal4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* der Firma BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA, angewandt. Der verwendete Reporterstamm AH109 besitzt drei genomisch integrierte Reporter, *ADE2*, *HIS3* und *MEL1*, die verwendet wurden, um positive Interaktionen zu selektieren. Sie liegen an verschiedenen Stellen im Genom und sind mit unterschiedlichen Gal4p-abhängigen Promotorsequenzen und TATA-Box-Sequenzen ausgestattet. Dadurch fallen falsch-positive Signale durch Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte TATA-Box-Sequenzen binden, durch Proteine, die stromaufwärts eines der Reportergene binden, oder durch Proteine, die mit bestimmten Promotorregionen außerhalb der Gal4p-Bindestelle interagieren, weg. Daraus ergibt sich ein Stamm mit der Möglichkeit stringenter Selektion mittels der Auxotrophiemarker *ADE2* und *HIS3* (Phänotyp Ade2<sup>+</sup> bzw. His3<sup>+</sup>) sowie einer blau-weiß Selektion mittels des sezernierten Enzyms  $\alpha$ -Galaktosidase (Phänotyp Mel1<sup>+</sup>) auf X- $\alpha$ -Gal-Indikatorplatten.

**Klonierung von Crp1p-Derivaten als Köderproteine.** *CRP1* wurde in voller Länge und als N-terminales- (codierend für Aminosäuren 1-160) bzw. C-terminales Fragment (codierend für Aminosäuren 160-465) in den Vektor pGBKT7 (Abbildung 5) kloniert (vgl. Tabelle 4). Dazu wurden die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *SalI* benutzt. Nach der Ligation entsprechend vorbereiteter PCR-Produkte mit dem Vektor erfolgte die Transformation in *E. coli*. Plasmide wurden aus Kanamycin-resistenten Klonen isoliert und einer analytischen Restriktion mit *EcoRI* und *SalI* unterzogen. Klone, die ein Restriktionsfragment der erwarteten Länge aufwiesen, wurden sequenziert. Bei fehlerfreier Sequenz wurden die entsprechenden Plasmide in den Reporterstamm AH109 transformiert. Die Crp1p-Derivate konnten in Hefe als Fusion mit der DNA-Bindedomäne von Gal4p (Aminosäuren 1-174 = GAL4-DNA-BD) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven  $P_{ADH1}$  exprimiert werden. Die Fusion trägt außerdem eine c-Myc-Epitopmarkierung, welche der Kontrolle der Expression mittels immunologischem Nachweis diene.

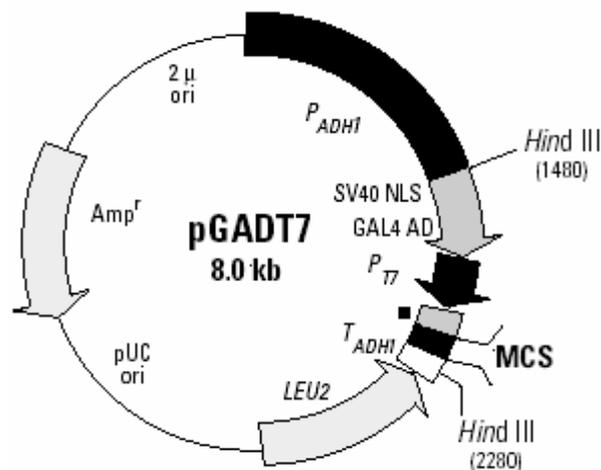


**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pGBKT7.**

Der Vektor pGBKT7 trägt Replikationsursprünge (ori) zur Vermehrung und Markergene (Kan<sup>r</sup> bzw. *TRP1*) zur Selektion in *E. coli* und *S. cerevisiae*.  $P_{ADH1}$ -vermittelte Proteinexpression in *S. cerevisiae* führt zur Fusion der GAL4-DNA-BD mit dem jeweiligen in der *multiple cloning site* (MCS) codierten Zielprotein. Zielproteine können außerdem *in vitro* über den T7 Promotor ( $P_{T7}$ ) ohne die GAL4-DNA-BD exprimiert werden. In beiden Fällen trägt das Zielprotein eine c-Myc-Epitopmarkierung (mit einem Dreieck markiert). Die Möglichkeit der *in vitro* Expression des Zielproteins ist im Vorläufervektor pGAD nicht gegeben.

**Hefe-DNA-Banken.** Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Hefe-DNA-Banken durchmustert. Es handelte sich dabei um eine genomische DNA-Bank des Typs *Saccharomyces cerevisiae* MATCHMAKER Genomic Library der Firma

BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA, und eine  $\lambda$ -Expressionsbank mit Hefe-cDNA (Elledge *et al.*, 1991; verfügbar bei der American Type Culture Collection, Manassas, USA, ATCC No. 87002), die subkloniert in Form von Plasmid-DNA vorlag. Die genomische Bank bestand aus einer Mischung von drei pGAD Vektoren, die sich jeweils nur im Leseraster der *Bam*HI Klonierungsstelle für die Hefe-DNA unterschieden (Chien *et al.*, 1991). Der Vektor pGAD ist ein Vorgänger des Vektors pGADT7 (Abbildung 6) ohne T7 Promotor und Terminator. Er vermittelt die Expression der Beuteproteine als C-terminale Fusion der Aktivierungsdomäne von Gal4p (Aminosäuren 768-881 = GAL4-AD) und einer Signalsequenz für den nukleären Import.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pGADT7.**

Der Vektor pGADT7 trägt Replikationsursprünge (ori) zur Vermehrung und Markergene ( $Amp^r$  bzw. *LEU2*) zur Selektion in *E. coli* und *S. cerevisiae*.  $P_{ADH1}$ -vermittelte Proteinexpression in *S. cerevisiae* führt zur Fusion der GAL4-AD und einem Kernimportsignal (SV40NLS) mit dem jeweiligen in der *multiple cloning site* (MCS) codierten Zielprotein. Zielproteine können außerdem *in vitro* über den T7 Promotor ( $P_{T7}$ ) ohne die GAL4-AD exprimiert werden. In beiden Fällen trägt das Zielprotein eine HA-Epitopmarkierung (mit einem Quadrat markiert).

Die cDNA-Bank lag im Vektor pACT vor, der ebenso die Expression der Beuteproteine als C-terminale Fusion der GAL4-AD und einer Signalsequenz für den nukleären Import vermittelt. Seine Regulatorelemente entsprechen im Wesentlichen denen von pGAD.

**Durchmustern von Hefe-DNA-Banken.** Köder- und Beuteproteine wurden nach der sequenziellen Methode, d.h. nacheinander in AH109 transformiert (vgl. Seite 30), was im Vergleich zu Simultantransformation eine 10-fach höhere Transformationseffizienz ermöglicht. Die Selektion auf Anwesenheit sowohl eines

Köder- als auch eines Beuteplasmids erfolgte mittels der Auxotrophiemarker *LEU2* und *TRP1*. Die Selektion auf Interaktion erfolgte über die Reporter *ADE2* und *HIS3*. Zusätzlich konnten die Selektionsplatten als Indikator für die Expression von *MEL1* X- $\alpha$ -Gal enthalten. Die Plattierung einer Standard-Transformation erfolgte zu gleichen Teilen auf 10 Platten maximaler Stringenz ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin, 5 Platten mittlerer Stringenz ohne Leucin, Tryptophan und Adenin sowie 5 Platten niedriger Stringenz ohne Leucin, Tryptophan und Histidin. Parallel wurde ein Aliquot auf 4 Platten ohne Leucin und Tryptophan verteilt, um die Zahl der getesteten Transformanden zu ermitteln. Im Zeitraum von 5 bis 10 Tagen nach der Plattierung bildeten sich einzelne Kolonien auf den Selektionsplatten. Diese wurden auf frische X- $\alpha$ -Gal-Indikatorplatten ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin transferiert. Wenn die unplattierten Klone erneut wuchsen und eine Blaufärbung zu beobachten war, wurden die entsprechenden Beuteplasmide isoliert (vgl. Seite 31).

**Kontrollen.** Vor dem Durchmustern einer DNA-Bank muss zunächst ausgeschlossen werden, dass eine Reporter-Antwort alleine durch Anwesenheit der Basisvektoren ausgelöst wird. Um dies zu prüfen, wurden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 ohne einklonierte Fremd-DNA in AH109 transformiert. Die Zellen wurden über den Phänotyp  $\text{Leu}^+$ ,  $\text{Trp}^+$  als Träger der Plasmide identifiziert, führten aber wie erwartet nicht zu einer Transkription der Reportergene und waren damit  $\text{Ade}^-$  und  $\text{His}^-$ . Weiterhin muss ausgeschlossen werden, dass die Kombination von Köder und Beute-Basisvektor die Reportergene aktiviert. Dies wurde durch eine entsprechende Transformation und Selektion ausgeschlossen. Als Positivkontrolle für die Reporterantwort dienten die in der 2-Hybrid-Analyse interagierenden Proteine p53 der Maus und das große T-Antigen des SV40-Papovavirus (Li & Fields, 1993). Sie wurden als Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne bzw. Aktivierungsdomäne von Gal4p von den Vektoren pGBKT7-53 bzw. pGADT7-T exprimiert. Co-Expression führte zu einem  $\text{Ade}^+$ ,  $\text{His}^+$  Phänotyp.

Nach dem Durchmustern einer DNA-Bank wurden potentielle Interaktionen folgenden Kontrolle unterzogen: Das entsprechende Beuteplasmid wurde in Kombination mit dem Köder-Basisvektor in AH109 getestet. Der Phänotyp musste hier  $\text{Leu}^+$ ,  $\text{Trp}^+$ ,  $\text{Ade}^-$ ,  $\text{His}^-$  sein. Der gleiche Phänotyp musste sich mit der Negativkontrolle, dem menschlichen Lamin C ergeben. Menschliches Lamin C-GAL4-DNA-BD (codiert

von Vektor pGBKT7-Lam) diene dazu, zufällige Interaktionen mit einem bezugslosen Fremdprotein auszuschließen. Lamin C eignet sich hierzu, da es mit den meisten anderen Proteinen nicht in Wechselwirkung tritt (Bartel *et al.*, 1993; Ye & Worman, 1995). Gleichzeitig musste der Phänotyp Leu<sup>+</sup>, Trp<sup>+</sup>, Ade<sup>+</sup>, His<sup>+</sup> durch Co-Expression des Beute- und Köderproteins wieder herstellbar sein.

### **Immunopräzipitation von *in vitro* exprimierten Proteinen**

Um die im Hefe-2-Hybrid-System nachgewiesenen Interaktionen biochemisch zu testen, wurden *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte Kandidatenproteine einer Co-Immunopräzipitation unterzogen. Die Beuteproteine, die pACT-codiert vorlagen, mussten für die *in vitro* Expression zunächst mit einem T7-Promotor, einer Kozak-Sequenz und einer HA-Epitopmarkierung versehen werden. Dazu wurde die codierende DNA-Sequenz zunächst mit Primern (UR077 und UR078), die direkt stromaufwärts und stromabwärts der Fremd-DNA in der pACT-Sequenz hybridisieren, mittels PCR amplifiziert. Das Produkt wurde als Matrize für eine zweite PCR genutzt, bei der die genannten Veränderungen über den 5'-Primer eingeführt wurden. Dieser Primer (UR079) trug einen 69-Basen Überhang, der nicht mit der Matrize hybridisiert. Deshalb wurde diese modifizierende, zweite PCR nicht direkt mit dem Plasmid als Matrize durchgeführt, sondern mit einer zugänglicheren linearen Matrize (der zweite Primer war hier ebenfalls UR078).

Das Köderprotein Crp1p<sup>aa1-160</sup> lag pGBKT7-codiert vor und konnte direkt mit einer c-Myc-Epitopmarkierung *in vitro* exprimiert werden (vgl. Abbildung 5). Die Kontrollproteine p53 der Maus und das große T-Antigen des SV40-Papovavirus konnten ebenfalls direkt von den Plasmiden pGBKT7-p53 und pGADT7-T mit einer c-Myc-Epitopmarkierung bzw. einer HA-Epitopmarkierung exprimiert werden. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit Hilfe des *BD MATCHMAKER Co-IP Kit* der Firma BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA, durchgeführt. Zwei zu testende Proteine (je 10 µl des *in vitro* Expressionsansatzes) mit unterschiedlichen Epitopmarkierungen (HA oder c-Myc) wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt, 1 h bei RT inkubiert und mit 1 µg des im *Kit* enthaltenen polyklonalen Anti-HA- oder monoklonalen Anti-c-Myc Antikörpers versetzt. Nach 1 h bei RT wurden Immunokomplexe mit 3 µl in PBS äquilibrierter Protein A-Agarose über 1 h auf einem

Rotor gesammelt. Die Protein A-Agarose wurde nach Vorschrift gewaschen, in 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min auf 80°C erhitzt.

### **Immunopräzipitation aus Hefe-Lysaten**

Immunopräzipitationen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 4 °C und Inkubation auf einem Rotor durchgeführt. Ein 1 mg Gesamtprotein enthaltendes Hefe-Lysatvolumen wurde mit Hefe-Lysepuffer auf ein Volumen von 500  $\mu$ l eingestellt und 1,5 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,75  $\mu$ g des monoklonalen Anti-HA-*High Affinity* Antikörper (aus der Ratte, Klon 3F10 von der Firma Roche, Mannheim) bzw. 1,5  $\mu$ g des c-Myc *monoclonal antibody* (aus der Maus, Klon 9E10 von der Firma BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) wurde das Gemisch weitere 2 h bei 4°C inkubiert. Immunokomplexe wurden mit 25  $\mu$ l in Hefe-Lysepuffer äquilibrierter Protein G-Agarose der Firma Roche, Mannheim, über 1,5 h gesammelt. Die Protein G-Agarose wurde 5 mal 5 min mit Hefe-Lysepuffer gewaschen, 5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und 5 min in 30  $\mu$ l SDS-Probenpuffer bei 96 °C unter Schütteln resuspendiert.

#### **2.2.2.11. Proteinfractionierung**

##### **Herstellung zellfreier *S. cerevisiae* Extrakte**

Frische oder eingefrorene Zellpellets wurden mit einem Massenanteil von 40% in Puffer A resuspendiert und stets auf Eis gekühlt. Zu der Zellsuspension wurde unmittelbar vor dem Aufschluss der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid in einer Endkonzentration von 2 mM gegeben. Der Aufschluss erfolgte mechanisch in einem Zelldisintegrator mit Glasrührer. Die Aufschlusskammer wurde mit Glasperlen ( $\varnothing = 0,5$  mm) und Zellsuspension in einem Verhältnis von etwa 1:1 beschickt (50 ml Glasperlen und 50 bis 60 ml Zellsuspension). Der Zellaufschluss bestand aus 3 Rührphasen von je 8 min bei 4000 U/min, unterbrochen von 2-minütigen Pausen, um eine Erwärmung der Zellsuspension zu verhindern. Die Aufschlusskammer des Zelldisintegrators wurde dabei permanent durch ein Wasserkühlsystem auf 3 °C gehalten. Der Erfolg eines Zellaufschlusses wurde durch die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm um die Hälfte des für die Ausgangszellsuspension gemessenen Wertes photometrisch kontrolliert. Das Zellhomogenat wurde ultrazentrifugiert (95.000 g, 75 min, 4°C) und der Überstand (Rohextrakt) gegen einen Puffer B dialysiert.

### **Niedrigdruck-Flüssigkeits-Chromatographien zur Fraktionierung von *S. cerevisiae* Proteinen**

Alle Niedrigdruck-Flüssigkeits-Chromatographien wurden mit Hilfe einer computergesteuerten FPLC-Anlage der Firma Amersham Biosciences, Feiburg, bei 5 °C durchgeführt. Die Salzkonzentration am Ausgang der FPLC-Säulen wurde durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt. Salz- und Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Schreibers während des Chromatographievorgangs auf kariertem Papier dokumentiert.

Alle verwendeten FPLC-Säulen wurden zunächst mit dem jeweils vorgesehenen Puffer + 1000 mM KCl gewaschen. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit mindestens 3 Säulenvolumina des vorgesehenen Puffers mit der für das Laden der Proteinlösung vorgesehenen Salzkonzentration. Alle durch FPLC zu fraktionierenden Extrakte wurden durch Dialyse auf den gewünschten Puffer und die gewünschte Salzkonzentration eingestellt.

Die Fraktionierung beruhte auf der spezifischen Bindung des Zielproteins an die verwendeten Medien und einer graduellen Elution der gebundenen Proteine durch Anhebung der KCl-Konzentration im jeweiligen Betriebspuffer. Es folgt eine Kurzübersicht der verwendeten Trennmedien.

**DEAE-Zellulose.** Eine Leersäule des Typs XK 26/40 wurde mit 100 ml DEAE-Zellulose beschickt. Zum Packen der Säule wurde die DEAE-Zellulose in Puffer B + 1000 mM KCl aufgeschwemmt und in die FPLC-Leersäule gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich das Säulenmaterial kontinuierlich absetzte, während die Puffer-Lösung durch den unteren Säulenausgang abließ. Nach dem Packen wurde die FPLC-Säule einige Stunden bei einer Flussrate von 2 ml/min in Betrieb genommen. Dabei verdichtete sich die DEAE-Zellulose und sackte etwas vom oberen Verschlussstempel der Säule ab. Dieser wurde so nachjustiert, dass er wieder mit der Oberfläche des Füllbetts abschloss, um zu gewährleisten, dass eingeleitete Lösungen direkt in das Chromatographiematerial eindringen. DEAE-Zellulose Säulen wurden mit Puffer B mit variablen Flussraten betrieben. Die Säule lief druckfrei.

**MonoQ.** Es wurde eine handelsübliche HR10/10 FPLC-Säulen mit einem Säulenvolumen von 10 ml verwendet. Die MonoQ Säule wurden mit Puffer B mit variablen Flussraten betrieben. Der Betriebsdruck wurde stets kleiner als 2,5 MPa gehalten.

**MonoS.** Hier gelten die gleichen Spezifikationen wie bei der MonoQ-Säulenchromatographie, mit der Ausnahme, dass Puffer C verwendet wurde.

**Heparin-Sepharose.** Es wurden handelsübliche HiTrap Heparin Säulen mit 5 ml Säulenvolumen verwendet. Heparin-Sepharose Säulen wurden mit Puffer B mit variablen Flussraten betrieben. Die Säulen liefen druckfrei.

**Dialysen.** Zum Umpuffern von Extrakten und Proteinfractionen aus Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatographien wurden die jeweiligen Proben in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 12 kDa gefüllt. Die Dialyse fand üN bei einem mindestens 50-fachen Pufferüberschuss bei 4 °C statt. Die Dialyseschläuche wurden vor der Verwendung 15 min in einer 1,5%-igen (w/v) NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und anschließend 15 min in H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gekocht. Proben mit geringem Volumen von 100 bis 500 µl, die für Aktivitätstests umpuffert werden sollten, wurden in einer Durchflussdialysekammer mit einer Membran mit einer Ausschlussgröße von 12 kDa dialysiert. Die Dialyse fand für mindestens 2 h gegen 2 l Puffer bei 4°C statt. Die Umwälzung des Puffers erfolgte durch eine Schlauchpumpe.

### **Ni-NTA Affinitätschromatographie zur Reinigung rekombinanter Proteine**

Die Zellen einer *E. coli* Expressionskultur (vgl. Seite 32) lysierten beim Auftauen von -80°C. Der Vorgang wurde durch Ultraschall-Beschallung unterstützt. Das Lysat wurde einer Klärungszentrifugation (30.000 g, 30 min, 4°C) unterzogen. Um mit His-tag versehene Proteine affinitätschromatographisch zu reinigen, wurde der Überstand in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 2 ml einer 50% (v/v) Aufschwemmung von Nickel-Nitrilotriacetat- (Ni-NTA) Agarose der Firma Qiagen, Hilden, in Lysepuffer versetzt. Das Gemisch wurde für 1 h bei 4°C getaumelt oder langsam rotiert und dann in eine Leersäule gegeben. Die Agarose setzte sich ab und wurde 2 mal mit je 9 ml Waschpuffer (wie Lysepuffer, aber mit 200 mM NaCl und 10 mM Imidazol) gespült,

bevor gebundenes Protein durch Elutionspuffer (wie Waschpuffer, aber mit 250 mM oder 500 mM Imidazol) mit steigender Imidazol-Konzentration herunter gewaschen wurde. Proteine in Elutionsfraktionen konnten direkt einem Aktivitätstest unterzogen werden, da sich zeigte, dass die Anwesenheit von Imidazol keine Auswirkung auf die Protein-DNA Wechselwirkung hatte.

Für eine analytische Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde dem Lysepuffer Harnstoff auf eine Endkonzentration von 8 M zugesetzt. Hier wurde ein kleinerer Maßstab gewählt. 600 µl geklärtes Lysat wurden auf kommerzielle Ni-NTA-*Spin Columns* der Firma Qiagen, Hilden, geladen. Die folgenden Zentrifugationen fanden bei 700 g in einer Tischzentrifuge bei RT statt. Die Säule wurde 2 mal mit 600 µl denaturierendem Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, mit HCl auf pH 6,3 eingestellt), und 2 mal mit 200 µl denaturierendem Elutionspuffer (denaturierender Waschpuffer, der auf pH 4,5 eingestellt wurde) gespült, bevor das Gros des gebundenen Proteins mit 200 µl denaturierendem Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol eluiert wurde. Diese letzte Fraktion wurde zum immunologischen Nachweis von Crp1p-Derivaten verwendet.

### **Konzentrierung von Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Zentrifugen-Ultrafiltereinheiten der Firma Millipore, Eschborn, nach Herstellerangaben konzentriert. Dabei wurde eine 10 bis 100-fache Konzentration erreicht, ohne die Pufferbedingungen zu ändern. Die Ultrafiltration erfolgte bei der jeweils maximal zulässigen Belastung in *Amicon Microcon*- (bis 500 µl Ausgangsvolumen, Ausschlussgröße: 30 kDa) oder *Amicon Ultra* Einheiten (bis 4 ml Ausgangsvolumen, Ausschlussgröße: 10 kDa). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

#### **2.2.2.12. Substratherstellung aus synthetischen Oligonukleotiden**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden für die qualitative und quantitative Untersuchung der Bindung von Protein an DNA verschiedene DNA-Substrate verwendet (vgl. Seite 20). Die Substrate wurden aus unterschiedlichen synthetischen Oligonukleotiden hergestellt, von denen je eines am 5'-Ende mit dem Radioisotop <sup>32</sup>P markiert war.

### Reinigung synthetischer Oligonukleotide

Die von Amersham Biosciences, Freiburg, oder Thermo Life Sciences, Ulm, bezogenen Oligonukleotide waren in unterschiedlichem Maße mit verkürzten Oligonukleotiden verunreinigt. Die Trennung der Oligonukleotide mit voller Länge von den verkürzten Spezies erfolgte durch Gelelektrophorese in einem 10%-igen (w/v), denaturierenden PAA-Gel. Je Spur wurden 10 bis 20 µl einer 100 pM Oligonukleotid-Lösung aufgetrennt. Das Gel wurde auf einer Kieselgelplatte mit UV-Licht bei 259 nm bestrahlt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Die DNA-Bande der geringsten Laufweite wurde ausgeschnitten und das jeweilige PAA-Stück in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl TE-Puffer überführt. Die Elution des jeweiligen Oligonukleotids erfolgte *in vacuo* bei 56 °C. Das Eluat wurde mit Hilfe von NAP-5 Säulen der Firma Amersham Biosciences nach Herstellerangaben entsalzt. Die Elution der Oligonukleotide von den Säulen wurde mit H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> durchgeführt. Das Eluat wurde im Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von 0,5 ml eingeengt.

### Radioaktive 5'-Markierung von Oligonukleotiden

Radioaktive 5'-Markierungen wurden mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4 (Promega, Mannheim) durchgeführt (Richardson, 1965). Bei der Kinase-Reaktion wird das Orthophosphat von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP auf Nukleinsäuren mit freier 5'-OH-Gruppe übertragen. Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl enthielt 2 bis 5 pmol des jeweiligen Oligonukleotids, 10 Einheiten T4 Polynukleotidkinase, 10 µCi  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, 1 µl Kinasepuffer (10-fach) und H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> (ad 10 µl). Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

### Hybridisierung von Oligonukleotiden zu DNA-Substraten

Zur Herstellung linearer doppelsträngiger oder verzweigter doppelsträngiger DNA-Substrate wurden zwei, drei bzw. vier Oligonukleotide miteinander hybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde ein Oligonukleotid pro Substrat <sup>32</sup>P-markiert und mit Ethanol gefällt. Das markierte und gefällte Oligonukleotid wurde in TBE mit 12 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Im Falle eines doppelsträngigen Substrates wurde für die Hybridisierung das komplementäre Oligonukleotid in 3-fachem Überschuss zugegeben. Im Falle eines verzweigten Substrates wurden die zwei bzw. drei nicht-radioaktiven Oligonukleotide in jeweils 3-fachem Überschuss zugegeben. Die Resuspension des

Pellets und die Durchmischung der Oligonukleotide erfolgte durch 2-minütiges Schütteln (*vortex*). Das Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  wurde in einem Eppendorf-Heizgerät 2 min auf 95°C erhitzt. Dann wurde das Heizgerät mit Aluminiumfolie abgedeckt und abgeschaltet. Der Hybridisierungsansatz verblieb ca. 5 Stunden bis Erreichen von RT im Heizgerät.

### **Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Substraten**

Die Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Substraten erfolgte durch Gelelektrophorese in 10%-igen (w/v), nativen PAA-Gelen. Durch dieses Verfahren konnten unvollständige Hybridisierungszwischenprodukte wie einzelsträngige DNA bzw. im Falle von X-DNA 2- und 3-Strang-Hybride vom gewünschten Endprodukt abgetrennt werden. Die Substratbande wurde durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht, ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit TBE mit 12 mM  $\text{MgCl}_2$  eluiert, wobei sich das Volumen des Lösungsmittels nach der im Gelstück gemessenen Radioaktivität, d.h. nach der Menge der  $^{32}\text{P}$ -markierten Substratmoleküle richtete (Messung im Szintillationszähler). Es wurde stets so gewählt, dass eine Lösung mit 0,5 bis 1 fmol Substrat/ $\mu\text{l}$  entstand. Die Elution erfolgte über einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C.

### **2.2.2.13. Untersuchung von Protein-DNA Wechselwirkungen**

#### **EMSA**

Standard-Reaktionen mit einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  beinhalteten 1 fmol eines radioaktiv markierten DNA-Substrates (0,1 nM; bei gleichzeitigem Einsatz der beiden verwendeten Doppelstrang-Substrate wurde eine äquimolare Mischung verwendet), wenn angegeben 5  $\mu\text{g}$  Poly[d(I-C)] als Kompetitor-DNA und bis zu 6  $\mu\text{l}$  einer zu testenden Proteinfraction bzw. eine definierte Menge an rekombinantem, gereinigtem Protein in DNA-Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 1mM DTT). Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert, mit 2  $\mu\text{l}$  EMSA-Probenpuffer (40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 mM EDTA, 0,1% (w/v) BPB, 25% (v/v) Glycerin) versetzt und mit Hilfe eines 8%-igen, nativen PAA-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem *Phosphorimager*.

### **Reaktionsbedingungen für die Endonuklease VII**

Standard-Reaktionen mit einem Volumen von 10 µl beinhalteten 1 fmol an radioaktiv markiertem X-DNA-Substrat CF110 (0,1 nM). Dieses wurde in Endo VII-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 19 mM β-Mercaptoethanol) mit oder ohne Crp1p<sup>aa1-263</sup> (1 Einheit, affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Matrix gereinigt) für 15 min bei RT vorinkubiert. Danach wurden 0,025 bis 20 ng Endonuklease VII des Bakteriophagen T4 (0,025 bis 20 ng) aus laboreigener Reinigung auf Eis zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde dann für weitere 15 min bei 30°C inkubiert, mit 2 µl EMSA-Probenpuffer (40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 mM EDTA, 0,1% (w/v) BPB, 25% (v/v) Glycerin) versetzt und mit Hilfe eines 8%-igen, nativen PAA-Gels, oder mit 2 µl denaturierendem Probenpuffer (88,8 % (v/v) Formamid, 0,1 % (w/v) BPB, 0,1 % (w/v) XC in TBE) versetzt und mit Hilfe eines 10%-igen, denaturierenden PAA-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem *Phosphorimager*.

### **Definition einer Einheit an X-DNA bindender Aktivität**

Als 1 Einheit wurde die Menge an X-DNA bindender Aktivität definiert, die 50% des in einem Standard-EMSA eingesetzten DNA-Substrates CF110 retardiert. Um die in einer Proteinlösung enthaltenen Einheiten zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe der Proteinlösung im Standard-Aktivitätstest eingesetzt. Die Substrat-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Für jede Spur wurde der Anteil an retardiertem Substrat von der Gesamtmenge an Substrat in der jeweiligen Spur bestimmt. Dazu wurden mit Hilfe des Computerprogramms TINA 2.08 der Firma raytest Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt, für jede Spur ein Sektor für freies und für retardiertes Substrat festgelegt und quantifiziert. Anhand eines Graphen (prozentualer Anteil an retardiertem Substrat gegen eingesetztes Volumen bzw. Proteinmenge) wurde der 50%-Wert (= 1 Einheit) extrapoliert.

### **Southwestern Technik**

Die *Southwestern* Technik dient der Analyse von membrangebundenen DNA-bindenden Proteinen. Zunächst wird ein *Western-blot* angefertigt, der anschließend mit radioaktiv markierter DNA inkubiert wird, um DNA-bindende Proteine zu detektieren. Voraussetzung für diese Methode ist, dass die Proteine ihre nativen Eigenschaften

behalten. Um dies zu erreichen, wurde das SDS-PAA-Gel vor dem *Western-blot* 1 h in CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol, durch Zugabe von NaOH auf pH 11 eingestellt) gebadet. Im gleichen Puffer erfolgte der *Western-Transfer* im Tanksystem auf 2 PVDF-Trägermembranen (Anoden- und Kathoden-Seite) der Firma Millipore, Eschborn. Alternativ erfolgte die Renaturierung bei rekombinanten Crp1p-Derivaten nach dem Transfer in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) durch Einlegen der Membran in DNA-Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 1mM DTT) für 1 h. Danach wurde in beiden Fällen das gleiche Protokoll angewandt. Zuerst wurde die Membran in DNA-Bindepuffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver eingelegt, dann 2 mal mit DNA-Bindepuffer gewaschen, und schließlich in 35 ml DNA-Bindepuffer mit 10 µg/ml gescherter Lachsspermien-DNA (Amersham Biosciences, Freiburg) getaumelt, um unspezifische DNA-Bindestellen abzusättigen. Nach 20 Min wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Substrat (Doppelstrang- oder X-DNA) auf eine Endkonzentration von 8,6 pM zugegeben und die Inkubation 1 h fortgeführt. Die Membran wurde 3 mal 8 min mit DNA-Bindepuffer gewaschen und 10 min trocknen gelassen. Radioaktive DNA, die an einzelnen Proteinbanden auf der Membran banden, wurde durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht.

#### 2.2.2.14. Konstruktion von Expressionsvektoren

##### Expressionsvektoren zur Verwendung in *E. coli*

Der Protein-Expressionsvektor pET-11a (Studier *et al.*, 1991) wurde so verändert, dass Crp1p- und Mdg1p-Derivate N- und C-terminal an eine Sequenz von sechs Histidinen (*His-Tag*) fusioniert werden konnte, um später eine unkomplizierte affinitätschromatographische Reinigung zu erlauben. Der modifizierte Vektor pET-11a-His-Tev wurde erzeugt, indem die DNA-Sequenz 5'-CAT ATG **AAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC** CCC ATG AGC GAT TAC GAC ATC CCC ACT ACT **GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC** CCG CGG GGA TCC GGA TCC-3' unter Verwendung der *NdeI* Schnittstelle und der *BamHI* Schnittstelle von pET-11a in diesen eingesetzt wurde. Der Bereich enthält Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) für *NdeI*, *SacII*, *KpnI* und *BamHI* (beginnend am 5'-Ende). Die Sequenz codiert für einen *His-Tag* (fett gedruckt), einen linker von 10 Aminosäuren und die Zielsequenz der Tev-Protease (fett und kursiv gedruckt). Die Restriktionsschnittstellen für *SacII* und *KpnI* wurden für die Klonierung

von *CRPI* und seiner Derivate mit *His-Tag* am N-Terminus verwendet (die jeweilige DNA-Sequenz trug am 3'-Ende ein Stop-Codon). Bei der Klonierung von *MDG1* und seinen Derivaten wurde analog verfahren, wobei statt der *KpnI*-Schnittstelle die *BamHI*-Schnittstelle verwendet wurde.

Vektor pET-11a-Thrombin-His ist ein Derivat von pET-11a-His-Tev. Er wurde erzeugt, indem die DNA-Sequenz 5'-***CTG GTT CCG CGA GCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA TGA GGT ACC***-3' an das 3'-Ende von *CRPI* (Basen 1-1395) fusioniert wurde. Der Bereich enthält Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) für *SacI* und *KpnI* (beginnend am 5'-Ende). Die Sequenz codiert für eine Thrombin-Schnittstelle (fett und kursiv gedruckt) und einen *His-Tag* (fett gedruckt), dem zwei Stop-Codons (kursiv gedruckt) folgen. Dieses Fragment wurde über eine *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende und die oben aufgeführte *KpnI*-Schnittstelle in den entsprechend geschnittenen Vektor pET-11a-His-Tev eingeführt. Ein fehlerhafter Sequenzbereich von pUR111 (pET11-a-Thrombin-His, der die Information für *CRPI*, Basen 1-1395, trägt) wurde in einem zweiten Klonierungsschritt berichtigt, indem der Bereich zwischen der geneigenen *BstBI*-Schnittstelle und der vektoreigenen *SacI*-Schnittstelle gegen ein entsprechendes PCR-Produkt ausgetauscht wurde (Primer: UR064, UR050). Über den verwendeten 5'-Primer wurde dabei eine geneigene *NheI*-Schnittstelle mutiert, um das Restriktionsmuster des berichtigten Vektors von dem des alten Vektors unterscheiden zu können. Diese Mutation in der DNA-Sequenz zieht als stille Mutation keinen Aminosäureaustausch nach sich.

### Mutagenese von Crp1p-Expressionsvektoren

Um zwischen Crp1p und Mdg1p konservierte positive Ladungen der X-DNA-Bindedomäne von Crp1p gegen Alanine auszutauschen, wurden das *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene, La Jolla, USA, nach den Herstellerangaben benutzt. Insgesamt wurden drei Veränderungen ausgehend von pUR126 (codiert für Crp1p<sup>aa1-160</sup>) vorgenommen. Je ein Primerpaar mit den gewünschten Veränderungen in der codierenden Sequenz wurde verwendet, um das Plasmid *in vitro* zu kopieren. Nach der Reaktion liegt die mutierte Plasmid-DNA unmethyliert, die Ursprungs-DNA methyliert vor. Methylierte DNA wurde mit *DpnI* abgebaut. Die erhalten gebliebene, mutierte DNA wurde in kommerzielle XL1-Blue Zellen transformiert und aus diesen präpariert. Für Mutation I, K129A und K130A,

wurden die Primer UR071 und UR072, für Mutation II, K132A und R133A, wurden die Primer UR073 und UR074, für Mutation III, K137A und R138A, wurden die Primer UR075 und UR076 verwendet.

### **Expressionsvektoren für verschiedene rekombinante Zielproteine zur Verwendung in *S. cerevisiae***

Für die plasmidgesteuerte Co-Expression zweier Proteine in Hefe wurden zwei Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Auxotrophiemarkern benötigt. Der Protein-Expressionsvektor pJD-CEX1 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. J. Dohmen, Institut für Genetik, Universität zu Köln) erlaubt die Expression von Zielproteinen vom CUP1-Promotor. Er wurde auf der Basis von YEplac181 (Gietz & Sugino, 1988) hergestellt, indem der Bereich des Vektors zwischen der *Hind*III-Schnittstelle und der *Nar*I Schnittstelle durch ein konstruiertes Fragment ausgetauscht wurde. Dieses enthielt den CUP1-Promotor und CYC1-Terminator, getrennt von einem Bereich mit Schnittstellen für *Eco*RI, *Xba*I, *Bam*HI, *Sma*I und *Kpn*I für das Einklonieren von Fremd-DNA (dieser Klonierungsschritt zerstörte die *Nar*I-Schnittstelle durch Verwendung eines kompatiblen *Cl*aI-Überhangs am einklonierten Fragment). Es entstand ein Vektor zur konstitutiven Expression von Proteinen unter  $P_{CUP1}$ . Der Vektor trägt den Auxotrophiemarker *LEU2* und wird zur Unterscheidung im Folgenden pJD-CEX1-LEU genannt. Um einen alternativen Vektor mit dem Auxotrophiemarker *TRP1* zu konstruieren, wurden pJD-CEX1-LEU und YEplac112 (Gietz & Sugino, 1988) mit *Nsi*I und *Sph*I geschnitten und das  $P_{CUP1}$  enthaltende Fragment in das *TRP1* enthaltende Fragment von YEplac112 ligiert. Daraus ergab sich der Vektor pJD-CEX1-TRP. Beide pJD-CEX1-Derivate sind bis auf das jeweilige Markergen identisch (Ampicillinresistenz für die Vermehrung in *E. coli*).

Zur Konstruktion von pJD-CEX1-TRP-Crp1p<sup>aa1-160</sup> wurde von pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit den Primern UR089 und UR090 ein PCR-Produkt erzeugt, das die folgenden Elemente in der angegebenen Reihenfolge codierte: *Xba*I-Restriktionsschnittstelle, ATG-Startcodon, c-Myc-Epitopmarkierung (kopiert aus pGBKT7), *Nde*I- und *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen, Basen 1-480 von *CRP1*, TGA-Stop-Codon, *Sal*I- und *Pst*I-Restriktionsschnittstelle, TGA-Stop-Codon, *Xma*I-Restriktionsschnittstelle. Dieses Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen für *Xba*I und *Xma*I in pJD-CEX1-

TRP inseriert. Das resultierende Plasmid erlaubte die konstitutive Expression von Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit N-terminaler c-Myc-Epitopmarkierung in *S. cerevisiae*.

Zur Konstruktion von pJD-CEX1-LEU-Egt2p wurde zunächst das Gen *EGT2* mit den Primern UR081 und UR083 aus genomischer *S. cerevisiae* DNA amplifiziert (kommerzielle DNA-Präparation von Promega, Mannheim). Das Produkt diente als Matrize für eine zweite Amplifikation des Gens mit den Primern UR082 und UR084, bei der durch einen Überhang am 3'-Primer die codierende Sequenz für eine HA-Epitopmarkierung eingeführt wurde. Es entstand ein Produkt, das die folgenden Elemente in der angegebenen Reihenfolge codierte: *Xba*I- und *Sac*II-Restriktionsschnittstellen, das komplette Gen *EGT2*, *Pst*I-Restriktionsschnittstelle, HA-Epitopmarkierung, TGA-Stop-Codon, *Xma*I-Restriktionsschnittstelle. Dieses Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen für *Xba*I und *Xma*I in pJD-CEX1-LEU inseriert. Das resultierende Plasmid erlaubte die konstitutive Expression von Egt2p mit C-terminaler HA-Epitopmarkierung in *S. cerevisiae*. Weiterhin diente es als Basis für die Klonierung von *GNO1* und der Genfragmente *EGT2*, Basen 1 bis 3003, *EGT2*, Basen 40 bis 855, *DRS1*, Basen 1612 bis 2256. Die Insertion entsprechender PCR-Produkte erfolgte jeweils mittels der Restriktionsschnittstellen für *Sac*II und *Pst*I unter Beibehaltung der HA-Epitopmarkierung. Die resultierenden Plasmide wurden entsprechend pJD-CEX1-LEU-Gno1p, pJD-CEX1-LEU-Egt2p<sup>aa1-1001</sup>, pJD-CEX1-LEU-Egt2p<sup>aa14-285</sup> und pJD-CEX1-LEU-Drs1p<sup>aa538-752</sup> genannt (vgl. Tabelle 4).

### 2.2.3. Methoden der Hefegenetik

#### 2.2.3.1. Deletion und Modifikation von Hefegenen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen *CRP1* in verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen deletiert. Zusätzlich wurden codierende Sequenzen für eine C-terminale c-Myc-Epitopmarkierung bzw. eine N-terminale Fusion mit *Aequorea victoria* GFP an die Gensequenz von *CRP1* fusioniert. Im Falle der N-terminalen Modifikation wurde zusätzlich der geneigene Promotor gegen den GAL1-Promotor getauscht, was eine spätere Induktion der Transkription durch Galaktose erlaubt. Diese Veränderungen am Genom wurden nach der Methode von Rothstein vorgenommen (Rothstein, 1983). Dazu wurden PCR-Fragmente mit codierenden Sequenzen für einen selektierbaren Marker (das *his5+* Gen von *S. pombe*), wahlweise der Epitopmarkierung/GFP und homologen

Sequenzen zu der gewünschten Insertionsstelle generiert. Die homologen Sequenzen (45 Nukleotide) bildeten dabei 5'-Überhänge an bereits festgelegten Primern für die Amplifikation der Marker- bzw. Epitopsequenzen von den in Tabelle 9 aufgeführten Plasmid-Modulen (Longtine *et al.*, 1998). Die PCR-Fragmente wurden in Zellen des gewünschten Stammes transformiert, wo sie durch homologe Rekombination *in vivo* in das Genom integrieren und die ursprünglich zwischen den Insertionssequenzen liegenden Bereich deletieren.

**Tabelle 9: Stämme mit Deletion oder Modifikation von *CRP1*.**

Stamm	Modifikation	Primer 1	Primer 2	Plasmid
<i>crp1Δ</i>	<i>crp1</i>	UR021-F1	UR023-R1	pFA6A-His3MX6
URY13	<i>crp1</i>	UR021-F1	UR023-R1	pFA6A-His3MX6
URY24	GFP- <i>CRP1</i>	UR025-F4	UR024-R5	pFA6A-His3MX6-PGAL1-GFP
URY34	<i>CRP1</i> -13Myc	UR022-F2	UR023-R1	pFA6A-13Myc-His3MX6

Die Deletionen bzw. die aufgeführten Modifikationen wurden durch PCR-Produkte, die mit den aufgeführten Primern von den nebenstehenden Plasmiden amplifiziert wurden, vermittelt.

Die erfolgreiche Integration des PCR-Fragmentes wurde durch Selektion mittels des eingebrachten Markers und die korrekte Integration am Ziellokus mittels analytischer PCR geprüft. Dazu wurden die Primer UR-I1 und UR-O1 (im Falle der Deletionen) bzw. UR-O1 und UR-O3 (im Falle von Epitopmarkierung/GFP) verwendet (vgl. Seite 55). Von ihnen hybridisierte jeweils einer in der Peripherie des Ziellokus und der andere an einer nur im veränderten Lokus vorkommenden Sequenz. Die Möglichkeit, auf diese Weise ein analytisches PCR-Produkt voraussagbarer Größe zu erzeugen, welches sich im Ausgangsstamm nicht herstellen lässt, bestätigte die erfolgreiche Deletion oder Modifikation. Als Ausgangsmaterial für eine diagnostische PCR diente 1 µl einer genomischen DNA-Lösung, die aus dem zu testenden Stamm extrahiert wurde.

### 2.2.3.2. Phänotypische Analysen der Hefe

#### Sporulation und Lebensfähigkeit von Sporen

Der diploide *S. cerevisiae* Stamm BY4743 wurde wie beschrieben zur Sporulation gebracht (Brachmann *et al.*, 1998). Dabei wurden folgende Änderungen vorgenommen: Der Stamm wurde als Ausstrich über Nacht bei 30°C auf einer frischen GNA-Platte inkubiert, ein zweites Mal auf eine frische GNA-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von diesem Ausstrich wurde eine streichholzkopfgröße Zellmasse in 2 ml Sporulationsmedium übertragen und zunächst 5 Tage bei 25°C und dann 3 Tage

bei 30°C und 175 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Die Flüssigkultur wurde dann bis zur weiteren Verwendung, aber nicht länger als eine Woche, bei 4°C aufbewahrt.

Die Asci und Zellen der sporulierten Kultur wurden 2 mal mit H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> gewaschen und im Originalvolumen an H<sub>2</sub>O<sup>mp</sup> resuspendiert. 100 µl wurden mit 1 µl β-Glukuronidase/Arylsulfatase-Lösung aus *Helix pomatia* der Firma Roche, Mannheim, versetzt und 5 bis 12 Minuten bei RT inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 30 µl auf eine YPDA-Platte gebracht und einzelne Tetraden unter einem Mikroskop (Zeiss, Jena) nach Standardmethode (Burke *et al.*, 2000) mit Hilfe einer Mikronadel in die vier haploiden Sporen zerlegt. Die Keimung der Sporklone erfolgte bei Inkubation bei 30°C. Nach 2 Tagen zeigte sich Lebensfähigkeit einer Spore durch Bildung einer Kolonie.

### **Test zur Röntgenstrahlungstoleranz**

15 ml Zellsuspension des gewünschten Stammes mit einer photometrisch bestimmten optischen Dichte von 1 bei 600 nm (entspricht je nach Stamm 1-2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden abzentrifugiert und in frischem YPDA-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in sterile 60 x 15 mm Petrischalen gegeben und einer Röntgenquelle ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte bei Verwendung eines 0,5 mm Aluminiumfilters und einer Spannung von 120 KV. Vor Bestrahlung und nach Verabreichung der gewünschten Dosen (bis 2000 Gy) wurde je 1 ml Kultur entnommen, in geeignetem Maße verdünnt, und je 100 µl dreifach auf YPDA-Platten ausplattiert. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien gezählt, die Dreifachwerte gemittelt und als Prozentsatz der von der unbestrahlten Kultur erzeugten Kolonienzahl graphisch dargestellt.

### **Test zur UV-Strahlungstoleranz**

5 ml Zellsuspension des gewünschten Stammes mit einer photometrisch bestimmten optischen Dichte von 1 bei 600 nm (entspricht je nach Stamm 1-2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden abzentrifugiert und in frischem YPDA-Medium resuspendiert. 100 µl geeigneter Verdünnungen wurden auf YPDA-Platten ausplattiert und die offenen Schalen in einen Stratagene Crosslinker gestellt. Mit diesem wurden Energiedosen von 30, 60 und 90 J/m<sup>2</sup> verabreicht. Danach wurden die Platten bei Gelblicht mit Deckel versehen und mit Aluminiumfolie umwickelt, um nicht das Photoreparatursystem der Hefe zu aktivieren. Nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien

gezählt, die Dreifachwerte gemittelt und als Prozentsatz der von der unbestrahlten Kultur erzeugten Kolonienzahl graphisch dargestellt.

### **Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von Crp1p**

Zellen, die Crp1p als Fusionsprotein mit GFP exprimierten (Stamm URY24) wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Typ Axioplan 2 der Firma Zeiss, Jena) untersucht. Zur Anregung der Fluoreszenz wurden die Zellen mit Licht der Wellenlänge 480 nm bestrahlt. Dadurch kommt es zur Emission von Licht der Wellenlänge 510 nm durch GFP. Die Dokumentation erfolgte bei 100-facher Vergrößerung mit einer Photometrics Quantix Digitalkamera der Firma Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, und mit Hilfe des Computerprogramms MetaMorph 4,5 der Universal Imaging Corporation, Downingtown, USA.

### **3. Ergebnisse**

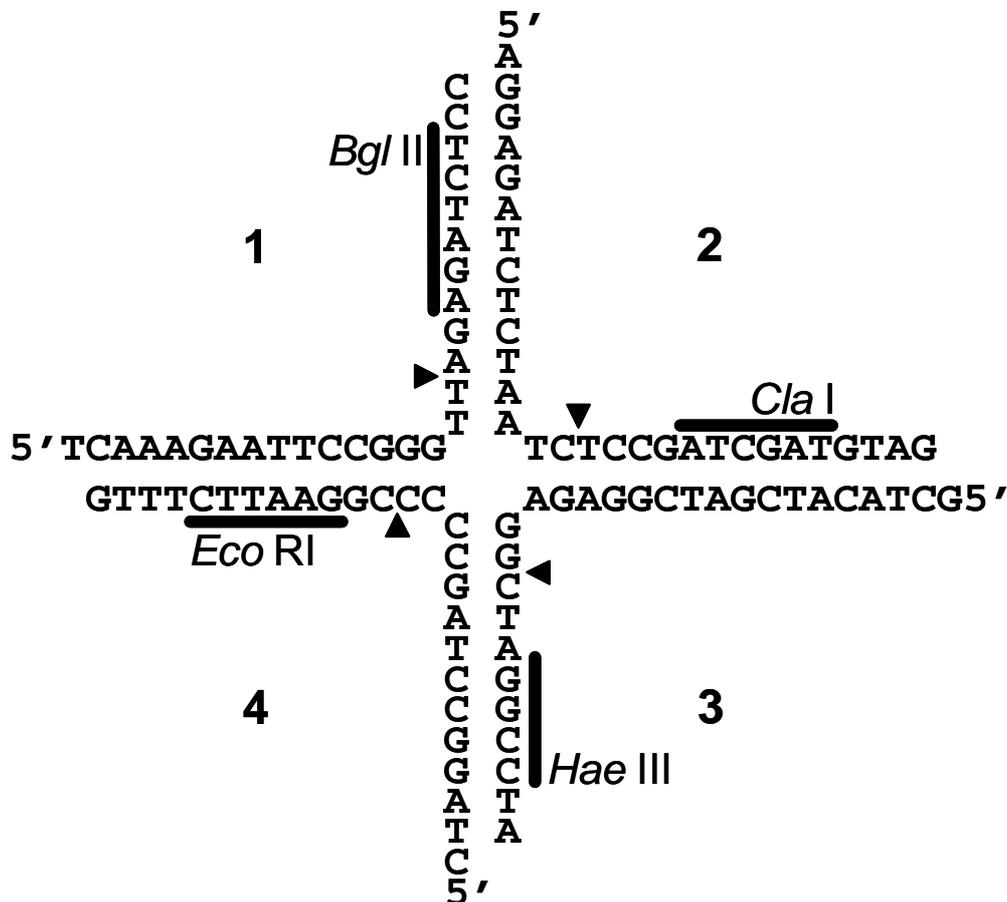
#### **3.1. Identifizierung von Crp1p**

Da bereits bekannt war, dass die in fraktionierten Hefe-Extrakten beobachtete X-DNA bindende Aktivität nicht zu den stark repräsentierten Proteinen gehörte, wurden zwei Strategien verfolgt, um das Urheberprotein zu isolieren. Zum einen wurden bei erneuten Proteinreinigungen größere Mengen an Ausgangsmaterial verarbeitet, um am Ende der Prozedur unterrepräsentierte Proteine nachweisen und möglicherweise eine Proteinbande auf SDS-PAA-Gelen mit der Verteilung der in EMSAs beobachteten Aktivität korrelieren zu können. Zum anderen wurde versucht, die Molekülmasse des gesuchten Proteins zu ermitteln, um den Kandidatenkreis einzugrenzen.

##### **3.1.1. Chromatographische Reinigung der X-DNA bindenden Aktivität**

Die Reinigung der X-DNA bindenden Aktivität erfolgte durch eine Serie von Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatographien. Nach einer Chromatographie wurden 150- bis 500 µl-Proben repräsentativer Fraktionen gegen Puffer B mit einer KCl-Konzentration von 100 mM dialysiert und in EMSA-Analysen (vgl. Seite 50) mit dem X-DNA-Substrat CF110 (Abbildung 7) auf die Anwesenheit von X-DNA bindender Aktivität überprüft. Aktive Fraktionen wurden jeweils vereinigt und einer Dialyse gegen den Ladepuffer der nächsten Chromatographie-Säule unterzogen. Der Ablauf der Proteinreinigung richtete sich im Wesentlichen nach dem in meiner Diplomarbeit erarbeiteten Protokoll. Eine schematische Darstellung der Reinigung unter Angabe der verwendeten Trennmedien, der angelegten Salzgradienten zur Elution gebundenen Proteins und der typischerweise erzielten Reinigungsfaktoren ist in Abbildung 8a dargestellt. Der Reinigungsfaktor gibt die Zunahme an spezifischer Aktivität an. (Einheiten X-DNA bindender Aktivität pro mg Gesamtprotein einer Fraktion; für die Definition einer Einheit vgl. Seite 51). Technische Details zum Chromatographiematerial und der Vorgehensweise finden sich im Abschnitt Material und Methoden ab Seite 45. Einzelne Chromatographie-Säulen wurden ihrer jeweiligen Kapazität entsprechend mit Extrakt beladen. Überstieg die Menge an zu fraktionierendem Gesamtprotein die Kapazität einer Säule, erfolgte die Fraktionierung in mehreren Wiederholungsläufen mit anschließender Vereinigung der ausgewählten Fraktionen aller Läufe. Die EMSA-Analysen von Fraktionen einer MonoS- und einer Heparin-Sepharose-Chromatographie sind exemplarisch in Abbildung 8b und c

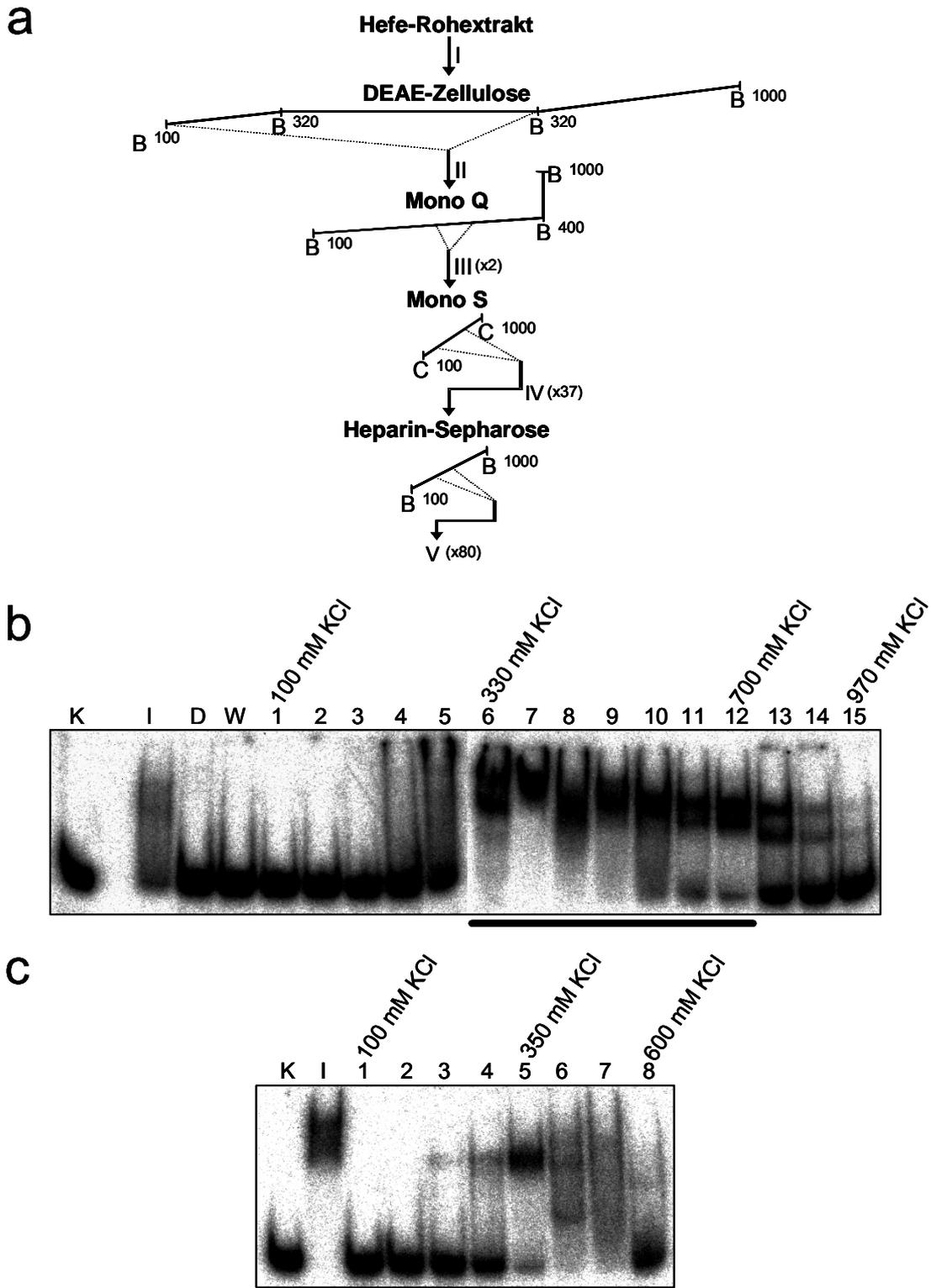
dargestellt. Beim Einsatz dieser Trennmedien wurde der höchste Reinigungsfaktor erzielt, nämlich 37 bzw. 80 bezüglich der Gesamtprozedur und 18,5 bzw. 2,16 bezüglich aufeinander folgender Reinigungsschritte.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des X-DNA-Substrats CF110.**

Gezeigt ist die Sequenz des aus vier synthetischen Oligonukleotiden (1 bis 4) hergestellten X-DNA Substrats CF110. Oligonukleotid 1 trug eine  $^{32}\text{P}$ -Markierung am 5'-Ende. Die Pfeile markieren Schnittstellen der X-Solvase Endonuklease VII des Bakteriophagen T4, die Balken Restriktionsschnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme. Diese Schnittstellen können zur Charakterisierung der Substrateigenschaften verwendet werden (vgl. Seite 21). CF110 gleicht strukturell dem Kreuzungspunkt einer Holliday-Struktur. Auf Sequenzebene unterscheidet sie sich darin, dass die Arme keine homologen Sequenzen aufweisen. Dadurch ist der Kreuzungspunkt an einer definierten Stelle fixiert.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über eine typische Proteinreinigung gegeben werden. Dabei wurde auf die Darstellung vollständiger Elutionsprofile verzichtet. Vergleichbare Elutionsprofile können in der bereits erwähnten Diplomarbeit eingesehen werden (Rass, 1999, darin Abbildungen 25, 27, 29 und 31).



**Abbildung 8: Reinigungsschema und EMSA-Analyse der X-DNA bindenden Aktivität.**

(a) Schematische Darstellung der Proteinfractionierung zur Reinigung der X-DNA bindenden Aktivität aus Hefe-Extrakten. Die Salzgradienten zur Elution von Protein von den angegebenen Trennmedien sind als durchgehende Linien dargestellt. Die verwendeten Puffer (B oder C) sind mit den jeweiligen KCl-Konzentrationen (mM) als Indizes angegeben. Der jeweilige Elutionsbereich der X-DNA bindenden Aktivität ist durch gestrichelte Linien markiert. Die Vereinigung der in diesem Bereich liegenden Fraktionen ergab die mit römischen Zahlen gekennzeichneten Proteinfractionen. Der Reinigungsfaktor (x-fach) bezieht sich auf die Steigerung an spezifischer Aktivität (Einheiten pro mg Gesamtprotein) in Relation zu Fraktion II.

Die EMSA-Analysen von Fraktionen einer MonoS- **(b)** und einer Heparin-Sepharose-Chromatographie **(c)** sind exemplarisch für einen typischen Reinigungsverlauf dargestellt. Das X-DNA-Substrat CF110 (0,1 nM) wurde in Anwesenheit der Kompetitor-DNA Poly[d(I-C)] (5 µg) je ohne Protein (Kontrollspur K), mit 6 µl des *Inputs* (I), des Durchflusses (D), des Wasch (W) oder der mit Nummern angegebenen Fraktionen unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Die Kontrollspuren zeigen das Laufverhalten des freien X-DNA-Substrats. Im *Input* und den Fraktionen I und 4 bis 15 der MonoS-Chromatographie sowie 3 bis 8 der Heparin-Sepharose-Chromatographie konnte durch die Retardierung des Substrats X-DNA bindende Aktivität nachgewiesen werden. Die angegebenen Salzkonzentrationen beziehen sich auf den Elutionszeitpunkt der jeweiligen Fraktion. Im vorliegenden Fall wurden die mit Balken gekennzeichneten Elutionsbereiche (bei 330 bis 700 mM bzw. 350 bis 600 mM KCl) zu den Fraktionen IV bzw. V vereinigt.

---

Zellen des *S. cerevisiae* Stammes RS190 wurden mechanisch aufgeschlossen und der Rohextrakt als Überstand einer Ultrazentrifugation gewonnen. Diese Fraktion I wurde einer DEAE-Zellulose Chromatographie unterzogen, um zelluläre DNA von den Proteinkomponenten abzutrennen. Die Beladung der Chromatographie-Säule mit einem Säulenvolumen von etwa 100 ml erfolgte bei einer KCl-Konzentration von 100 mM. Gebundenes Protein wurde durch lineares Erhöhen der KCl-Konzentration auf 320 mM über 30 ml Puffervolumen und Halten dieser KCl-Konzentration für weitere 65 ml eluiert. Eine weitere Erhöhung der KCl-Konzentration auf 1000 mM über 50 ml Puffervolumen führte zur Elution der gebundenen DNA. Die X-DNA bindende Aktivität eluierte bei KCl-Konzentrationen zwischen 110 und 320 mM. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, als Fraktion II bezeichnet und einer MonoQ Anionenaustauscherchromatographie unterzogen.

Die Beladung der MonoQ Säule mit einem Säulenvolumen von 8 ml erfolgte bei einer KCl-Konzentration von 100 mM. Gebundenes Protein wurde durch lineares Erhöhen der KCl-Konzentration auf 400 mM über 60 ml Puffervolumen und einer Stufe auf 1000 mM KCl eluiert. Die X-DNA bindende Aktivität eluierte bei KCl-Konzentrationen zwischen 280 und 300 mM. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, als Fraktion III bezeichnet und einer MonoS Kationenaustauscherchromatographie unterzogen. Die Beladung der Säule mit einem Säulenvolumen von 8 ml erfolgte bei einer KCl-Konzentration von 100 mM. Gebundenes Protein wurde durch lineares Erhöhen der KCl-Konzentration auf 1000 mM über 16 ml Puffervolumen eluiert. Die X-DNA bindende Aktivität eluierte bei KCl-Konzentrationen zwischen 280 und 700 mM. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, als Fraktion IV bezeichnet und einer Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie unterzogen. Die Beladung der Säule mit einem Säulenvolumen von 5 ml erfolgte bei einer KCl-Konzentration von 100 mM.

Gebundenes Protein wurde durch lineares Erhöhen der KCl-Konzentration auf 1000 mM über 20 ml Puffervolumen eluiert. Die X-DNA bindende Aktivität eluierte bei KCl-Konzentrationen zwischen 350 und 600 mM. Die Summe der aktiven Fraktionen ergab Fraktion V. Diese war das Endprodukt der Proteinreinigung. Die Vorgehensweise erlaubte routinemäßig eine mehr als 80-fache Anreicherung der X-DNA bindenden Aktivität (Rass, 1999). Änderungen des Originalprotokolls ergaben sich vor allem aus der Absicht, mehr Gesamtprotein durch den Reinigungsprozess zu schleusen. So wurde z.B. in einigen Fällen bei der MonoS-Chromatographie die KCl-Konzentration im Ladepuffer auf 200 mM erhöht. Dadurch erhöhte sich der Anteil an durchlaufendem Protein bei gleichzeitiger Bindung der X-DNA bindenden Aktivität, so dass ein größeres Fraktionsvolumen verarbeitet werden konnte, ohne die Kapazität der Säule zu überschreiten. Weiterhin änderten sich die Elutionsbereiche der X-DNA bindenden Aktivität mit der eingesetzten Menge an Gesamtprotein und wurden jeweils neu bestimmt. Da mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, wurde der zu vereinigende, Aktivität zeigende Elutionsbereich bei den einzelnen Chromatographieschritten enger gewählt, um insgesamt die spezifische Aktivität zu erhöhen.

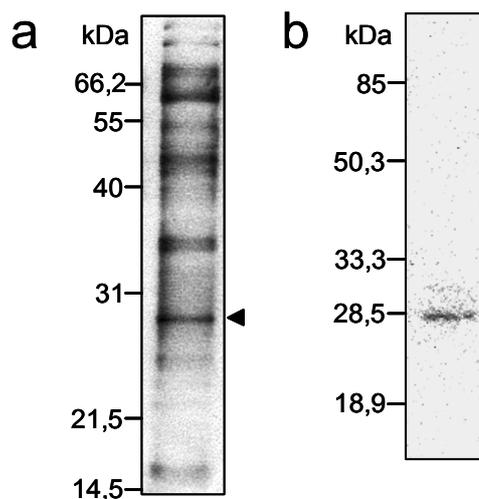
Obwohl die Proteinfractionierung reproduzierbar zur Anreicherung der X-DNA bindenden Aktivität führte, konnte zunächst keine mit der Verteilung der Aktivität korrelierende Proteinbande auf SDS-PAA-Gelen identifiziert werden. Deshalb wurde versucht, über die Bestimmung der Molekülmasse der Aktivität die Lage des entsprechenden Proteins auf einem SDS-PAA-Gel zu ermitteln.

### **3.1.2. Bestimmung der relativen Molekülmasse des X-DNA bindenden Proteins**

Zunächst wurde versucht, die Molekülmasse der X-DNA bindenden Aktivität mittels Gelfiltration und anschließender EMSA-Analyse der einzelnen Proteinfractionen zu ermitteln. Dieser Ansatz scheiterte jedoch an der starken Verdünnung der Aktivität während der Prozedur.

Deshalb wurde als Alternative die *Southwestern* Technik (vgl. Seite 51) angewendet. Sie erlaubt die Analyse von DNA-bindenden Proteinen nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Immobilisierung auf einer Membran. Im Falle einer Bindungsreaktion zwischen dem gesuchten Protein und einem radioaktiv

markierten DNA-Substrat, kann die relative Molekülmasse des gesuchten Proteins bestimmt werden. In einer Testreihe wurde zunächst die Praktikabilität zum Nachweis von X-DNA-Bindung geprüft. Dabei sollte geklärt werden, ob eine Detektion von X-DNA bindender Aktivität bei Einsatz des Substrates CF110 mit gescherter Lachsspermien-DNA als Kompetitor möglich war. Untersuchungen mit Fraktion V, dem Endprodukt der oben beschriebenen Proteinreinigung, zeigten, dass sich ein reproduzierbares Signal gewinnen ließ. Dazu wurden ca. 15 µg Gesamtprotein je Spur auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in CAPS-Puffer gebadet, um eine Renaturierung der enthaltenen Proteine zu erreichen und damit bessere Bedingungen für die folgende Protein-DNA Bindereaktion zu schaffen. Dieser Puffer wurde auch für den anschließenden Transfer auf PVDF-Membran verwendet. Da er kein Glycin enthält, war später eine Übertragung des Protokolls für eine Sequenzanalyse von Kandidatenproteinen möglich.



**Abbildung 9: Nachweis der X-DNA bindenden Aktivität mit Hilfe der Southwestern Technik.**

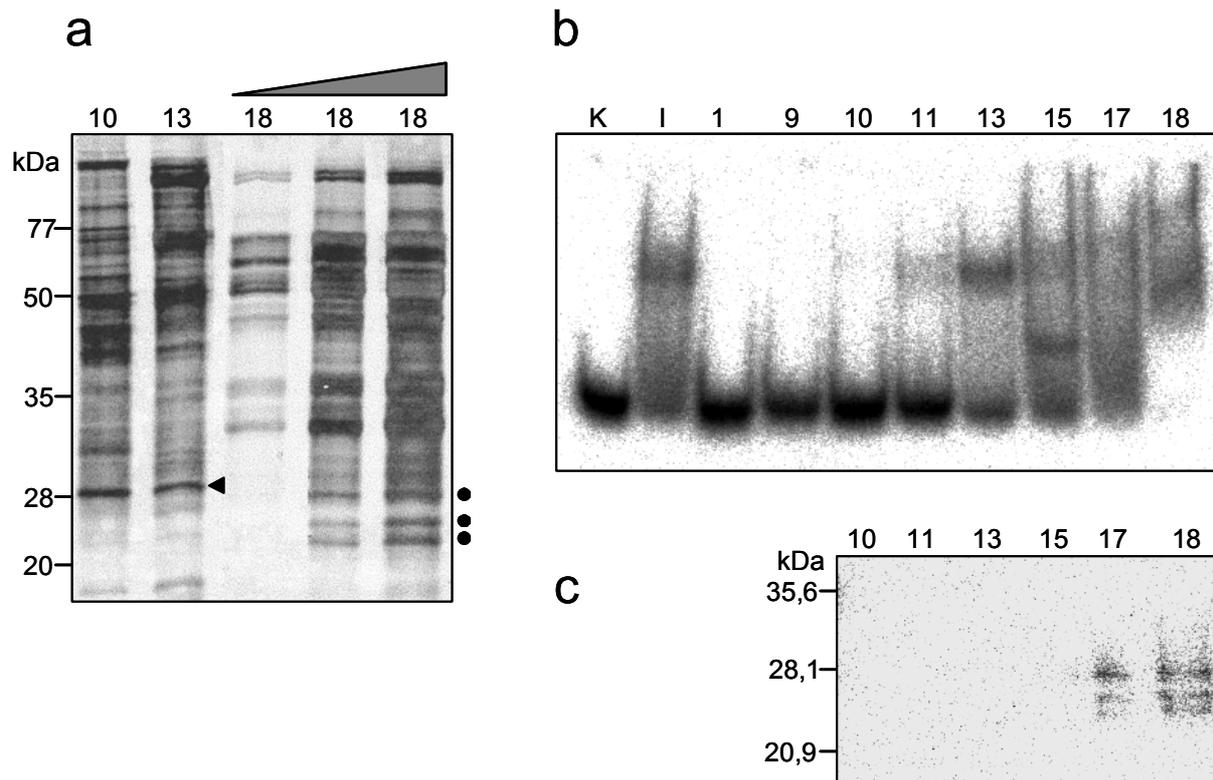
(a) 5 µg Gesamtprotein von Fraktion IV wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber gefärbt. (b) 15 µg Gesamtprotein von Fraktion IV wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Das membrangebundene Protein wurde in Anwesenheit von Lachsspermien-Kompetitor-DNA (10 µg/ml) mit dem X-DNA Substrat CF110 (8,6 pM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch *Phosphorimaging*. Die Laufweiten und Molekülmassen der jeweils verwendeten Molekulargewichtsmarker sind angegeben. Der schwarze Pfeil in (a) markiert ein Protein ähnlicher Laufweite wie das Signal gebende Protein in (b). Dieses Protein wurde als Pnc1p identifiziert (siehe Text).

Nach dem Transfer wurde die Membran in 35 ml DNA-Bindepuffer, der auch als Reaktionspuffer für die EMSA-Analysen diente, mit radioaktiv markierter X- oder linear doppelsträngiger DNA als Kontrolle (je ca. 8,6 pM) in Anwesenheit gescherter

Lachsspermien-Kompetitor-DNA (10 µg/ml) inkubiert. Dieses Verhältnis von DNA-Substrat zu Lachsspermien-DNA entspricht etwa einem 20.000-fachen Überschuss an Kompetitor-DNA.

Die Analyse der Membran mittels *Phosphorimaging* ergab, dass mehrere Banden bei etwa 24, 26 und 28 kDa radioaktiv markiert waren, wobei in einigen Fällen nur das Hauptsignal bei 28 kDa erschien (Abbildung 9). Die Signal gebenden Proteine wanderten unter diesen Bedingungen beim Proteintransfer zur Anode. Membranen auf der Katoden-Seite lieferten keine Signale. Die Bindung der X-DNA war spezifisch, da Kontrollexperimente mit linear doppelsträngiger DNA keine Signale ergaben (nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte abgeleitet werden, dass ein Protein alleine, nicht etwa ein Proteinkomplex, die X-DNA bindende Aktivität ausübte. Nach Vergleich mit entsprechenden, mit Silbernitrat gefärbten SDS-PAA-Gelen, konnte eine Bande ähnlicher Laufweite ausfindig gemacht werden. Diese Bande konnte allerdings nur in Fraktion IV, also dem *Input*, und nicht in Fraktion V, dem Ergebnis der Heparin-Sepharose-Chromatographie nachgewiesen werden (Abbildung 9a, b). Dies erschien schlüssig, da trotz der Zunahme der spezifischen Aktivität die Aktivitätskonzentration von Fraktion IV nach V sinkt (vgl. Abbildung 8c, Spuren I und 3 bis 8). Die in Abbildung 9a mit einem Pfeil markierte Bande wurde präpariert und das enthaltene Protein sequenziert. Es handelte sich um Pnc1p, die Nicotinamidase der Hefe. Dieses Enzym katalysiert eine Umsetzung (Nicotinsäureamid zu Nicotinsäure) im zellulären Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Matabolismus und war als unwahrscheinlicher Kandidat für die gesuchte Aktivität einzustufen.

Da der Verdacht nahe lag, dass das gesuchte X-DNA bindende Protein von Pnc1p überlagert wurde, wurden noch einmal Fraktionen der Heparin-Sepharose-Chromatographie untersucht. Es zeigte sich, dass dieser chromatographische Schritt Pnc1p von der Aktivität trennte. In Abbildung 10 ist die Verteilung von Pnc1p in Fraktionen steigender spezifischer X-DNA bindender Aktivität dargestellt. Der Gehalt an Pnc1p nimmt von Fraktionen 10 nach 18 ab (Abbildung 10a), während die spezifische Aktivität zunimmt (EMSA mit gleichem Gesamtproteingehalt je Spur; Abbildung 10b). Beim Auftragen steigender Proteinkonzentration wurden schließlich Banden sichtbar, die gut mit den Signalen eines entsprechenden *Southwestern-blot* korrelierten (in Abbildung 10a, c mit Punkten markiert).

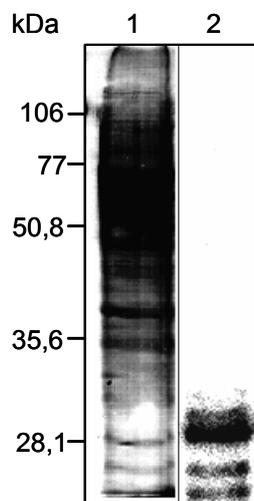


**Abbildung 10: Nachweis möglicher X-DNA bindender Proteine in Heparin-Sepharose Fraktionen.**

**(a)** Fraktionen einer Heparin-Sepharose-Chromatographie wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Die ersten drei Spuren enthielten je 2 µg Gesamtprotein der Fraktionen 10, 13 bzw. 18. Die nächsten beiden Spuren enthielten 6 bzw. 10 µg der Fraktion 18. Mit steigender Proteinmenge werden 3 Proteinbanden in Fraktion 18 sichtbar, die in ihrer Laufweite den Signalbanden einer vergleichbaren *Southwestern*-Analyse entsprechen (in (a) und (c) mit Punkten gekennzeichnet). Diese Proteinbanden werden durch die Heparin-Sepharose-Chromatographie von Pnc1p (mit einem Pfeil markiert) getrennt. Die Laufweiten und Molekülmassen der verwendeten Molekulargewichtsmarker sind angegeben. **(b)** EMSA-Analyse der Heparin-Sepharose-Fractionen. Das X-DNA-Substrat CF110 (0,1 nM) wurde in Anwesenheit der Kompetitor-DNA Poly[d(I-C)] (5 µg) ohne Protein (Kontrollspur K) und mit je 5 µg Gesamtprotein des *Inputs* (I) bzw. der mit Nummern angegebenen Fraktionen unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Fraktion 18 weist die höchste spezifische Aktivität auf. **(c)** *Southwestern*-Analyse der Heparin-Sepharose-Fractionen. Je 15 µg Gesamtprotein der angegebenen Fraktionen wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Das membrangebundene Protein wurde in Anwesenheit von Lachsspermien-Kompetitor-DNA (10 µg/ml) mit dem X-DNA Substrat CF110 (8,6 pM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch *Phosphorimaging*. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. In Fraktionen 17 und 18 finden sich Signalbanden bei 24, 26 und 28 kDa (mit Punkten gekennzeichnet). Das stärkste Signal ist in Fraktion 18 zu sehen, welche auch in der EMSA-Analyse die höchste spezifische Aktivität aufwies.

### 3.1.3. Identifizierung des X-DNA bindenden Proteins als Yhr146wp

Um genügend Ausgangsmaterial für eine Sequenzanalyse der durch *Southwestern*-Analyse ermittelten Proteine mit apparenten Molekulargewichten von etwa 24, 26 und 28 kDa bereitzustellen, wurde eine chromatographische Reinigung im Großmaßstab durchgeführt. Im Vergleich zum Standardprotokoll wurde Extrakt aus der 5-fachen Zellmenge fraktioniert (340 statt 68 g). Fraktion IV wies das gleiche Volumen auf wie im Falle des Standardprotokolls, gleichzeitig aber die 10-fache Menge an Gesamtprotein. Nach der Heparin-Sepharose-Chromatographie wurden die Fraktionen höchster spezifischer Aktivität ermittelt, 10-fach konzentriert, mit bis zu 100 µg Gesamtprotein pro Präparation über ein SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit einem entsprechenden *Southwestern-blot* verglichen (Abbildung 11). Um die in den Signal gebenden Banden enthaltenen Proteine zu identifizieren, wurden zwei Strategien verfolgt. Zuerst wurde die N-terminale Sequenzierung versucht, dann die massenspektrometrische Analyse von Peptidmassen nach tryptischem Verdau, das sog. *peptide mass fingerprinting* und die massenspektrometrische Sequenzanalyse einzelner tryptischer Peptide.



**Abbildung 11: Nachweis und Präparation möglicher X-DNA bindender Proteine.**

20 µg Gesamtprotein von Fraktion V einer Proteinreinigung im Großmaßstab (Extrakt aus 340 g Zellmaterial) wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (Spur 1) oder auf PVDF-Membran übertragen und einer *Southwestern*-Analyse unterzogen (Spur 2). Dazu wurde das membrangebundene Protein in Anwesenheit von Lachsspermien-Kompetitor-DNA (10 µg/ml) mit dem X-DNA Substrat CF110 (8,6 pM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch *Phosphorimaging*. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. Die mit den *Southwestern*-Signalen übereinstimmenden Proteinbanden wurden für eine Sequenzanalyse präpariert.

**N-terminale Sequenzanalyse.** Die in Abbildung 11 zu sehenden Signal gebenden Banden wurden in einem parallelen Ansatz auf PVDF-Membran transferiert, mit Ponceau S angefärbt und ausgeschnitten. Die membrangebundenen, isolierten Proben erwiesen sich jedoch als unzugänglich für den Edmanschen Abbau, was auf eine N-terminale Acetylierung schließen lässt.

**Analyse des tryptischen Peptidmassenspektrums.** Eine Alternative zum Edmanschen Abbau bei der Identifikation von Proteinen bietet das *peptid mass fingerprinting*. Zu untersuchende Proteine werden z.B. durch Trypsinbehandlung proteolytisch gespalten. Trypsin spaltet Polypeptidketten auf der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten, woraus sich für jedes Protein spezifische Peptide ergeben, die in Summe den sog. *peptid fingerprint* ausmachen. Die Massen dieser Peptide werden mittels MALDI-TOF MS ermittelt. Es folgt ein Datenbankvergleich der experimentell bestimmten Massen mit den theoretisch anzunehmenden Massen für tryptische Fragmentmuster aller erfassten, bekannten und hypothetischen Proteine.

Die den Signal gebenden Banden in Abbildung 11 entsprechenden Proteinbanden wurden aus je vier präparativen Spuren eines PAA-Gels mit je 100 µg Gesamtprotein aus Fraktion V ausgeschnitten und in der Reihenfolge zunehmender Laufweite als Proben UR4 bis UR6 bezeichnet. Die Trypsinbehandlung der Proben lieferte gut übereinstimmende Peptidmassen, so dass davon ausgegangen wurde, dass es sich bei diesen drei Proben um Fragmente desselben Proteins handelte. Eine *Mascot*-Suche (*Mascot*-Suchmaschine, verfügbar unter [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) ergab die beste Übereinstimmung der Peptidmassen mit den theoretischen Massen für das Genprodukt Yhr146wp mit einem *molecular weight search (Mowse)* Wert (Perkins *et al.*, 1999) von 118. Übereinstimmungen mit anderen Hefe-Proteinen wiesen *Mowse* Werte kleiner als 43 auf und lagen damit unter der angelegten Signifikanzschwelle von 56. Bei Yhr146wp handelte es sich um ein hypothetisches Protein von einem bisher uncharakterisierten offenen Leseraster, so dass keine experimentellen Daten zur Einschätzung des Befundes herangezogen werden konnten.

Da der *Mowse* Wert auf Wahrscheinlichkeitsberechnung basiert, das heißt die Übereinstimmung mit einem Datenbankprotein in einem Punktsystem nach Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen ermittelt wird, konnte hier zwar angenommen

werden, dass das gesuchte Protein Yhr146wp war, jedoch keine endgültige Aussage gemacht werden.

**Massenspektrometrische Sequenzanalyse tryptischer Peptidmassen.** Um die Identität des X-DNA bindenden Proteins endgültig zu klären, wurden drei Peptide der tryptischen Spaltung von Probe UR4, mit Masse-zu-Ladung Verhältnis-Werten von 1326,58, 973,41 und 1101,50  $m/z$  auf Sequenzebene mittels LC-ESI MS-MS untersucht. Dabei erlaubt die Tandem-Anordnung zweier massenspektrometrischer Schritte das Herausfiltern des zu untersuchenden Peptids aus einem Peptidgemisch mittels vorgeschaltetem, als Massenfilter wirkendem Quadrupolmassenspektrometer und nachfolgendem Flugzeitmassenspektrometer. Das herausgefilterte Peptid wird in einer Kollisionskammer mit Argon fragmentiert und die Fragmente im Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Die ermittelten Aminosäuresequenzen lauten:

LANKDDTFQFK (1326,58  $m/z$ )

SAGPPSTSNR (973,41  $m/z$ )

SAGPPSTSNRK (1101,50  $m/z$ )

Mit diesen Sequenzdaten als zusätzliches Kriterium konnte das untersuchte Protein eindeutig als Yhr146wp bestätigt werden.

**Das Protein Yhr146wp/Crp1p.** Zum Zeitpunkt der Identifikation lagen keine Studien zu Yhr146wp vor. Das Gen *YHR146W* liegt auf Chromosom VIII und wurde in der *Saccharomyces Genome Database* (verfügbar unter <http://www.yeastgenome.org/>) als hypothetisches offenes Leseraster geführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde das Gen mit dem funktionellen Namen *CRP1* versehen. Diese Abkürzung steht für *Cruciform DNA-Recognising Protein 1*. Die in den letzten Jahren verstärkt durchgeführten genomweiten Studien zu *S. cerevisiae* lieferten bis heute weder biochemische Daten zu Crp1p, noch eine Einschätzung seiner biologischen Funktion.

```

Seq    1  MSSELMFNYT FSWPAGPKDV ILTGTFFDDWR GTLPLVKTAK GNFEITMPVK
Seq   51  LANKDDTFQF KFIVDGVWCV SDSYKKEHVS EGIENNFLQI TDLVETQEVA
Seq  101  GASRIPEAGG LLCGKPPRSA GPPSTSNRKK NKRNNKKRRS KLKKKSTKNN
NLS                                     <----<----<-----
Lys                                     <-----
Seq  151  KKSNESSLDDN EEEDGVTGTT TEDVTGTSRE ETPLAEPTNV SKEAPGNFHI
NLS  -->
Lys  -->
Seq  201  LPIDQSADTT QSNGIIGGPG PVLVNPGEI KEFTEIRDVD ARELNERLNK
Seq  251  KEEVPEPVAG PIVESSVTEK SPALPQADDP IVETKEVAHN VQELTPQVEA
Seq  301  VTPLINEPEP LPTPEAQISI PESSKVEPVE GSLQSKLVEK RESTEGVLDG
Seq  351  SKKVENKAKK DEEVFTLDPI VNKAPKLPLT DEQTAEGRKS PAVSEEKEKK
NLS                                     <-----
Lys  <-----
Seq  401  KKQEKGSKEV KRSETSKEKK PSAKEVKKQT VKAPKKQTAS PLSSSTEEPK
NLS  ---->
Lys  ----->
Seq  451  KKKTGFFGKL KKLFK*

```

#### Abbildung 12: Aminosäuresequenz von Crp1p.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Crp1p. Die hervorgehobenen Aminosäuren entsprechen den mittels LC-ESI MS-MS ermittelten Sequenzen, über welche Crp1p identifiziert wurde. Lysin-reiche Regionen (Lys) zwischen Aminosäure 129 und 152 bzw. 352 und 420, sowie die Lage mehrerer putativer Kernlokalisierungssignale (NLS) sind gekennzeichnet.

Crp1p besteht aus 465 Aminosäuren und besitzt eine nominelle Molekülmasse von 51,1 kDa. Das Protein besitzt zwei Lysin-reiche Regionen in denen jeweils ein oder mehrere putative Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*; Abk. NLS) liegen (Abbildung 12). Die NLS Sequenzen gehören dem zweigeteilten Typ an, der erstmals für Nucleoplasmin beschrieben wurde (Dingwall *et al.*, 1982). Dieser Typ besteht aus zwei basischen Elementen, einem Paar aus Arginin und/oder Lysin und einer Folge von fünf Aminosäuren, von denen mindestens drei basische Seitenketten besitzen, getrennt von 10 bis 12 Aminosäuren, deren Zusammensetzung variabel ist (Robbins *et al.*, 1991). Diese Regel, nicht eine strikte Konsensus-Sequenz, dient der Voraussage von NLS Sequenzen. Deshalb konnte die Voraussage der NLS Sequenzen in Crp1p (Falquet *et al.*, 2002) nur als Indiz für eine Kernlokalisierung des Proteins gewertet werden. Ihr gemeinsames Auftreten mit einer DNA-bindenden Aktivität legt allerdings einen tatsächlichen Kernimport nahe.

Die Aminosäuresequenz offenbarte weder eine bekannte DNA-Bindedomäne noch eine Verwandtschaft zu bekannten DNA-bindenden Proteinen oder die Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie. Das ähnlichste Hefeprotein zu Crp1p ist Mdg1p, mit einer Sequenzidentität von 28%. Die verfügbaren Daten zu Mdg1p lieferten zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Erkenntnisse bezüglich einer biochemischen oder zellulären Funktion von Crp1p und werden später näher behandelt (vgl. Seite 111).

Da bei der Sequenzanalyse lediglich N-terminale Bereiche von Crp1p (Aminosäuren 51-61, 119-128 und 119-129, vgl. Abbildung 12) identifiziert wurden, und da die apparenten Molekülmassen der untersuchten Proteine nur bei 24 bis 28 kDa lagen, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um N-terminale Fragmente von Crp1p handelte.

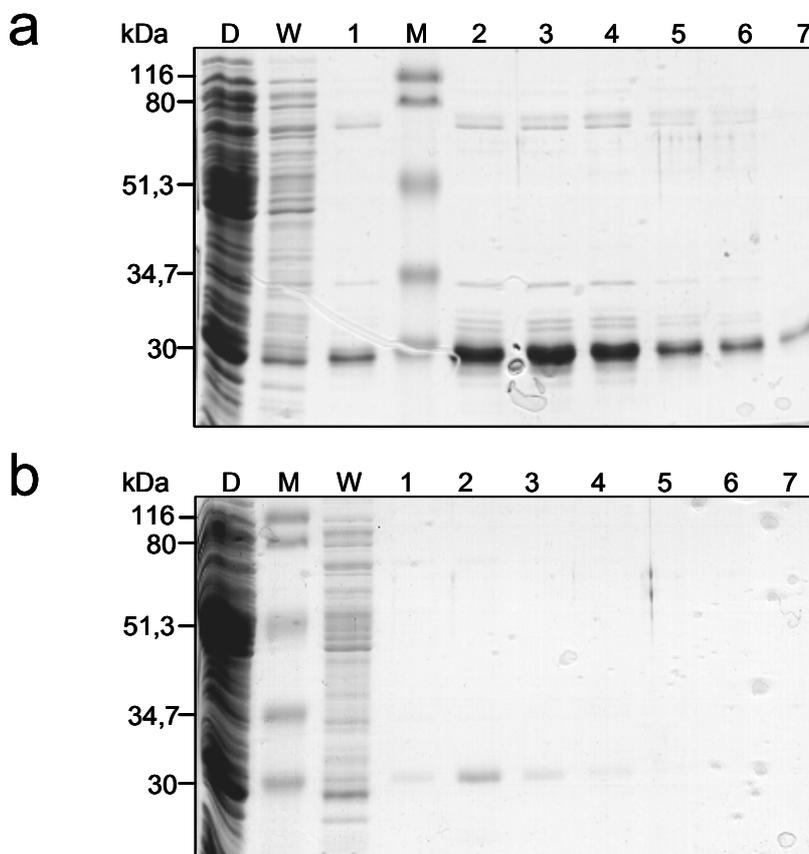
## **3.2. Charakterisierung von Crp1p**

### **3.2.1. Rekombinantes Crp1p bindet spezifisch X-DNA**

Um Crp1p näher zu untersuchen und um zu zeigen, dass sich das Protein auch in EMSA-Analysen wie die in Hefe-Extrakten beobachtete Aktivität verhielt, wurde die entsprechende Gensequenz mittels PCR aus dem Hefegenom amplifiziert und zur Expression in *E. coli* in ein pET-11a-Derivate kloniert (vgl. Seite 52). Das rekombinante Expressionsplasmid pUR101 codierte das Zielprotein mit N-terminalem His-tag, um die Reinigung des Proteins zu vereinfachen. Die Expression des auf Sequenzebene kontrollierten Plasmids erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS. Die Reinigung des Zielproteins erfolgte unter Anwesenheit von Protease-Inhibitoren durch Affinitätschromatographie unter Ausnutzung der Wechselwirkung des His-tag mit einer Ni-NTA-Matrix (vgl. Seite 47).

Crp1p hat eine nominelle Molekülmasse von 51,1 kDa und trägt in rekombinanter Form eine Erweiterung von 27 Aminosäuren am N-Terminus. Demnach sollte ein Produkt mit apparenter Molekülmasse von ca. 54 kDa auf SDS-PAA-Gelen gefunden werden. Die Expression in unabhängigen pUR101-tragenden Klonen und anschließende Ni-NTA-Affinitätschromatographie führte in einer Serie von Experimenten jedoch immer nur zur Anreicherung eines Proteins mit einer apparenten Molekülmasse von 29 kDa (Abbildung 13a, Spuren 1, 2 bis 7; exemplarische Darstellung). Diese Proteinbande war spezifisch für die Expression von pUR101, denn parallel behandelte Zellen ohne

Expressionsplasmid lieferten kein entsprechendes Protein (Abbildung 13b, Spuren 1 bis 7).

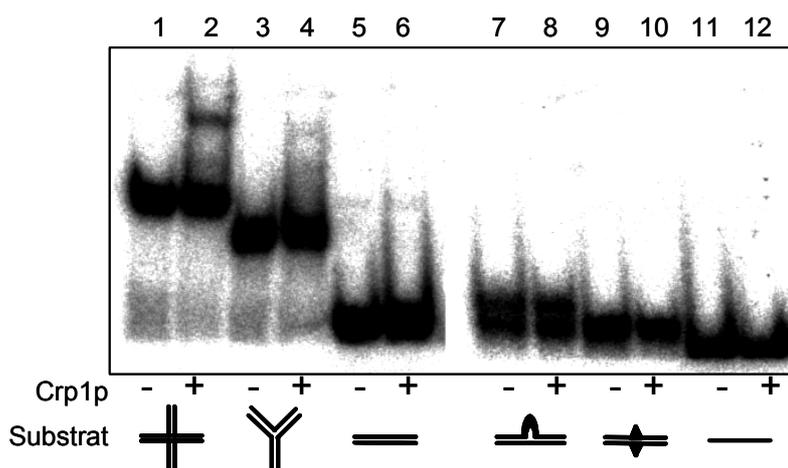


**Abbildung 13: Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinantem Crp1p.**

**(a)** Rekombinantes Crp1p wurde unter nativen Bedingungen gereinigt. Zunächst wurde das Protein über seinen His-tag an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und in eine Leersäule gegeben. Nach Abfließen des Durchflusses (D) wurde die abgesetzte Agarose mit insgesamt 18 ml Waschpuffer gespült (W), bevor gebundenes Protein aufeinander folgend mit Elutionspuffer mit 50 mM (Fraktionen 1 und 2), 250 mM (Fraktionen 3 und 4) bzw. 500 mM Imidazol (Fraktionen 5 bis 7) herunter gewaschen wurde (500  $\mu$ l Puffer je Fraktion). 7,5  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Fraktionen 1 bis 7 zeigen die spezifische Anreicherung einer 29 kDa-Bande, welche **(b)** bei einem Kontrollversuch bei einer Proteinreinigung aus Zellen ohne Expressionsplasmid nicht auftritt. M bezeichnet jeweils eine Spur mit Molekulargewichtsmarkern auf die sich die angegebenen Molekülmassen beziehen.

Das Protein mit apparenter Molekülmasse von 29 kDa wurde einer EMSA-Analyse unterzogen. Dabei wurden 50 ng zu annähernder Homogenität gereinigten Proteins (vgl. Abbildung 13a, Spur5) unter Anwesenheit des Kompetitors Poly(d[I-C]) mit einem Satz von verzweigten- und unverzweigten DNA-Substraten getestet. Die Sequenzen aller verwendeten Substrate wurden von der X-DNA CF110 abgeleitet (eine Beschreibung der DNA-Substrate findet sich auf Seite 21). Von den angebotenen

Substraten, die X-DNA, Y-DNA, linear doppelsträngige- und einzelsträngige DNA, sowie einen DNA-Doppelstrang mit CC-Fehlpaarung und einen Doppelstrang mit einer acht Nukleotide großen Heteroduplex-Schleife umfassten, wurden nur die verzweigten DNA-Strukturen gebunden (Abbildung 14, Spuren 2 und 4). Dabei war das Retardierungs-Signal bei X-DNA stärker als das bei Y-DNA. Das scheinbare Retardierungssignal bei dem linear doppelsträngigen Substrat geht nicht auf die Anwesenheit des zu testenden Proteins zurück, da es auch in der Kontrollreaktion ohne Protein auftaucht (Abbildung 14, Spuren 5 und 6). Offensichtlich handelt es sich um einen Anteil an nicht korrekt hybridisiertem Substrat in der Doppelstrang-Präparation, der sich bei der Elektrophorese anders verhielt als das intakte lineare Substrat. Insgesamt entsprach die Analyse der erwarteten Substratspezifität für die mit Hefe-Extrakten beobachtete X-DNA bindende Aktivität (vgl. Abbildung 3).



**Abbildung 14: Substratspezifität von rekombinantem Crp1p.**

EMSA-Analyse von rekombinantem Crp1p. Die mit Symbolen dargestellten, von der Sequenz von CF110 abgeleiteten DNA-Substrat (je 0,1 nM) wurde in Anwesenheit der Kompetitor-DNA Poly[d(I-C)] (5 µg) jeweils ohne Protein und mit 50 ng Crp1p unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Nur bei den verzweigten X- und Y-DNAs ist eine Substratretardierung zu beobachten (Spuren 2 und 4). Die DNA-Substrate waren von links nach rechts: X-DNA, Y-DNA, lineare Doppelstrang-DNA, Doppelstrang-DNA mit einer acht Nukleotide großen Heteroduplex-Schleife, Doppelstrang mit einer CC-Fehlpaarung und Einzelstrang-DNA.

### 3.2.2. Rekombinantes Crp1p wird proteolytisch gespalten

Das Verhalten von rekombinantem Crp1p im EMSA hatte bestätigt, dass das Protein tatsächlich der aus Hefe gereinigten X-DNA bindenden Aktivität entsprach. Allerdings stellte sich die Frage, warum das Protein nach Expression von pUR101 in *E. coli* wiederholt als 29 kDa-Bande in Erscheinung trat. Interessanterweise entsprach

diese apparente Molekülmasse ungefähr der apparenten Molekülmasse der Crp1p-Hauptbande im *Southwestern-blot* mit Hefe-Extrakten (vgl. Abbildung 11). Das Auftreten der Bande nach Expression in *E. coli* konnte *per se* verschiedene Gründe haben:

(1) Bei dem beobachteten Protein handelte es sich um ein verkürztes, N-terminales Fragment von Crp1p, das durch eine Veränderung in der codierenden DNA-Sequenz bedingt wird. Damit sich eine solche Veränderung in einer *E. coli* Kultur durchsetzt, müsste ein starker Selektionsdruck gegen das intakte Plasmid bestehen. Dies wäre dann der Fall, wenn Crp1p einen toxischen Effekt hätte. Folge könnte die Anhäufung von Mutationen oder DNA-Rearrangements sein. Diese Möglichkeit ist denkbar, wenn eine Art Prädisposition der DNA-Sequenz für Ereignisse vorliegt, die immer wieder zur gleichen Verkürzung von Crp1p führen.

(2) Bei dem beobachteten Protein handelte es sich um ein verkürztes, N-terminales Fragment von Crp1p, das durch proteolytische Spaltung aus dem Volle-Länge-Protein hervorgeht. Diese Spaltung müsste effizient und auf eine spezifische Stelle beschränkt erfolgen, da kein Volle-Länge-Protein beobachtet werden konnte und nur genau ein verkürztes Peptid auftrat.

(3) Die Verkürzung von Crp1p wurde durch die unterschiedliche Codon-Bevorzugung in *E. coli* und *S. cerevisiae* bedingt. Eine forcierte Expression eines Fremdproteins in *E. coli* kann zur Erschöpfung seltener tRNAs führen. Es wäre deshalb denkbar, dass durch eine kritische Konstellation von Codonen ein verfrühter Kettenabbruch bei der Translation verursacht wird (Gao *et al.*, 1997).

Eine Serie von Versuchen sollte klären, ob eine oder mehrere dieser Vermutungen zutrafen: Zunächst wurde Möglichkeit (3), der frühzeitige Translationsabbruch wegen erschöpfter tRNA-Vorräte, durch Verwendung des Expressionsstamms BL21-CodonPlus(DE)-RIL getestet. Der Stamm trägt zusätzliche Kopien der tRNA-Gene für die Erkennung der in Tabelle 10 aufgeführten Codonen. Nach pUR101-vermittelter Expression von *CRPI*, Ni-NTA-Affinitätschromatographie und SDS-PAGE ergab sich jedoch das gleiche Bild wie bei Verwendung von BL21(DE3)pLysS (nicht gezeigt).

Damit wurde die unterschiedliche Codon-Bevorzugung in *E. coli* und *S. cerevisiae* als Grund für das Auftreten der 29 kDa-Bande ausgeschlossen.

**Tabelle 10: Häufigkeiten von Codonen mit stark unterschiedlicher Bevorzugung in *E. coli* und *S. cerevisiae* und ihre jeweilige Häufigkeit in *CRP1*.**

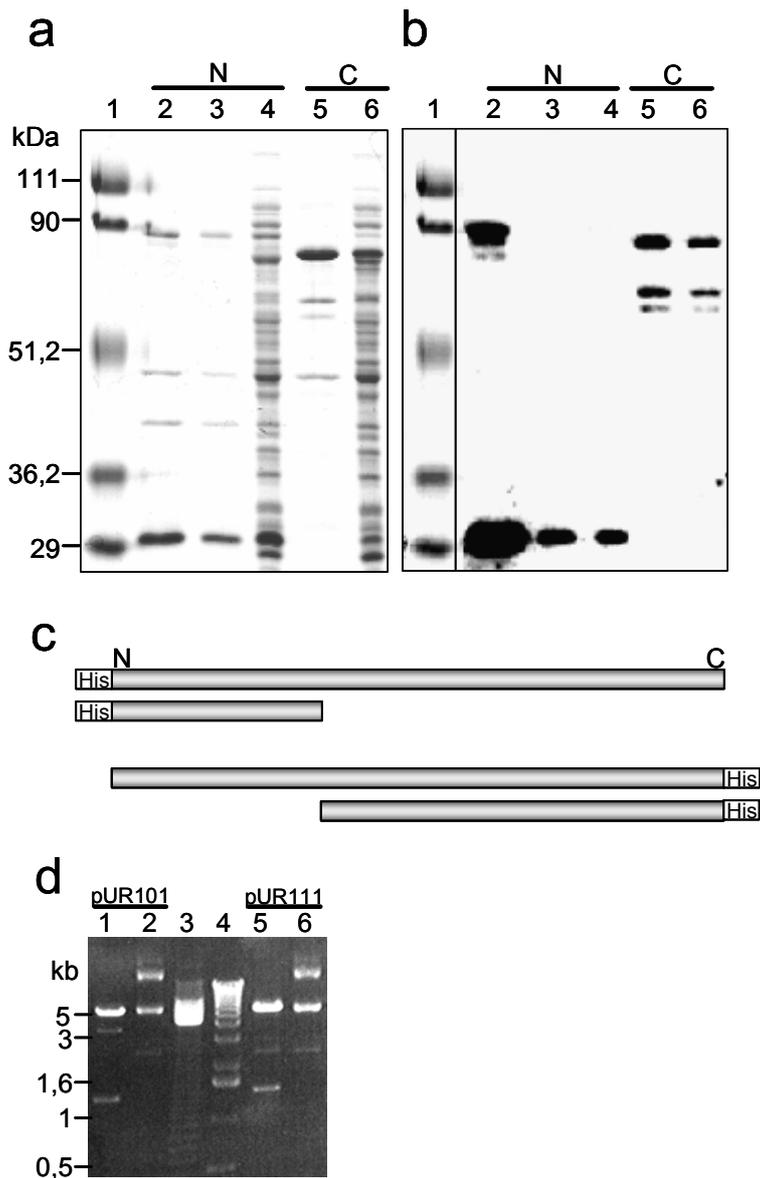
Codon	codierte Aminosäure	Häufigkeit in <i>E. coli</i> [%]	Häufigkeit in <i>S. cerevisiae</i> [%]	Häufigkeit in <i>CRP1</i> [%]
CUA	Leucin	4,0	13,3	8,6
AUA	Isoleucin	5,4	17,8	8,6
AGA	Arginin	2,9	21,3	15
AGG	Arginin	1,9	9,2	8,6

Die genomweiten Häufigkeiten wurden der *Codon Usage Database*, die von dem Kazusa DNA Research Institute in Japan verwaltet wird, entnommen (Nakamura *et al.*, 2000). AGA und AGG sind die am seltensten vorkommenden Codone in *E. coli*.

Um die Möglichkeiten (1) und (2) zu testen, wurde die Expression von Crp1p auf DNA- und Proteinebene genauer untersucht: Nach IPTG-induzierter Expression von Crp1p in BL21(DE3)pLysS wurde parallel zur Reinigung des Zielproteins Plasmid-DNA aus der Kultur extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde einer diagnostischen Restriktionsanalyse unterzogen und sequenziert. Das Zielprotein wurde mittels *Western* Technik über seinen *His-tag* immunologisch nachgewiesen. Um alle potentiellen Spaltprodukte erfassen zu können, wurde auch eine Variante von Crp1p mit C-terminalem *His-tag* kloniert (pUR111) und getestet. Diese Variante sollte zeigen, ob durch eine proteolytischen Spaltung des Proteins ein nachweisbares C-terminales Fragment entsteht.

Die N- und C-terminal mit *His-tag* versehenen Varianten von Crp1p wurden unter denaturierenden Bedingungen bei Anwesenheit von 8 M Harnstoff durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, um die Wahrscheinlichkeit eines proteolytischen Ereignisses während der Präparation zu minimieren (vgl. Seite 47). Nach der SDS-PAGE waren in beiden Fällen mehrere Banden in den Reinigungsfractionen zu erkennen (Abbildung 16a). *His-tag* tragende Proteine wurden mittels immunologischen Nachweis mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen den *His-tag* auf einem parallel angefertigten *Western-blot* identifiziert (Abbildung 16b). Es zeigte sich, dass die bereits beobachtete 29 kDa-Bande zusammen mit einem zweiten *His-tag* tragenden Protein mit einer apparenten Molekülmasse von ca. 70 kDa angereinigt wurde (Abbildung 16b, Spur 2). Das C-terminal mit *His-tag* versehene Crp1p tauchte hingegen als Bande von etwas weniger als 70 kDa (eventuell auf den kürzeren C-terminalen

Überhang von insgesamt 11 Aminosäuren im Vergleich zum mit 27 Aminosäuren längeren N-terminalen Überhang zurückzuführen) und als Bande von 55 kDa auf (Abbildung 16b, Spuren 5 und 6). Zusätzlich wurde ein schwaches Signal unter der 55 kDa Bande sichtbar, das eventuell ein weiteres Abbauprodukt darstellt. Der Inhalt der ~70 kDa-Bande wurde einer N-terminalen Proteinsequenzierung unterzogen und lieferte die Aminosäuresequenz SSELM, die den Aminosäuren 2 bis 6 von Crp1p entspricht.



**Abbildung 15: Proteolytische Spaltung von rekombinantem Crp1p.**

(a) Rekombinantes Crp1p mit N- bzw. C-terminalem His-tag wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Fraktionen der Reinigung wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Spur 1 enthält einen Molekulargewichtsmarker der angegebenen Molekülmassen. Spuren 2 und 3 enthalten 1,5 bzw. 3 µg Gesamtprotein von

Reinigungsfractionen mit Crp1p mit N-terminalem His-*tag*. Dieses wurde aus dem in Spur 4 gezeigten Lysat (10 µg Gesamtprotein) gereinigt. Spur 5 zeigt Crp1p mit C-terminalem His-*tag* (3 µg Gesamtprotein), welches aus dem in Spur 6 gezeigten Lysat (10 µg Gesamtprotein) gereinigt wurde. **(b)** Immunologischer Nachweis von Crp1p-Spezies mit einem Anti-His Antikörper auf einem Western-*blot*, der von einem vergleichbaren SDS-PAA-Gel angefertigt wurde (mit 1/10 der in (a) angegebenen Proteinmengen). Crp1p wird posttranslational gespalten und als Mischung aus Volle-Länge-Protein und eines N- bzw. C-terminalen Subpeptids angereinigt (Spuren 2 und 5). **(c)** Schematische Darstellung der His-*tag* tragenden Crp1p-Varianten. Das untere bzw. obere Paar entspricht der Mischung, welche in Abhängigkeit der Position des His-*tag* durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereinigt wurde. **(d)** Restriktionsanalyse von je 1 µg der Expressionsplasmide für N-terminal (pUR101) bzw. C-terminal (pUR111) mit His-*tag* versehenen Crp1p-Varianten. Die Plasmide wurden zum Erntezeitpunkt aus der Expressionskultur extrahiert. Die Auftrennung der Probe erfolgte in einem 0,8%-igen Agarosegel. Spur 1 zeigt den mit *SacI* und *KpnI* geschnittenen, Spur 2 den ungeschnittenen Vektor pUR101. Spur 5 zeigt den mit *NdeI* und *KpnI* geschnittenen, Spur 6 den ungeschnittenen Vektor pUR111. In beiden Fällen ergibt die Restriktion das erwartete DNA-Fragment von ~1,4 bzw. ~1,45 kb. Die linearisierten Vektoren zeigen die erwartete Größe von ~5,5 kb. Weitere Banden gehen auf das zweite Plasmid, pLysS, im verwendeten *E. coli* Stamm zurück. Spuren 3 und 4 enthielten DNA-Größenmarker. Die angegebenen DNA-Größen beziehen sich auf den Marker in Spur 4.

---

Die parallele Untersuchung der Plasmid-DNAs ergab, dass sie bei Ernte der Kultur pUR101 und pUR111 intakt waren. Beide lieferten das erwartete Restriktionsfragment von ~1,4 bzw. ~1,45 kb (Abbildung 16d, Spuren 1 und 5) und enthielten die korrekte DNA-Sequenz von *CRP1*.

Insgesamt lassen sich diese Befunde am besten damit erklären, dass Crp1p in voller Länge translatiert wird, um dann eine proteolytische Spaltung zu erfahren. Diese Spaltung tritt an einer spezifischen Stelle auf und stellt nicht etwa einen schrittweisen Totalabbau dar. Die Folge ist die gemeinsame Anreicherung eines Anteils an Crp1p in voller Länge mit dem jeweilig *tag* tragenden Spaltprodukt (schematische Darstellung in Abbildung 16c). Da die Reinigung in Anwesenheit von Harnstoff durchgeführt wurde und da deshalb eine Spaltung während der Prozedur unwahrscheinlich ist, findet die Prozessierung von Crp1p offensichtlich schon in der Zelle statt. Das Auftreten N-terminaler Fragmente in Hefe und *E. coli* könnte bedeuten, dass ein ähnlicher Prozess in beiden Organismen abläuft.

Es sei auf das aberrante Laufverhalten von Crp1p hingewiesen. Die apparente Molekülmasse von Crp1p von ca. 70 kDa stimmt nicht mit der nominellen Masse von 52 bis 54 kDa (je nach Verwendung des N- oder C-terminalen His-*tag*) überein. Dieses Phänomen wird auf Seite 80 weiter behandelt.

### 3.2.3. Untersuchungen an Crp1p-Derivaten

Nach den Ergebnissen der *Southwestern*-Analyse, der Expression, Reinigung und ersten EMSAs mit rekombinantem Protein war Crp1p als instabiles, X-DNA bindendes Protein identifiziert worden. Die Instabilität äußert sich als posttranslationale Spaltung des 465 Aminosäuren umfassenden Proteins und führt zu einem N-terminalen Spaltprodukt mit X-DNA bindender Aktivität. Um Einzelheiten bezüglich der Proteolyse und der DNA-Bindeeigenschaften von Crp1p zu ermitteln, wurde das Gen in Form einer Serie von N- und C-terminal verkürzten Derivaten in pET-11a-His-Tev kloniert (vgl. Seite 52 und Tabelle 3) und in BL21(DE3)pLysS exprimiert.

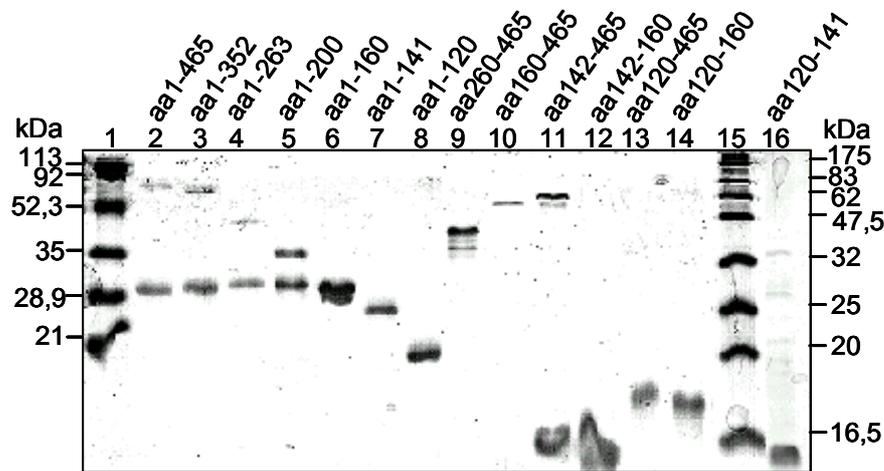
#### 3.2.3.1. Kartierung der proteolytischen Spaltstelle

N- und C-terminalen Derivate von Crp1p wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, einer SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Eine repräsentative Auswahl der Derivate ist in Abbildung 16 dargestellt. Aus Übersichtsgründen wurde auf eine Gesamtdarstellung aller generierten Derivate verzichtet.

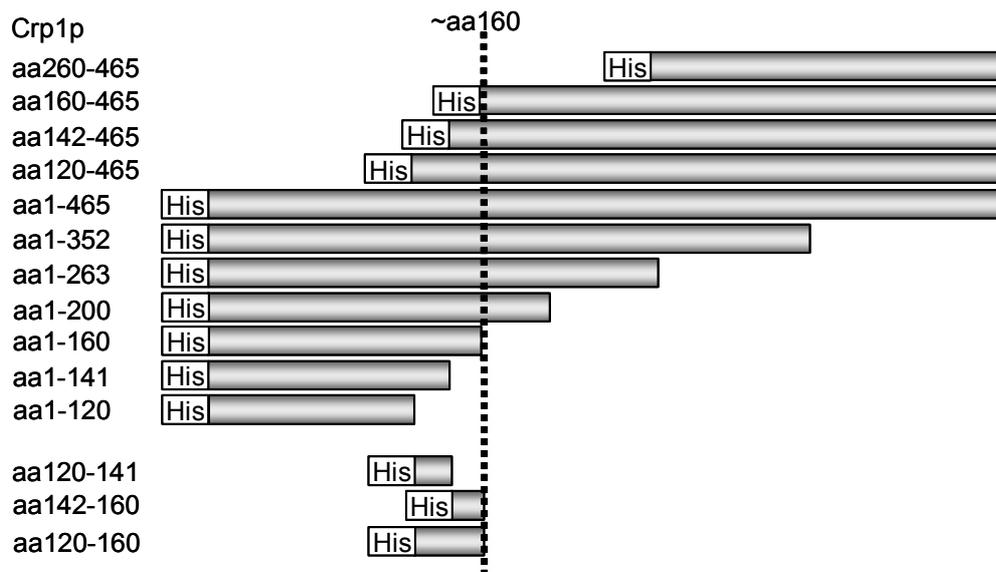
Die Reinigung der Crp1p-Derivate erfolgte unter nativen Bedingungen in Anwesenheit einer Mischung von Protease-Inhibitoren. In vielen Fällen kam es zu einer Spaltung des Expressionsproduktes, so dass es zur gemeinsamen Anreicherung des Produktes voller Länge und eines Spaltproduktes kam (Abbildung 16a, Spuren 2 bis 5 und 11). Die Spaltung erwies sich als effizienter Vorgang, denn der Anteil an Spaltprodukt überwog stets dem Anteil an Volle-Länge-Produkt. Zur Spaltung kam es immer dann, wenn ein Crp1p-Derivate Aminosäure 160 überspannte. Derivate, die diesen kritischen Bereich nicht enthielten, erschienen als singuläre Banden auf dem SDS-PAA-Gel. (Abbildung 16a, Spuren 6 bis 10, 12, 14, 16). N-terminale Derivate von Crp1p, die sich über Aminosäure 160 hinaus erstreckten, lieferten Spaltprodukte mit einer apparenten Molekülmasse von 29 kDa. Diese Bande entsprach also der bereits bei vorangegangenen Expressionsversuchen von Crp1p beobachteten Bande. Die Expression des Derivats Crp1p<sup>aa1-160</sup> ergab eine Bande gleicher Laufweite (Abbildung 16a, Spur 6). Weitere C-terminale Verkürzung führte zu Produkten kleinerer Molekülmassen (Abbildung 16a, Spuren 7 und 8). Die C-terminalen Derivate Crp1p<sup>aa142-465</sup> und Crp1p<sup>aa120-465</sup> lieferten Spaltprodukte mit apparenten Molekülmassen von 14,5 bzw. 18,5 kDa. Produkte gleicher Massen ergaben sich bei Crp1p<sup>aa142-160</sup> und

Crp1p<sup>aa120-160</sup> Abbildung 16a, Spuren 11, 12 bzw. 13, 14; Anmerkung: in Spur 13 findet sich nur das Spaltprodukt und kein Volle-Länge-Produkt).

a



b



**Abbildung 16: Lage der proteolytischen Spaltstelle in rekombinantem Crp1p.**

(a) Die angegebenen rekombinanten Crp1p-Derivate wurden über ihren N-terminalen His-tag durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen gereinigt. Je 3 µg gereinigtes Protein wurde in einem 20%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Bei den Derivaten, die Aminosäure 160 überspannen, kommt es zur Spaltung von Crp1p (weitere Erklärungen im Text). Die Molekülmassen zu den verwendeten Molekulargewichtsmarkern in Spuren 1 und 16 sind links bzw. rechts angegeben. (b) Schematische Darstellung der in (a) gezeigten Crp1p-Derivate. Die Balkengröße wurde relativ zu Volle-Länge-Crp1p gewählt. Die gestrichelte Linie deutet die Spaltstelle um Aminosäure 160 an.

Diese Beobachtungen zeigen, dass Crp1p effizient an einer spezifischen Stelle in direkter Umgebung von Aminosäure 160 gespalten wird (schematische Darstellung in

Abbildung 16b).<sup>1</sup> Dabei bleibt unklar, ob dieser Effekt durch einen autoproteolytischen Vorgang oder eine besonders exponierte, für proteolytische Spaltung sensitive Region um Aminosäure 160 bedingt wird. Wenn es stimmt, dass diese Spaltung in *E. coli* und in der Hefe erfolgt, so ist die dritte Möglichkeit, dass hier eine spezialisierte Protease wirkt, eher unwahrscheinlich.

Da sich die apparenten Molekülmasse der Crp1p-Derivate bei SDS-PAGE stark von den jeweiligen nominellen Masse unterschieden, wurde die exakte Masse eines Referenzderivats mittels Massenspektroskopie untersucht. Dazu wurde Crp1p<sup>aa1-408</sup> ausgesucht, da es Crp1p<sup>aa1-465</sup> am nächsten kam und der Anteil an Volle-Länge-Produkt größer war als bei Crp1p<sup>aa1-465</sup>. Die apparenten Molekülmassen im Falle Crp1p<sup>aa1-408</sup> waren 65 kDa für das intakte Derivat und 29 kDa für das Spaltprodukt. Die Probe lieferte in der MALDI-TOF Massenspektroskopie Masse-zu-Ladung Werte von 47515,85 und 21551,66 *m/z*. Diese Werte stimmen gut mit den nominellen Molekülmassen für Crp1p<sup>aa1-408</sup> mit 48018,37 kDa und das putatives Spaltprodukt Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit 21122,70 kDa überein. Dieser Befund unterstützt die Annahme dass die Spaltung in direkter Nähe von Aminosäure 160 stattfindet und zeigt, dass Crp1p in SDS-PAGE aberrant läuft.

### 3.2.3.2. Kartierung der DNA-Bindestelle

Die in Abbildung 16 dargestellten Fraktionen der N- und C-terminalen Derivate von Crp1p wurden einer vergleichenden EMSA-Analyse unterzogen. Dabei sollte die DNA-Bindedomäne eingegrenzt und zusätzlich geprüft werden, ob auch C-terminale Derivate von Crp1p DNA binden.

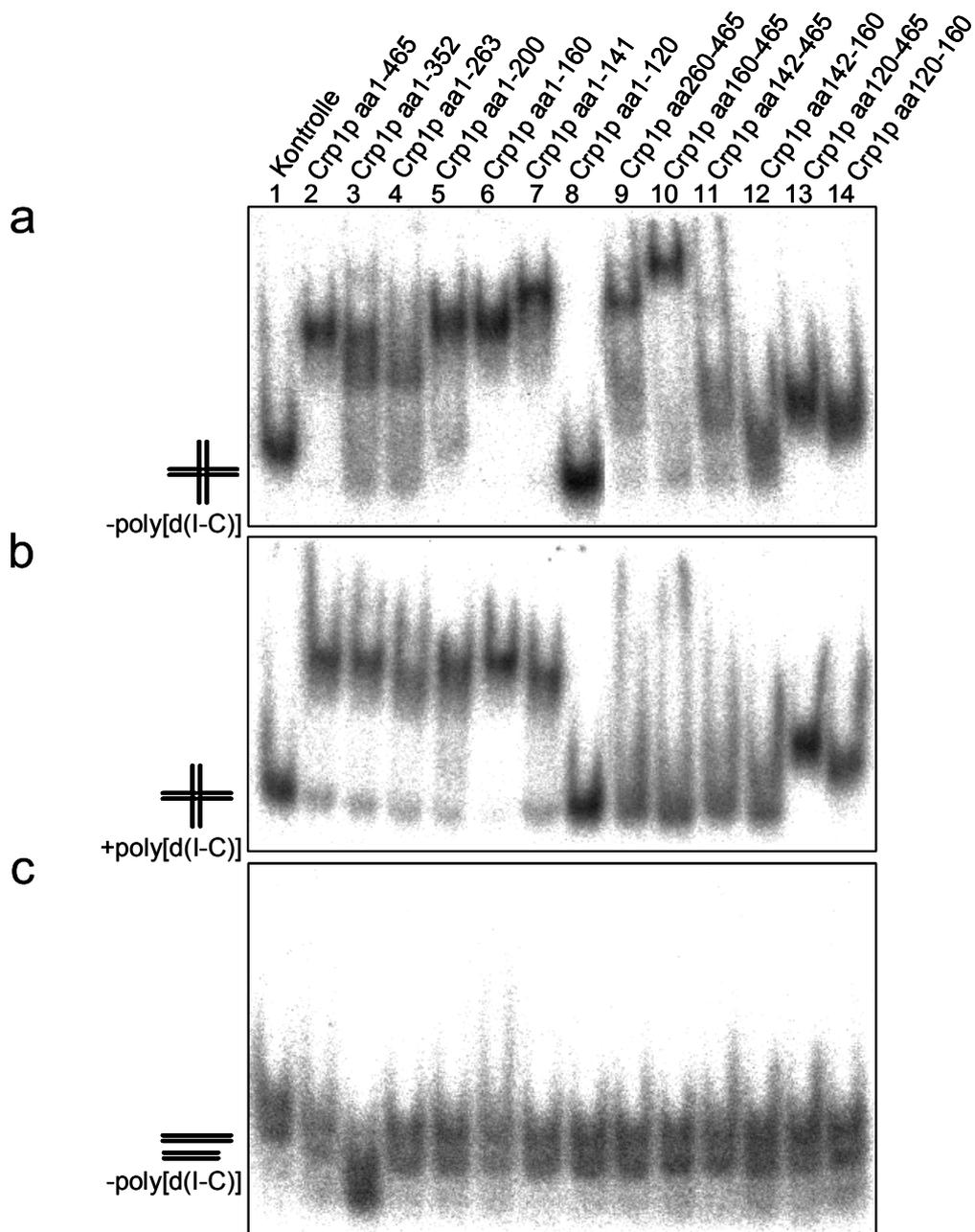
Je 1,5 µg der rekombinanten Derivate wurden mit dem X-DNA-Substrat CF110 und den linear doppelsträngigen Kontrollsubstraten (vgl. Seite 21) getestet (Abbildung 17). In Abwesenheit des Kompetitors Poly[d(I-C)] banden alle Derivate mit Ausnahme von Crp1p<sup>aa1-120</sup> X-DNA (Abbildung 17a). Dabei verursachten N- bzw. C-terminale

---

<sup>1</sup> Eine genaue Kartierung der proteolytischen Spaltstelle in Crp1p durch N-terminale Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes wurde versucht. Dabei ergab sich jedoch eine nicht eindeutige Aminosäuresequenz aufgrund sich an mehreren Positionen überlagernder Signale bei der Sequenzierung. Eine mögliche Sequenz ließ sich mit Aminosäuren 142 bis 144 und 146 bis 149 von Crp1p in Übereinstimmung bringen. Dieses Ergebnis korrespondierte jedoch nicht mit den Ergebnissen des Laufweitenvergleichs der Crp1p-Derivate und führte nicht zur Präzisierung der Lage der Spaltstelle.

Fragmente eine stärkere Substrat-Retardierung als die internen Fragmente Crp1p<sup>aa142-160</sup> und Crp1p<sup>aa120-160</sup> (Abbildung 17, Spuren 1 bis 7, 9, 10 bzw. 12 und 14). Dieser Unterschied lässt sich mit der geringeren Masse der internen Fragmente erklären. Ein interessanter Effekt stellte sich bei Crp1p<sup>aa142-465</sup> ein, wo eine starke und eine schwache Retardierung gleichzeitig auftraten. Die starke Retardierung ähnelt der durch Crp1p<sup>aa160-465</sup>, die schwache Retardierung der durch Crp1p<sup>aa142-160</sup> hervorgerufenen Retardierung (Abbildung 17, Spuren 10 bis 12).

In Anwesenheit von Poly[d(I-C)] wurden einige der beobachteten X-DNA-Bindungen kompetiert. Wie aus Abbildung 17b ersichtlich, waren kleiner werdende N-terminale Fragmente von Crp1p weiterhin dazu fähig X-DNA zu binden, solange Aminosäuren 1 bis 141 intakt blieben (Abbildung 17b, Spuren 2 bis 7). Eine weitere Verkürzung am C-Terminus führte bei Crp1p<sup>aa1-120</sup> zum Aktivitätsverlust (Abbildung 17b, Spur 8). Die Abwesenheit der Aminosäuren 1-141 führte zu den inaktiven Derivaten Crp1p<sup>aa260-465</sup>, Crp1p<sup>aa160-465</sup> und Crp1p<sup>aa142-465</sup> (Abbildung 17b, Spuren 9 bis 11). Entsprechend zeigte das Derivat Crp1p<sup>aa142-160</sup> keine X-DNA bindende Aktivität (Abbildung 17b, Spur 12). Die Crp1p-Derivate Crp1p<sup>aa120-465</sup> bzw. Crp1p<sup>aa120-160</sup> retardierten das X-DNA-Substrat weniger stark als die aktiven N-terminalen Fragmente (Abbildung 17b, Spuren 13, 14). Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass nach der Spaltung von Crp1p<sup>120-465</sup> in der Nachbarschaft von aa 160 hauptsächlich ein Peptid vorliegt, das dem Derivat Crp1p<sup>120-160</sup> sehr ähnlich oder mit diesem identisch ist (Abbildung 17a, Spuren 13, 14). Diese Spezies ist kleiner als die dominante Spezies in den aktiven N-terminalen Fragmenten und führt damit zu einer schwächeren Retardierung des X-DNA-Substrats. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindung von X-DNA über den N-Terminus vermittelt wird. Essentiell für die Bindung sind Aminosäuren 120-141. Dieser Bereich, der im Folgenden als X-DNA bindende Domäne bezeichnet wird, wurde als eigenständiges Derivat kloniert und analog getestet (vgl. dazu Abbildung 19c).



**Abbildung 17: Vergleichende EMSA-Analyse von Crp1p-Derivaten zur Kartierung der X-DNA bindenden Domäne.**

Das (a, b) X-DNA Substrat CF110 und die abgeleiteten (c) Doppelstrang-DNA-Substrate (je 0,1 nM) wurden jeweils ohne Protein (Kontrolle) und mit 1,5  $\mu\text{g}$  der angegebenen Crp1p-Derivate unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte jeweils in einem 8%igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Die An- bzw. Abwesenheit der Kompetitor-DNA Poly[d(I-C)] (5  $\mu\text{g}$  je Ansatz) ist angegeben. Während das X-DNA-Substrat von verschiedenen Crp1p-Derivaten retardiert wird, werden die Doppelstrang-Substrate nicht gebunden (weitere Erklärungen im Text).

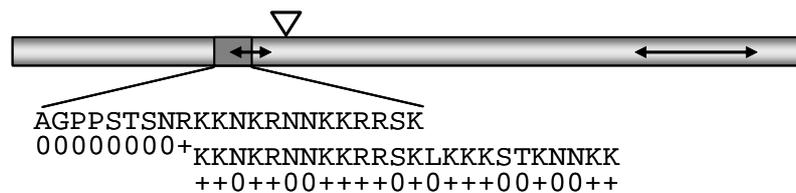
Die Summe der Crp1p-Derivate wurde auch auf ihre Fähigkeit hin untersucht linear doppelsträngige DNA zu binden (Abbildung 17c). Dabei diente eine äquimolare Mischung zweier DNA-Doppelstränge, die zusammen die gesamte Sequenzinformation der X-DNA CF110 abdecken (vgl. Seite 21) als Substrat. Hierbei konnte selbst in Abwesenheit des Kompetitors Poly[d(I-C)] keine Bindung des Substrates festgestellt werden.

Untersucht man die Ergebnisse der EMSAs in Hinblick auf die bereits beschriebenen Sequenzmotive von Crp1p (vgl. Abbildung 12), ergibt sich folgendes Bild: Die X-DNA bindende Domäne (aa 120-141) überschneidet sich teilweise mit einer von insgesamt zwei Lysin-reichen Regionen. Diese N-terminale Lysin-reiche Region (aa 129-152) weist einen Cluster positiver Ladungen auf. Der 24 Aminosäuren umfassende Bereich enthält 12 Lysine (50%), 3 Arginine und des weiteren nur ungeladene Reste. Der Teil der X-DNA bindenden Domäne, der vor diesem Ladungscluster liegt, enthält ein Arginin und ist ansonsten ungeladen (Abbildung 18a). Diese prägnante Ladungsverteilung ist wahrscheinlich maßgeblich für die strukturabhängige DNA-Bindung. Die zweite, C-terminal gelegene Lysin-reiche Region (aa 352-420) weist 19 Lysine (27,5%) und eine insgesamt heterogenere Ladungsverteilung auf. Interessanterweise waren Crp1p-Derivate, die diese Region enthielten in Abwesenheit von Poly(d[I-C]) auch zur spezifischen X-DNA-Bindung fähig (vgl. Abbildung 18b).

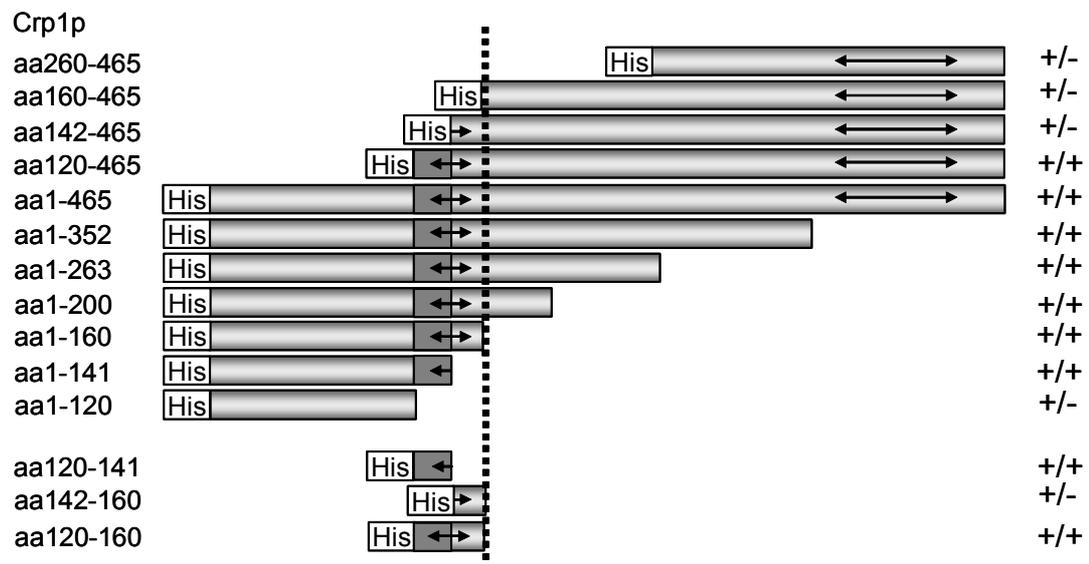
Betrachtet man die Laufweiten der retardierten Substratbanden, so fällt auf, dass Crp1p<sup>aa160-465</sup> (besitzt die C-terminale Lysin-reiche Region) eine hohe Bande und Crp1p<sup>aa142-465</sup> (besitzt die C-terminale- und einen Teil der N-terminalen Lysin-reichen Region) eine hohe und eine niedrige Bande hervorruft. Bezieht man die Spaltung von Crp1p in diese Überlegung ein, so enthält die Präparation des Derivats Crp1p<sup>aa142-465</sup> eine Mischung aus einem kleinen Peptid, das einen Teil der N-terminalen Lysin-reichen Region enthält und dem Volle-Länge-Produkt, das zusätzlich die C-terminale Lysin-reiche Region enthält. Diese unterschiedlichen Produkte scheinen um die X-DNA-Bindung zu konkurrieren, wobei sich die N-terminale Lysin-reiche Region stärker durchsetzt. Bei Crp1p<sup>aa120-465</sup> setzt sich allein das N-terminale Spaltprodukt durch, das die X-DNA bindenden Domäne enthält. Hier lässt sich ausschließlich die niedrige Bande nachweisen. Eine mögliche Erklärung dazu wäre, dass die C-terminale Lysin-

reiche Region zwar X-DNA bindet, aber weniger effizient als die N-terminale Lysin-reiche Region. In beiden Fällen liegt eine strukturabhängige DNA-Bindung vor, da keine der beiden Regionen mit linear doppelsträngiger DNA interagiert. Die N-terminale Lysin-reiche Region überlappt mit der X-DNA bindenden Domäne, die auch in Anwesenheit von Poly[d(I-C)] X-DNA-Bindung vermittelt.

a



b



**Abbildung 18: Lage der X-DNA bindenden Domäne von Crp1p.**

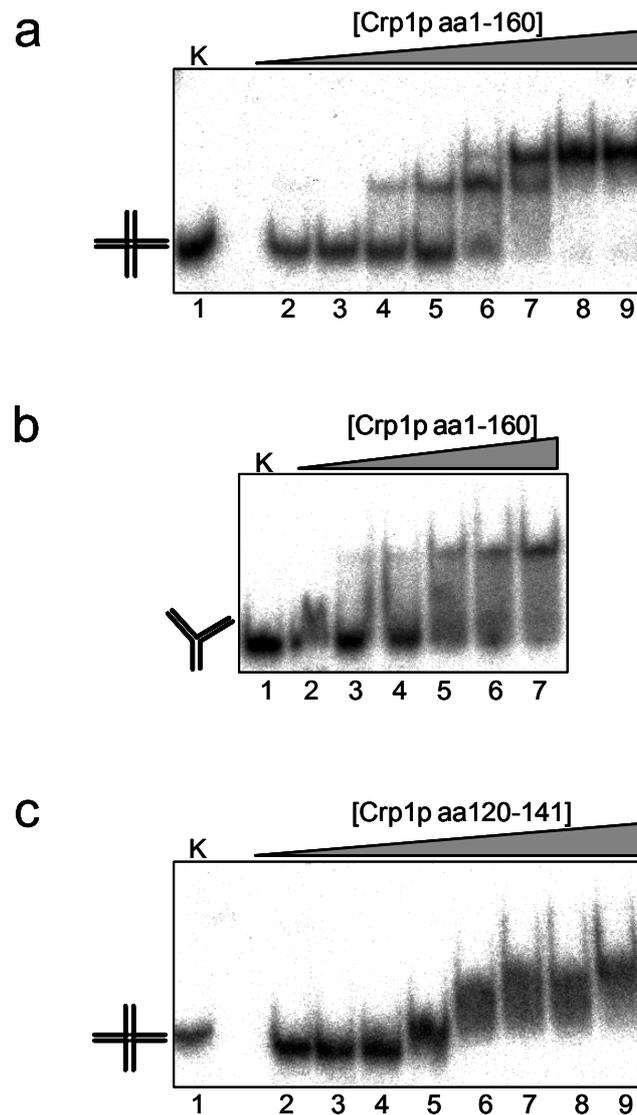
Schematische Darstellung von Crp1p-Derivaten mit der Lage der Lysin-reichen Regionen ( $\leftrightarrow$ ) und der an rekombinantem Crp1p bestimmten proteolytischen Spaltstelle (weißer Pfeil bzw. gestrichelte Linie). Die X-DNA bindende Domäne (Aminosäuren 120-141) ist jeweils hervorgehoben. **(a)** Volle-Länge-Crp1p mit den Aminosäuresequenzen der DNA bindenden Domäne (oben) und der überlappenden Lysin-reichen Region (unten, Aminosäuren 129-152). Ungeladene Aminosäuren sind mit einer 0, positiv geladene mit einem + gekennzeichnet. **(b)** Das Potential der gezeigten Crp1p-Derivate, X-DNA zu binden, ist mit + oder - gekennzeichnet. Dabei bezieht sich die erste Angabe auf die Bindung in Abwesenheit, die zweite auf Bindung in Anwesenheit von Kompetitor-DNA.

Die X-DNA bindende Domäne ist mit ihrer positiven Nettoladung *per se* für Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren geeignet. Dabei ist anzunehmen, dass Bindungen zum negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrad eingegangen werden. Wie dabei die Architekturspezifität der DNA-Bindung erreicht wird, ist bislang unklar.

### 3.2.3.3. Dissoziationskonstanten von Crp1p-DNA-Komplexen

Um Dissoziationskonstanten von Crp1p-Derivaten und DNA-Substraten zu ermitteln, wurden steigende Proteinkonzentrationen mit dem jeweiligen Substrat inkubiert. Die bei der folgenden Gelelektrophorese auftauchenden Retentionsbanden wurden quantifiziert und in Relation zu den Banden freien Substrats gesetzt (Vorgehensweise wie bei der Definition der Einheit X-DNA bindender Aktivität, vgl. Seite 51). Bei 50% Substratbindung entspricht die Dissoziationskonstante dem Doppelten der eingesetzten Proteinkonzentration. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Formel  $K_d = [P][S] / [PS]$ , wobei [PS] die Konzentration an Protein-DNA-Komplex, [P] die eingesetzte Proteinkonzentration und [S] die Konzentration an eingesetztem DNA-Substrat ist. Die Größen [P] und [S] sind jeweils bekannt und [PS] ergibt sich aus dem Anteil an retardiertem Substrat.

Dissoziationskonstanten wurden für (1) Crp1p<sup>aa1-160</sup> und X-DNA, (2) Crp1p<sup>aa1-160</sup> und Y-DNA und (3) Crp1p<sup>aa120-141</sup> und X-DNA bestimmt (Abbildung 19a bis c). Durch die Verwendung des stabilen, N-terminalen Derivats Crp1p<sup>aa1-160</sup> wurden ungenaue Messungen aufgrund der Anwesenheit unterschiedlicher Proteinderivate, wie sie bei Verwendung von Crp1p-Spezies mit funktionaler Spaltstelle zu erwarten gewesen wäre, vermieden. Das andere getestete Derivat, Crp1p<sup>aa120-141</sup>, umfasst die ermittelte Minimalsequenz der X-DNA-Bindedomäne. Das Y-DNA-Substrat wurde getestet, da es in der vergleichenden EMSA-Analyse (vgl. Abbildung 14) neben X-DNA das einzige erkannte Substrat war.



**Abbildung 19: Bestimmung von Dissoziationskonstanten für Crp1p-DNA-Komplexe.**

EMSA-Analyse von rekombinantem Crp1p. Die mit Symbolen gekennzeichneten DNA-Substrate, X-DNA CF110 und das abgeleitete Y-Substrat (je 0,1 nM) wurden in Abwesenheit von Kompetitor-DNA jeweils ohne Protein (K) und mit steigenden Mengen der angegebenen Crp1p-Derivate unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel. Die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht, um die jeweiligen Dissoziationskonstanten zu ermitteln **(a)** Spuren 2 bis 9 enthielten 10, 25, 50, 75, 100, 250, 575 bzw. 1150 ng Protein. **(b)** Spuren 2 bis 7 enthielten 50, 75, 100, 250, 575 bzw. 1150 ng Protein. **(c)** Spuren 2 bis 9 enthielten 15, 30, 62,5, 125, 250, 500, 1000 bzw. 2000 ng Protein.

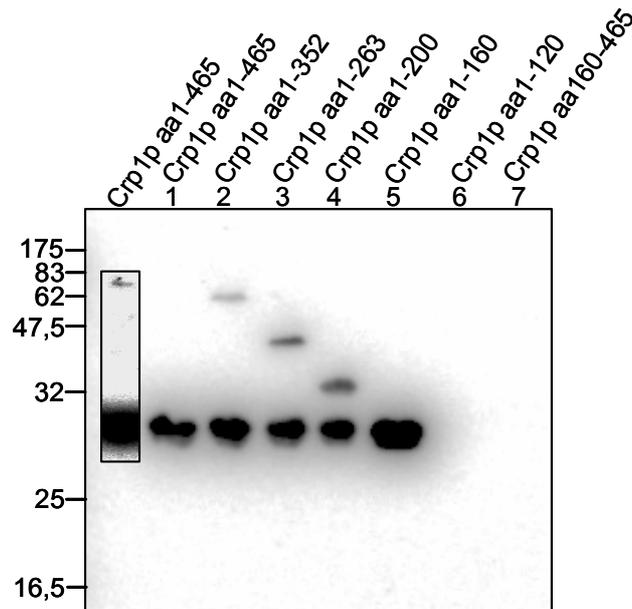
Die Dissoziationskonstanten ergaben sich zu (1)  $8 \times 10^{-7}$  M, (2)  $2,36 \times 10^{-7}$  und (3)  $3,5 \times 10^{-5}$ . Damit bestätigte sich zum einen, dass X-DNA das bevorzugte Substrat darstellt, denn es wurde etwa drei mal besser gebunden als Y-DNA. Darüber hinaus zeigte sich, dass die ermittelte Minimalsequenz von 21 Aminosäuren autonom zur X-DNA-Bindung fähig ist. Allerdings liegt dabei die Dissoziationskonstante 40-fach höher als bei Crp1p<sup>aa1-160</sup>. Dies kann zwei Gründe haben. Zum einen könnte die hier ermittelte

Minimalsequenz zur X-DNA-Bindung nicht die gesamte DNA bindende Domäne umfassen. Um einen Minimalbereich mit der Qualität von Crp1p<sup>aa1-160</sup> zu bestimmen müssten weitere Crp1p-Derivate generiert und quantitativ untersucht werden. Es ist anzunehmen, dass der stark positiv geladene Sequenzbereich zwischen Aminosäure 141 und 160 zur X-DNA-Bindung in Crp1p<sup>aa1-160</sup> beiträgt, obwohl er alleine nicht ausreicht, um X-DNA-Bindung zu vermitteln.

Zum anderen könnte ein Peptid dieser Größe zwar die gesamte relevante Sequenzinformation zur effizienten X-DNA-Bindung tragen, aber strukturelle Voraussetzungen, die von umliegenden Sequenzen vermittelt werden, eingebüßt haben. Abgesehen davon hatte das Peptid Crp1p<sup>aa120-141</sup> die Tendenz auszufallen. Dieser Umstand könnte zu falschen Messungen geführt haben, wenn ein Teil des Proteins ausgefallen und damit in inaktiver Form vorlag.

#### **3.2.3.4. Volle-Länge-Crp1p bindet X-DNA**

Die EMSAs mit Crp1p konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob das Protein in voller Länge X-DNA binden kann. Um die Frage zu klären, ob die Affinität zu X-DNA erst durch die Spaltung des Proteins entsteht, wurden einige Varianten von Crp1p einer *Southwestern*-Analyse (vgl. Seite 51) unter Anwesenheit von Lachsspermien-Kompetitor-DNA unterzogen. Dabei zeigte sich, dass sowohl gespaltenes wie auch intaktes Crp1p in der Lage ist, X-DNA zu binden, wenn die DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 120 bis 141) präsent ist (Abbildung 20). Der Einschub in Abbildung 20 zeigt die Bindung von X-DNA durch Volle-Länge-Crp1p und das N-terminale Spaltprodukt. Bei geringeren Proteinkonzentrationen konnte nur die Aktivität des Spaltproduktes beobachtet werden. Die Spuren 2-4 in Abbildung 20 zeigen die Bindung durch Crp1p-Derivate mit zunehmender Verkürzung des C-Terminus. Das stabile Derivat Crp1p<sup>aa1-160</sup> produzierte wie erwartet ein singuläres Signal bei einer etwa 29 kDa entsprechenden Laufweite. Wie auch bei der EMSA-Analyse führte eine weitere Deletion des C-Terminus zum Aktivitätsverlust (Abbildung 20, Spur 6). Das dem C-terminalen Subpeptid von Crp1p ähnliche/identische Crp1p<sup>aa160-465</sup> produzierte wie in der EMSA-Analyse (unter kompetitiven Bedingungen) auch in der *Southwestern*-Analyse kein Signal.



**Abbildung 20: Volle-Länge-Crp1p bindet X-DNA.**

*Southwestern*-Analyse der jeweils angegebenen, rekombinanten Crp1p-Derivaten. Spuren 1 bis 7 enthielten je 3 µg Protein, die eingeschobene Spur 6 µg. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 20%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel wurden die Proteine auf PVDF-Membran übertragen. Die membrangebundenen Proteine wurde in Anwesenheit von Lachsspermien-Kompetitor-DNA (10 µg/ml) mit dem X-DNA Substrat CF110 (8,6 pM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch *Phosphorimaging*. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. Intaktes und gespaltenes Crp1p sind in der Lage X-DNA zu binden, wenn die X-DNA bindende Domäne im jeweiligen Derivat vorhanden ist.

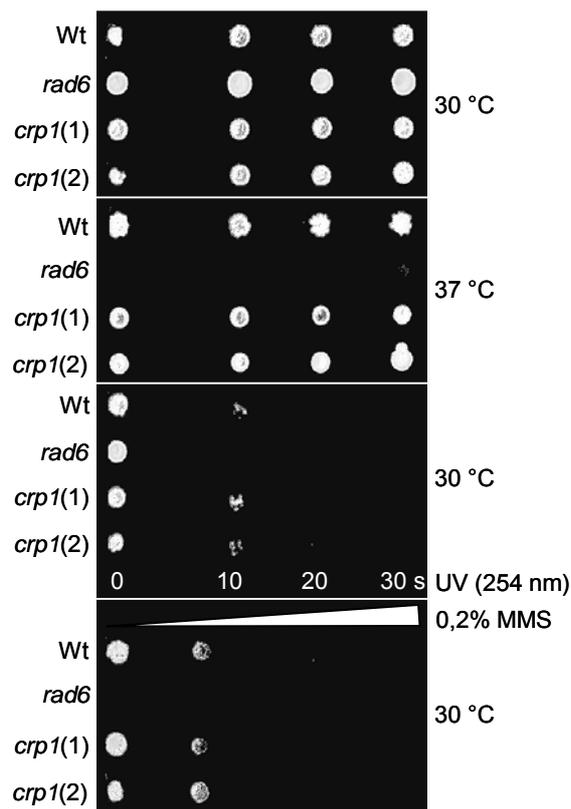
### 3.3. Phänotypische Analyse von *crp1Δ*-Zellen

Nachdem die Identität der X-DNA bindenden Aktivität geklärt war, stellte sich die Frage, ob Crp1p an Vorgängen der genetischen Rekombination beteiligt ist. Da es sich um ein neues, bisher uncharakterisiertes Protein handelte, konnten keine experimentellen Daten für die Planung weiterer Versuche herangezogen werden. Die Hypothese, dass Crp1p die Rekombination beeinflussen könnte, stützt sich auf seine biochemischen Eigenschaften. Das Protein ist geeignet, Holliday-Strukturen, die in Rekombinationsprozessen gebildet werden, selektiv zu binden. Weiterhin haben Versuche zur Stimulation der Holliday-Struktur auflösenden Aktivität von T4 Endonuklease VII gezeigt, dass Crp1p möglicherweise koordiniert mit Rekombinasen an Rekombinationsabläufen teilhaben kann (vgl. Abbildung 4 und Seite 117).

Um die Hypothese der Beteiligung an Rekombinationsprozessen zu testen, wurde der Effekt einer Deletion von *CRP1* auf die rekombinogene DNA-Reparatur bzw. die meiotische Rekombination phänotypisch untersucht.

### 3.3.1. Deletion von CRP1

Für eine phänotypische Analyse sollte zunächst geklärt werden, ob Crp1p zum normalen Wachstum der Zelle benötigt wird. Das Gen *CRP1* wurde im Stamm RS190, aus dem das Genprodukt gereinigt worden war, deletiert (vgl. Seite 55). Der Deletionsstamm  $\Delta crp1$  zeigte normales Wachstum in Vollmedium. Es handelt sich bei *CRP1* also nicht um ein essentielles Gen. Dies wurde inzwischen auch durch eine systematische Deletionsstudie, die 96% aller offenen Leseraster der Hefe umfasst, bestätigt (Giaever *et al.*, 2002). Die Deletionsmutante zeigte außerdem auf Nährboden bei Hitzeinkubation, nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht und bei Inkubation auf einem MMS-Gradienten das gleiche Wachstumsverhalten wie der Ausgangsstamm RS190 (Abbildung 21). Eine genauere Analyse des Wachstums von Stamm  $\Delta crp1$  bestätigte diesen Befund (vgl. Schmiemann, 2001).



**Abbildung 21: Wachstum von *crp1*Δ-Mutanten unter verschiedenen Bedingungen.**

Zellen exponentiell wachsender Kulturen wurden auf die dargestellten Platten getropft (etwa  $10^5$  Zellen je Tropfen). Die Inkubation der Platten erfolgte für vier Tage bei der jeweils angegebenen Temperatur. Der Wildtyp (RS190) und zwei unabhängige *crp1*-Deletionsmutanten zeigten gleiches Wachstumsverhalten auf Vollmedium und vergleichbare Sensitivität gegenüber MMS (Gradient von 0 bis 0,2 % (w/v)) und UV-Bestrahlung (0 bis 30 s bei 254 nm). Der Kontrollstamm  $\Delta rad6$  wuchs nur auf Vollmedium bei 30 °C.

Im Folgenden wurden statt RS190-Stämmen BY-Stämme (vgl. Tabelle 1) aus dem internationalen Deletionsprogramm EUROFAN II<sup>2</sup> für phänotypische Untersuchungen genutzt, um mit einem gut definierten, wildtypischen Stammhintergrund zu arbeiten. RS190 trägt ein mutiertes Topoisomerase-Allel (*top1-8*), das potentiell den DNA-Metabolismus beeinflussen kann, so dass ein möglicher phänotypischer Effekt potentiell auf einer Kombination dieser Mutation und eingeführter Deletionen beruhen könnte. Die Verwendung der BY-Stämme schließt die Möglichkeit eines additiven Effekts weitestgehend aus.

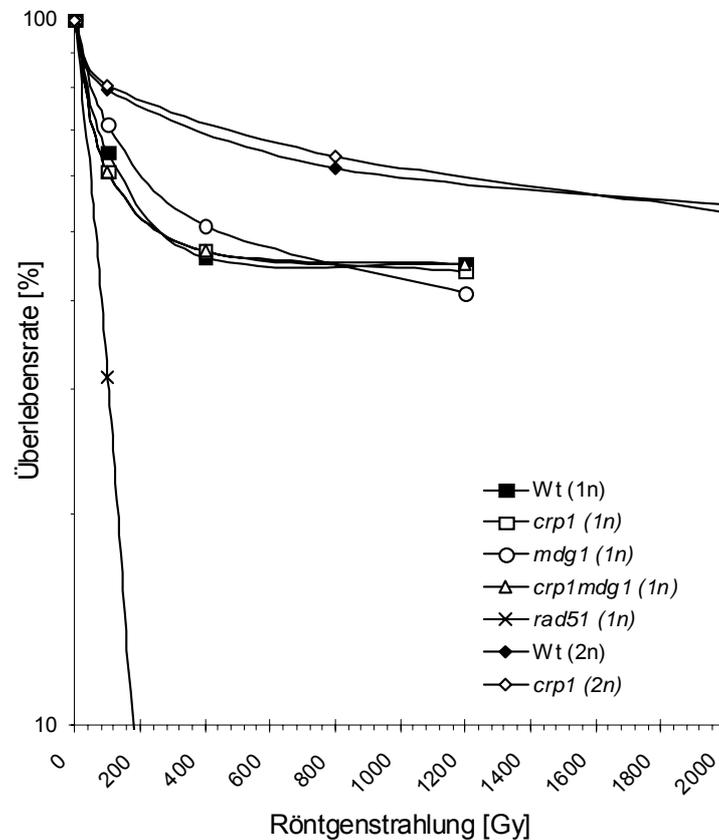
### 3.3.2. Bestrahlung mit Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlen wirken aufgrund ihrer hohen Quantenenergie als physikalische Mutagen und verursachen bei Wechselwirkung mit biologischem Material unter anderem Doppelstrangbrüche in der DNA. Um zu überleben, ist die Zelle auf die Reparatur der eingefügten Doppelstränge angewiesen, was hauptsächlich durch Vorgänge der HR geschieht (Paques & Haber, 1999; Prado *et al.*, 2003). Daher eignet sich die Bestimmung der Überlebensrate einer Hefekultur nach Röntgenstrahlungsexposition zum Nachweis von Defekten in diesem Prozess. Dazu wurden Flüssigkulturen der zu testenden Stämme verschiedenen Energiedosen ausgesetzt. Proben dieser Kulturen wurden ausplattiert und die entstehenden Kolonien nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C ausgezählt (vgl. Seite 57).

Die getesteten Stämme (vgl. Tabelle 1) waren zum einen die Wildtyp-Stämme BY4741 (haploid, 1n) und BY4743 (diploid, 2n), zum anderen isogene Deletionsstämme für *CRP1* (1n und 2n) und *MDG1* (1n). Zusätzlich wurde der haploide Stamm URY13, der Deletionen von *CRP1* und *MDG1* aufweist, getestet. Er wurde wegen der großen Sequenzähnlichkeit der beiden codierten Proteine generiert, um eine eventuelle funktionelle Redundanz von Crp1p und Mdg1p nachzuweisen. Dazu wurde in der *crp1*-Mutante das Gen *MDG1* gegen den Auxotrophiemarker *HIS3* ausgetauscht (vgl. Seite 55). Als Kontrolle für die experimentellen Bedingungen diente eine isogene *rad51*-Mutante. Dieser Stamm, dem das zentrale Strangtransfer-Protein der HR fehlt, ist bekanntermaßen stark in der rekombinationsabhängigen DNA-Reparatur eingeschränkt und entsprechend sensitiv gegenüber Röntgenstrahlen.

---

<sup>2</sup> Details unter: [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/deletions3.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)



**Abbildung 22: Röntgenstrahlungstoleranz von *crp1Δ*-Mutanten.**

Die Stämme BY4741 (Wt, 1n), BY4743 (Wt, 2n), URY4 (*crp1*, 1n), URY7 (*crp1*, 2n), URY8 (*mdg1*, 1n) URY13 (*crp1mdg1*, 1n) und  $\Delta rad51$  wurden auf ihre Toleranz gegenüber Röntgenstrahlung untersucht (für das entsprechende Verfahren vgl. Seite 57).

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt die Überlebensraten der verschiedenen Stämme in Abhängigkeit der verabreichten Energiedosis (Abbildung 22). Die Überlebensrate ergibt sich jeweils aus dem Quotienten des Lebendtiters vor und nach Bestrahlung der Kultur. Dabei stellt der Lebendtitler den Mittelwert aus drei Plattierungen dar. Die Überlebensrate der *rad51* Kontrolle fällt bereits bei einer Energiedosis von 200 Gy auf unter 10%. Der Wildtyp ist deutlich resistenter, wobei Diploidie im Vergleich zu Haploidie zu höherer Widerstandsfähigkeit führt. Die Überlebensrate des diploiden Wildtyps bei 1200 Gy liegt bei ca. 60%, während beim haploiden Stamm 45% der Zellen überleben. Außerdem zeigt sich bei der haploiden Variante ein typischer, früher Abfall der Lebensfähigkeit, der dann in eine langsame,

lineare Abnahme übergeht. Dies liegt daran, dass asynchrone Kulturen Zellen jedes Zellzyklusstadiums enthalten.

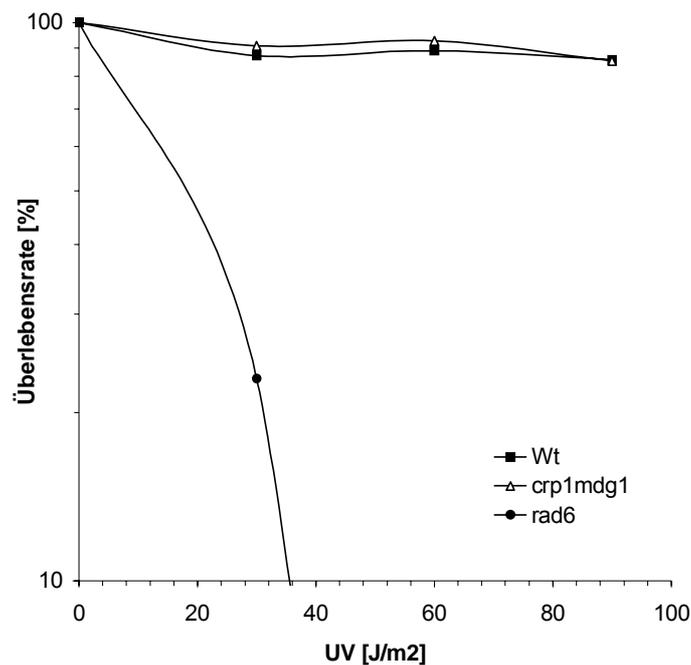
Die Zellen, die zur Zeit der Induktion von Doppelstrangbrüchen gerade in der G<sub>1</sub>-Phase waren, sterben in Ermangelung eines intakten DNA-Donors für die rekombinationsabhängige Reparatur. Die übrig bleibenden haploiden Zelle in der S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus hingegen nutzen das jeweilige Schwesterchromatid des betroffenen mitotischen Chromatids als Donorsequenz. Dieser Effekt ist bei diploiden Zellen weniger drastisch, da sie in der G<sub>1</sub>-Phase auf das homologe Chromosom zurückgreifen können. Trotzdem sind auch hier G<sub>2</sub>-Zellen resistenter als G<sub>1</sub>-Zellen, da das homologe Chromosom nur selten bei induzierten Rekombinationsvorgängen als Donor genutzt wird (Brunborg *et al.*, 1980; Fabre *et al.*, 1984). Auch hier kommt es hauptsächlich zur Rekombination zwischen Schwesterchromatiden (Kadyk & Hartwell, 1992; Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003). Die molekularen Mechanismen sind, unabhängig von der Wahl des Donors, ähnlich (Fasullo *et al.*, 2001; Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003).

Die getesteten Mutanten folgten ohne große Abweichung den Kurvenverläufen der Wildtypen, so dass sich kein Hinweis auf eine mögliche Rekombinationsdefizienz in *crp1*- und/oder *mdg1*-Mutanten ergab. Die Zelle ist jedenfalls zur Reparatur von induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen nicht auf Crp1p angewiesen.

### **3.3.3. Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen**

Ultraviolette (UV) Strahlung verursacht Schädigungen der DNA. Hauptsächlich werden zwei mutagene Photoprodukte, Cyclobutan Pyrimidindimere und (6-4) Photoprodukte, erzeugt. Ihre Reparatur wird durch die Mechanismen der Exzisionsreparatur und bei der Hefe auch durch die sog. Photoreaktivierung, die direkte Reversion des Schadens durch die Photolyasen, vermittelt. Wenn ein solcher Schaden vor seiner Reparatur von einer Replikationsgabel erreicht wird, gibt es zwei Möglichkeiten, den Replikationsvorgang fortzusetzen. Zum einen kann der Schaden toleriert werden, indem eine spezialisierte DNA-Polymerase an Schadstellen beliebige Basen einbaut, was zu Mutationen führt. Zum anderen kann es zur Umkehrung der blockierten Replikationsgabel kommen. Die dabei entstehende DNA-Struktur ist formal eine Holliday-Struktur und kann durch einen rekombinogenen Vorgang prozessiert werden (vgl. auch Seite 133 und Abbildung 41). Um einen möglichen Effekt der

Deletion von *CRP1* auf diesen Vorgang zu untersuchen, wurden geeignete Verdünnungen des haploiden Wildtyps BY4741 der isogenen *crp1Δmdg1Δ*-Doppelmutante ausplattiert und UV-Licht bestrahlt. Als Kontrolle für die experimentellen Bedingungen diente eine isogene *rad6*-Mutante. Dieser Stamm ist bekanntermaßen UV-sensitiv (vgl. Abbildung 21).



**Abbildung 23: UV-Strahlungstoleranz einer *crp1Δmdg1Δ*-Mutante.**

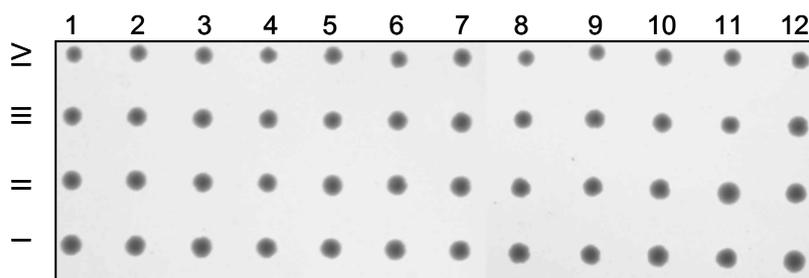
Die Stämme BY4741 (Wt, 1n), URY13 (*crp1mdg1*, 1n) und  $\Delta rad6$  (1n) wurden auf ihre Toleranz gegenüber UV-Strahlung untersucht (für das entsprechende Verfahren vgl. Seite 57).

Die Zellen wurden auf festem Nährboden mit Energiedosen von 30 bis 90 J/m<sup>2</sup> bei 254 nm bestrahlt, 2 bis 3 Tage in Licht geschützter Form (um die Photoreaktivierung zu vermeiden) inkubiert und die entstehenden Kolonien gezählt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt die Überlebensraten der verschiedenen Stämme in Abhängigkeit der verabreichten Energiedosen (Abbildung 23). Die Überlebensrate ergibt sich jeweils aus dem Quotient der überlebenden, Kolonien bildenden Zellen vor und nach Bestrahlung. Dabei ist die Zahl der Kolonien jeweils der Mittelwert aus drei Versuchen. Der Kontrollstamm  $\Delta rad6$  ist unfähig zur wirksamen Postreplikationsreparatur und daher stark UV-sensitiv. Seine Überlebensrate fällt bereits

bei einer Energie von  $30 \text{ J/m}^2$  auf 23%. Der Wildtyp ist mit einer Überlebensrate von über 80% bei  $90 \text{ J/m}^2$  deutlich resistenter. Die getestete Mutante folgt dem Kurvenverlauf des Wildtyps, so dass sich kein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Crp1p (und/oder Mdg1p) an Wiederherstellungsprozessen einer intakten Replikationsgabel ergab.

### 3.3.4. Sporulation von *crp1* $\Delta$ -Zellen

Während der Meiose kommt es bei *S. cerevisiae* zu programmierten DNA-Doppelstrangbrüchen. Sie leiten den Prozess der homologen Rekombination ein, der für die ordnungsgemäße Segregation der homologen Chromosomen notwendig ist. Dabei entstehen Holliday-Strukturen, die ordnungsgemäß prozessiert werden müssen. Bei einem Prozessierungs-Defekt kann es zu aberranter Sporenbildung oder verminderter Lebensfähigkeit der Sporen kommen.



**Abbildung 24: *crp1* $\Delta$ -Zellen bilden lebensfähige Sporen.**

Tetradanalyse der diploiden *crp1*-Deletionsmutante URY7. Gezeigt ist eine Stichprobe von ausgelegten Tetraden (1 bis 12) auf YPDA-Nährboden nach dreitägiger Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$ . Die Sporen (jeweils I bis IV) sind zu 100% zu Kolonien ausgewachsen.

Um zu testen, ob Crp1p eine Rolle in der meiotischen Rekombination spielt, wurde der diploide Stamm URY7 mit einer homozygoten Deletion von *CRP1* zur Sporulation gebracht (vgl. Seite 56) und mikroskopisch mit parallel behandelten wildtypischen Zellen (BY4743) verglichen. Die Deletionsmutante war zur Sporulation fähig und erzielte eine dem Wildtyp vergleichbare Sporulationseffizienz von ca. 30%. Bei mikroskopischer Betrachtung konnte kein Unterschied in der Sporenmorphologie festgestellt werden. Eine Stichprobe der von der Mutante gebildeten Sporen wuchs vollständig zu Kolonien heran (Abbildung 24), so dass man von einer unbeeinträchtigten meiotischen Rekombination ausgehen kann. Damit wurde gezeigt,

dass Crp1p keine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von DNA-Intermediaten in der meiotischen Rekombination spielt.

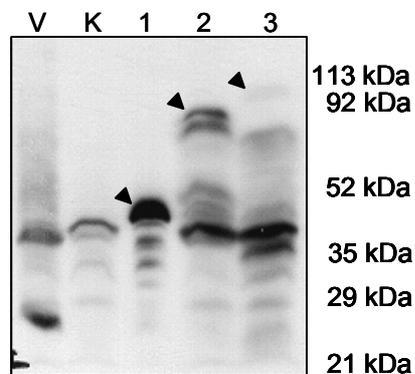
### 3.4. Untersuchungen zu Protein-Protein Wechselwirkungen von Crp1p

#### 3.4.1. Hefe-2-Hybrid-Analyse

Da die phänotypische Analyse von *crp1Δ*-Mutanten keinen Hinweis auf einen Defekt in Rekombinationsvorgängen lieferte, wurde zur möglichen Einordnung von Crp1p in einen molekularen Prozess nach Interaktionspartnern gesucht. Einen effizienten Weg zur Identifikation potentieller Interaktionen bietet die Hefe-2-Hybrid-Methode. Diese Methode beruht auf der Rekonstitution des Transkriptionsfaktors Gal4p. Dieser kann in eine DNA bindende Domäne und eine Aktivierungsdomäne zerlegt werden (GAL4-DNA-BD bzw. GAL4-AD). Je ein Teil wird an ein Köderprotein und an eine Sammlung potentieller Beuteproteine fusioniert. Bei Interaktion von Köder und Beute kommen die Gal4p-Domänen in räumliche Nähe und erlauben eine Gal4p-spezifische Transkription von Reportergenen. Bei den Reportergenen handelt es sich um Auxotrophiemarker und ein Galaktosidase-Gen, so dass die Transkription während des Hefewachstums auf geeignetem Medium phänotypisch verfolgt werden kann. Köder und Beute werden von unterschiedlichen Plasmiden konstitutiv exprimiert, während die Anwesenheit der Plasmide wiederum mittels verschiedener Auxotrophiemarker phänotypisch überwacht werden kann (für eine nähere Beschreibung der Methode vgl. Seite 40).

**Köderprotein Crp1p.** Wegen der bereits beobachteten Anfälligkeit von Crp1p für proteolytische Spaltung stellte sich die Frage, ob eine Hefe-2-Hybrid-Analyse mit dem Protein in voller Länge oder einem verkürzten Derivat vorgenommen werden sollte. Um den Zustand verschiedener Crp1p Varianten in der Hefezelle nach Expression vom Köderplasmid pGBKT7 festzustellen, wurden drei Expressionsplasmide mit unterschiedlichen Anteilen von *CRP1* hergestellt. Plasmid pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-160</sup> codiert Basen 1-480, pGBKT7-Crp1p<sup>aa160-465</sup> Basen 478-1395 und pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-465</sup> Basen 1-1395. Diese Plasmide vermitteln den Phänotyp Trp<sup>+</sup>. Nach Expression in Hefe ergibt sich GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-160</sup>, GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>160-465</sup> und GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>1-465</sup>, also die beiden putativen Spaltprodukte von Crp1p und das Volle-Länge-Protein, je als C-terminale Fusion an der GAL4-DNA-

BD. Eine c-Myc-Epitopmarkierung zwischen der GAL4-DNA-BD und dem Crp1p-Anteil diente der Expressionskontrolle mittels immunologischem Nachweis auf einem *Western-blot* (vgl. Abbildung 25).



**Abbildung 25: GAL4-DND-BD-Crp1p Fusionsproteine.**

Immunologischer Nachweis von GAL4-DNA-BD-Crp1p-Derivaten, welche zur Verwendung im Hefe-2-Hybrid System konstruiert wurden. Kochlysate von Zellen mit Vektor pGBKT7 ohne inserierte Fremd-DNA (10  $\mu$ l, Spur V), ohne Vektor (25  $\mu$ l, Spur K), mit Vektor pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-160</sup> (Spur 1, 1,25  $\mu$ l), mit Vektor pGBKT7-Crp1p<sup>aa160-465</sup> (Spur 2, 10  $\mu$ l) bzw. mit Vektor pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-465</sup> (Spur 3, 10  $\mu$ l) wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membran übertragen. Mit Hilfe eines Anti-Myc Antikörpers wurden die jeweiligen Crp1p-Fusionsproteine nachgewiesen (mit Pfeilen markiert). Die Molekülmassen eines verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben.

Für diesen Nachweis wurden exponentiell wachsende AH109-Flüssigkulturen bei einer optischen Dichte von 1 bei 600 nm geerntet. Die Zellen wurden in 1/20 des Originalvolumens an SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min auf 95°C erhitzt. Diese sog. Kochlysaten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose Membran übertragen und einem immunologischen Nachweis mittels monoklonalem Anti-c-Myc Antikörper unterzogen. Der Vektor pGBKT7 ohne inserierte Fremd-DNA produzierte ein Myc-markiertes Protein mit einer apparenten Molekülmasse von 25 kDa. Dieses Protein entspricht der GAL-4-DNA-BD (Abbildung 25, Spur V). Zusätzlich zeigte sich eine Bande bei ca. 37 kDa, die auch in Abwesenheit des Plasmids auftauchte (Abbildung 25, Spur K). Diese plasmidunabhängige Bande tauchte in allen Spuren auf und wurde bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Das Derivat GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-160</sup> zeigte die stärkste Expression (Abbildung 25, Spur 1) und tauchte als Protein mit apparenter Molekülmasse von 50 kDa auf. Dies entspricht in etwa der Erwartung für das N-terminale Spaltprodukt von Crp1p, das in vorangegangenen Versuchen eine apparente Molekülmasse von 29 kDa aufwies und hier mit einem Protein von ca. 25 kDa fusioniert ist. GAL4-DND-BD-Crp1p<sup>aa160-465</sup>

zeigte moderate Expression und das Produkt GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-465</sup> war nur schwach nachweisbar (Abbildung 25, Spuren 2, 3).

Diese Derivate zeigten apparente Molekülmassen von etwa 70 bzw. 92 kDa. Zusätzlich fanden sich mehrere Signale von Proteinen kleinerer Molekülmassen, die auf Abbau von GAL4-DND-BD-Crp1p<sup>aa160-465</sup> und GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-465</sup> schließen lassen. Der geringe Anteil, vor allem an GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-465</sup>, lässt sich eventuell auf die gleiche Art der Instabilität des Volle-Länge-Proteins, die nach Expression in *E. coli* beobachtet wurde, zurückzuführen. Für den Fall, dass Crp1p auch in Hefe in der Nachbarschaft von Aminosäure 160 gespalten wird, hätte man allerdings die Anreicherung und den Nachweis eines N-terminalen Spaltproduktes der Masse von GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-160</sup> erwartet. Dieses N-terminale Crp1p-Fragment konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden, und es ist unklar, ob dieses weiter abgebaut wurde, oder GAL4-AD-Crp1p<sup>aa1-465</sup> von vorne herein nur schwach exprimiert wurde.

Unabhängig davon wurde entschieden, das stabile Derivat GAL4-AD-Crp1p<sup>aa1-160</sup> als Köder in der 2-Hybrid-Analyse zu verwenden. Falls es *in vivo* zu einer biologisch relevanten Spaltung von Crp1p kommt, sind im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung und die Interaktionen des N-terminalen Fragments, das die X-DNA bindenden Domäne trägt, von Interesse. Zudem ist eine zuverlässig hohe Expression des Köders eine wichtige Voraussetzung für messbare Interaktionen in der Hefe-2-Hybrid-Analyse.

**Beuteproteine.** Die Hefe-Beuteproteine lagen in zwei verschiedenen Genbanken, einer genomischen- und einer cDNA-Bank vor (vgl. Seite 41). Die Banken wurden nacheinander durchmustert (vgl. Seite 42). In beiden Fällen trug das verwendete Beuteplasmid den Auxotrophiemarker *LEU2*.

#### 3.4.1.1. Durchmustern der genomischen Bank

**Kontrollen.** Zunächst wurde das Köderplasmid pGBKT7-Crp1p<sup>aa1-160</sup>, sein Basisplasmid pGBKT7 und das dem Basisplasmid der Bank (pGAD) verwandte Plasmid pGADT7 den notwendigen Kontrollen unterzogen (vgl. Seite 43). Dabei kam es nicht zur Autoaktivierung der Reportergene durch eine intrinsische Aktivität des Köderproteins oder durch die von den Basisvektoren exprimierten Proteinanteile. Damit waren die Voraussetzungen für ein Durchmustern der Bank erfüllt, da phänotypisch

detektierbare Reporterantworten spezifisch für die im jeweiligen Fall enthaltene Kombination von Köder- und Beuteprotein bzw. im falsch-positiven Fall für das Beuteplasmid sein würden.

Außerdem wurde der verwendete Reporterstamm AH109 einer Kontrolle seiner Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* unterzogen. Bei Induktion der Gal4p-spezifischen Transkription durch die Kontrollproteine GAL4-DNA-BD-p53 und GAL4-AD-T-Antigen zeigte AH109 den Phänotyp Ade<sup>+</sup>, His<sup>+</sup>, und es kam zur Blaufärbung auf X- $\alpha$ -Gal-Indikatorplatten durch die *MEL1*-codierte  $\alpha$ -Galaktosidase (Mel1<sup>+</sup>). Ohne entsprechende Induktion zeigte AH109 erwartungsgemäß den Phänotyp Ade<sup>-</sup>, His<sup>-</sup> und keine Blaufärbung.

**Durchmustern der Bank.** AH109 wurde zunächst mit dem Plasmid pGBKT7-Crp1p<sup>aal-160</sup> transformiert. Der pGBKT7-Crp1p<sup>aal-160</sup>-tragende Stamm wurde dann mit der genomischen DNA-Bank transformiert und insgesamt 10<sup>6</sup> Transformanden hälftig auf Selektionsmedium verschiedener Stringenz getestet. Das stringente Medium SD-Ade-His-Leu-Trp lieferte 4 lebensfähige Transformanden, das weniger stringente Medium SD-His-Leu-Trp 128. Die Summe von 132 Transformanden wurde auf SD-Ade-His-Leu-Trp+X- $\alpha$ -Gal umplattiert. Hier zeigten noch 18 Transformanden Wachstum, und in allen Fällen kam es zur Blaufärbung. Diese wurden in Flüssigmedium ohne Tryptophan überimpft und angezogen, um das jeweilige Beuteplasmid zu erhalten, während das Köderplasmid mangels Selektionsdrucks langsam verloren ging. Die Beuteplasmide wurde isoliert, durch Elektroporation in *E. coli* gebracht und propagiert. Die Präparation aus *E. coli* ergab saubere Plasmid-DNA für weitere Analysen. Die enthaltene genomische DNA wurde mittels eines Primers (Sequenz: 5'-ATTACCACTACAATGGATGAT), der in der codierenden Sequenz der GAL4-AD hybridisiert, ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden im Leseraster der GAL4-AD bis zum ersten Stop-Codon in eine Aminosäuresequenz übersetzt und mit Hilfe des Computerprogramms BLAST (auf der Internetseite des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik verfügbar: <http://www.isb-sib.ch/>) mit dem gesamten Satz der Hefeproteine verglichen. Bei vier Kandidaten handelte es sich um Fragmente bekannter Proteine, bei einem Kandidat um ein Fragment eines hypothetischen Proteins (Tabelle 11). Von den übrigen 13 Kandidaten enthielten zwei intergenische DNA und

11 willkürliche Sequenzen, die sich aus Leserasterverschiebung beim Klonieren ergeben haben müssen.

**Tabelle 11: Identifizierte Beuteproteine aus der genomischen Hefe-DNA-Bank.**

Lfd. Nr.	Protein	Funktion des Proteins*	Proteingröße*	gefundenes Fragment
1	Srb8p	Transkriptionsmediator der RNA-Polymerase II	1427 aa	aa 833-864 = 32 aa
2	Utp13p	snoRNA bindendes Protein, an der Prozessierung der 20S Prä-rRNA beteiligt	817 aa	aa 632-689 = 58 aa
3	Rpl12p	Ribosomales Strukturprotein	165 aa	aa 1-165 = 165 aa
4	Iml1p** Hse1p**	unbekannt sortieren von endosomalen Proteinen	1548 aa 452 aa	aa 990-1020 = 31 aa aa 371-437 = 67 aa
5	Yol030wp	hypothetisches Protein	484 aa	aa 78-98 = 21 aa

\*die Angaben zu den jeweiligen Proteinen wurden der *Saccharomyces Genome Database* (verfügbar unter <http://www.yeastgenome.org/>) entnommen; \*\*in diesem Fall handelte es sich um eine Fusion zweier Genfragmente unterschiedlichen Ursprungs

**Kontrolle der gefundenen Interaktionen.** Die in Tabelle 11 aufgeführten Kandidaten wurden zur Durchführung weiterer Kontrollen zur beobachteten 2-Hybrid-Interaktion erneut in AH109 transformiert (für eine genaue Beschreibung vgl. Seite 43). In allen Fällen kam es hier zur Autoaktivierung der Reporter in Abwesenheit des Köderproteins. Das heißt, der Phänotyp Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Trp<sup>+</sup> wurde bei Anwesenheit des Köder-Basisvektors pGBKT7 und des jeweiligen Beutevektors ausgelöst. Damit wurden alle potentiellen Interaktionspartner dieser 2-Hybrid-Analyse ausgeschlossen, denn die Reporterantwort beruhte nicht auf der spezifischen Interaktion mit dem Köder Crp1p<sup>aa1-160</sup>.

Die genomische Bank lieferte also keine reproduzierbaren Interaktionen. Insgesamt war der Anteil an intakt codierten Hefeproteinen an der Gesamtzahl der Kandidaten sehr gering. Von 18 untersuchten Beuteplasmiden codierten nur etwa ein Viertel *bona fide* Hefeproteine. Diese 5 Plasmide codierten wiederum nur für kleine Bereiche (durchschnittlich 75 Aminosäuren) der jeweiligen Proteine, die in Kontrollexperimenten alle in der Lage zur Autoaktivierung der Reportergene waren. Aufgrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurde entschieden, diese genomische DNA-Bank nicht weiter zu verwenden. Es ist anzunehmen, dass sie in zwei bereits vor der hier beschriebenen Analyse durchgeführten Amplifikationen zu stark an Komplexität eingebüßt hatte. Stattdessen wurde im Folgenden auf eine cDNA-Bank zurückgegriffen.

### 3.4.1.2. Durchmustern der cDNA-Bank

Der Stamm AH109 mit dem bereits beschriebenen Köderplasmid pGBKT7-Crp1p<sup>aal-160</sup> wurde mit der im Methodenteil beschriebenen cDNA-Bank transformiert (vgl. Seite 41). Insgesamt wurden  $10^5$  Transformanden auf Selektionsmedium verschiedener Stringenz getestet. Das stringenteste Medium SD-Ade-His-Leu-Trp lieferte 8 Transformanden (von  $0,5 \times 10^5$  getesteten Transformanden), das weniger stringente Medium SD-Ade-Leu-Trp 14 (von  $0,25 \times 10^5$ ) und das am wenigsten stringente Medium SD-His-Leu-Trp 41 (von  $0,25 \times 10^5$ ). Die Summe von 63 Transformanden wurde auf SD-Ade-His-Leu-Trp+X- $\alpha$ -Gal umplattiert. Hier zeigten noch 26 Transformanden Wachstum und Blaufärbung, wobei die verlorenen Transformanden alle von dem wenig stringenten SD-His-Leu-Trp Nährboden stammten. Alle übrig gebliebenen Transformanden wurden in Flüssigmedium ohne Tryptophan überimpft und angezogen, um das jeweilige Beuteplasmid zu erhalten, während das Köderplasmid mangels Selektionsdrucks langsam verloren ging. Die Beuteplasmide wurden isoliert, durch Elektroporation in *E. coli* gebracht und propagiert. Die Präparation aus *E. coli* ergab saubere Plasmid-DNA für weitere Analysen. Die enthaltene cDNA wurde mittels des oben aufgeführten Primers, der in der codierenden Sequenz der GAL4-AD hybridisiert, ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms BLAST (siehe oben) mit dem gesamten Satz der Hefegene verglichen. Bei 22 der 26 Kandidaten wurden Fragmente von Hefegenen identifiziert. 16 von ihnen lagen im Leseraster der GAL4-AD (diese stammten von den Genen *DAT2*, *DRS1*, *EGT2*, *FBA1*, *FPR2*, *GNO1*, *GPM1*, *POR1*, *PYK1*, *RAD53*, *RET1*, *RPA135*, *RPL11*, *RPL12B* (2x) und *WHI2*).

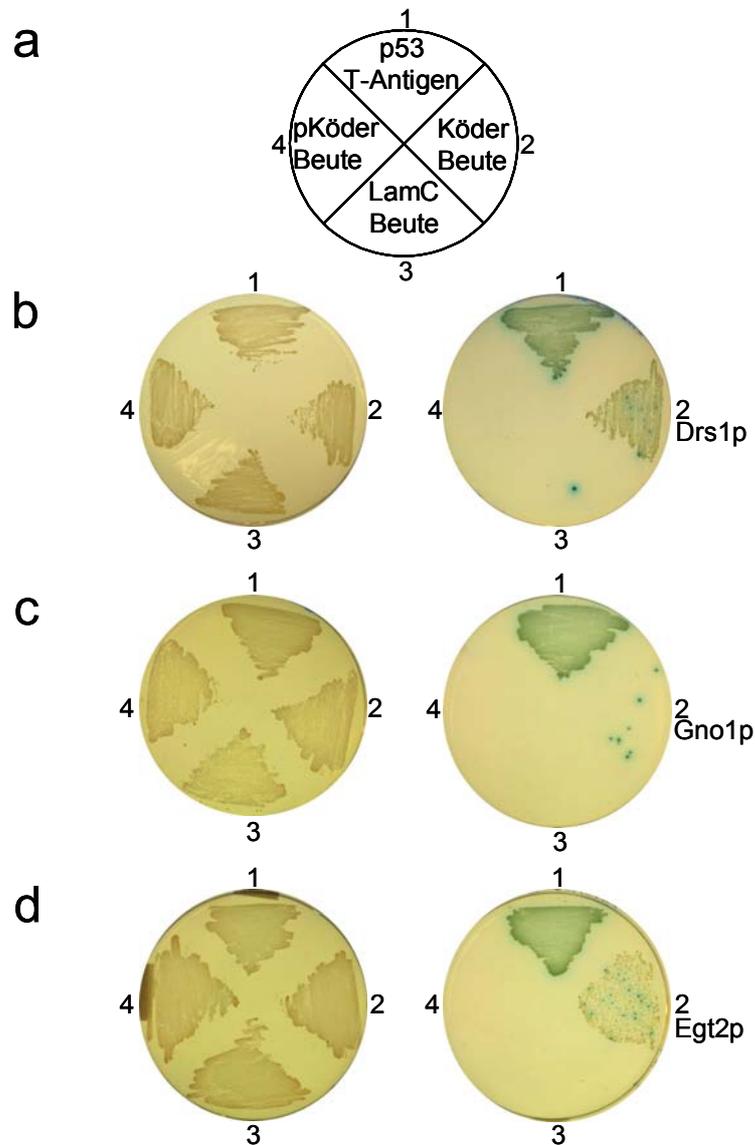
**Kontrolle der gefundenen Interaktionen.** Die 16 Plasmide mit im korrekten Leseraster codierten Kandidatenproteinen wurden zur Durchführung weiterer Kontrollen zur beobachteten 2-Hybrid-Interaktion erneut in AH109 transformiert (vgl. Seite 43). In der Mehrzahl der Fälle kam es zur Autoaktivierung der Reporter in Abwesenheit des Köderproteins. Das heißt der Phänotyp Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Trp<sup>+</sup>Mel<sup>1+</sup> wurde bei Anwesenheit des Basisplasmids pGBKT7 bzw. von Plasmid pGBKT7-LamC und des jeweiligen Beutevektors ausgelöst. In drei Fällen zeigte sich der Phänotyp allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit des Köder- und des Beuteplasmids (vgl.

Tabelle 12 und Abbildung 26), so dass die 2-Hybrid-Interaktion bestätigt werden konnte.

**Tabelle 12: Beutegene aus der c-DNA-Bank mit bestätigter Hefe-2-Hybrid-Interaktion mit Crp1p<sup>aa1-160</sup>.**

Lfd. Nr.	Gen	Funktion des Proteins*	Proteingröße*	gefundenes Fragment
1	<i>DRS1</i>	ATP-abhängige RNA-Helikase, beteiligt an der rRNA Reifung	751 aa	aa 538-751 = 214 aa C-Terminus
2	<i>GNO1</i>	beteiligt an der rRNA Reifung	271 aa	aa 7-271 = 265 aa N-Terminus
3	<i>EGT2</i>	Putative Glukanase, beteiligt an der Zellseparation nach der Cytokinese	1041 aa	aa 14-285 = 272 aa N-Terminus

\*die Angaben zu den jeweiligen Proteinen wurden der *Saccharomyces Genome Database* (verfügbar unter <http://www.yeastgenome.org/>) entnommen

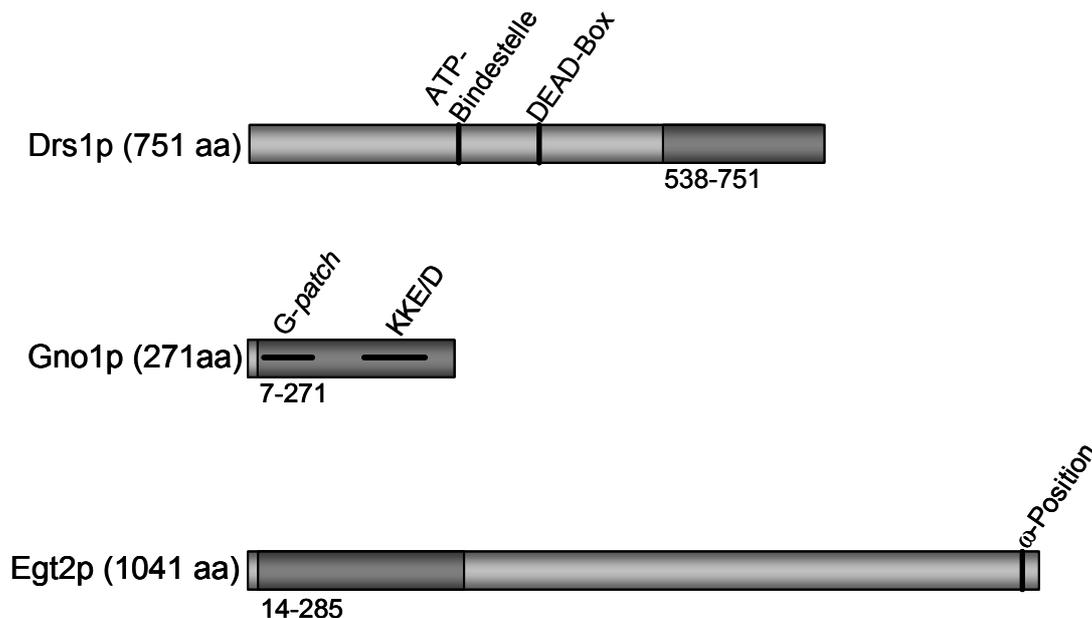


**Abbildung 26: Kontrolle der Hefe-2-Hybrid-Interaktionen von Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit Fragmenten der Proteine Drs1p, Gno1p und Egt2p.**

(a) Schematische Darstellung der Kontroll-Co-Expressionen in AH109: (1) Positivkontrolle für die Reporterantwort mit p53/großes T-Antigen des SV40-Papovavirus; (2) die zu kontrollierende Interaktion zwischen dem Köderprotein Crp1p<sup>aa1-160</sup> und dem jeweiligen Beuteprotein; (3) Negativkontrolle mit dem jeweiligen Beuteprotein und Lamin C; (4) Negativkontrolle mit dem jeweiligen Beuteprotein und dem Köder-Basisvektor (pKöder). Nach diesem Schema wurden gleiche Volumina (15 µl) entsprechender Flüssigkulturen von AH109 bei gleicher optischer Dichte ( $OD_{600nm} = 2$ ) auf SD-Leu-Trp Platten (links, Kontrolle auf Anwesenheit der Plasmide) bzw. auf SD-Ade-His-Leu-Trp+X- $\alpha$ -Gal Indikatorplatten (rechts, Kontrolle auf eine Reporterantwort) ausgestrichen. Bei den Beuteproteinfragmenten von (b) Drs1p, (c) Gno1p und (d) Egt2p kam es in Kombination mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> zur Reporterantwort, d.h. der Phänotyp Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Trp<sup>+</sup>Mel1<sup>+</sup> war nachzuweisen. In allen drei Fällen blieb das Wachstum der Negativkontrollen auf SD-Ade-His-Leu-Trp Nährboden aus, während die Positivkontrolle erwartungsgemäß den Phänotyp Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Leu<sup>+</sup>Trp<sup>+</sup>Mel1<sup>+</sup> zeigte.

### 3.4.1.3. Abhandlung der gefundenen Interaktionspartner.

Von den drei bestätigten 2-Hybrid-Interaktionspartnern von Crp1p sind zwei am gleichen molekularen Prozess beteiligt. Drs1p (Ripmaster *et al.*, 1992) und Gno1p (Guglielmi & Werner, 2002) sind Faktoren der Prozessierung des primären 35S rRNA Transkripts während der rRNA-Reifung.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der bestätigten Hefe-2-Hybrid-Interaktionspartner von Crp1p.**

Die drei Proteine Drs1p, Gno1p, und Egt2p sind in ihrer relativen Größe gezeigt. Die von den isolierten Beuteplasmiden codierten Fragmente der Proteine sind hervorgehoben, und ihre Lage in Aminosäurepositionen ist angegeben. Einzelne Sequenzmerkmale sind markiert (weitere Erklärungen im Text).

Dabei gehört Drs1p (Abbildung 27) zu den DEAD-Box RNA-Helikasen (de la Cruz *et al.*, 1999), während Gno1p (Abbildung 27) ein anderes, für RNA bindende Proteine typisches Sequenzmotiv besitzt. Dabei handelt es sich um das sog. *G-patch* (Aravind & Koonin, 1999) mit sieben Glycinresten zwischen Aminosäuren 25 und 72. Darüber hinaus finden sich N-terminale KKE/D-Wiederholungen, die typisch für RNA prozessierende Proteine sind. Mutationen in beiden Proteinen führen zur defekten Ribosomenbiogenese und zur drastischen Herabsetzung der Lebensfähigkeit. Die Interaktion dieser beiden Proteine mit Crp1p erscheint in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen ist die Interaktion mit Proteinen, die im selben molekularen Prozess wirken, ein Indiz für die Richtigkeit des Befundes. Zum anderen handelt es sich um Proteine die

mit Nukleinsäuren interagieren. Es handelt sich zwar bei ihrer Zielstruktur nicht um DNA, aber dennoch sind Gemeinsamkeiten bei der Architektur der hoch strukturierten rRNA und dem X-DNA Substrat, das von Crp1p gebunden wird, denkbar. Man könnte dieses Ergebnis also dahingehend deuten, dass die eigentliche Zielstruktur von Crp1p nicht X-DNA, sondern strukturierte RNA ist.

Der dritte Interaktionspartner, Egt2p (Abbildung 27), ist an der Separation von Mutter- und Tochterzelle nach der Cytokinese beteiligt (Kovacech *et al.*, 1996). Das Protein wird sezerniert und über eine C-terminale, sog.  $\omega$ -Region an der Zellwand verankert (Hamada *et al.*, 1999), wo es vermutlich als Glukanase wirkt (Pan & Heitman, 2000). Wenn Crp1p *in vivo* wirklich Nukleinsäuren bindet, so ist eine Wechselwirkung mit diesem Kandidaten unwahrscheinlich.

### 3.4.2. Biochemische Analyse der gefundenen Interaktionen

Die 2-Hybrid-Analyse zeigte die Interaktion zwischen Fragmenten von Drs1p, Gno1p und Egt2p mit Crp1p<sup>aa1-160</sup>. Während damit erste Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen der biologischen Bedeutung von Crp1p gegeben waren, sollte einer 2-Hybrid-Analyse immer ein experimentell unabhängiger, biochemischer Test der Befunde folgen. Dazu wurden Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen den einen Interaktionspartner, um den anderen Interaktionspartner zu präzipitieren. Wenn diese Co-Präzipitation möglich ist, muss eine Interaktion der beiden Proteine vorgelegen haben.

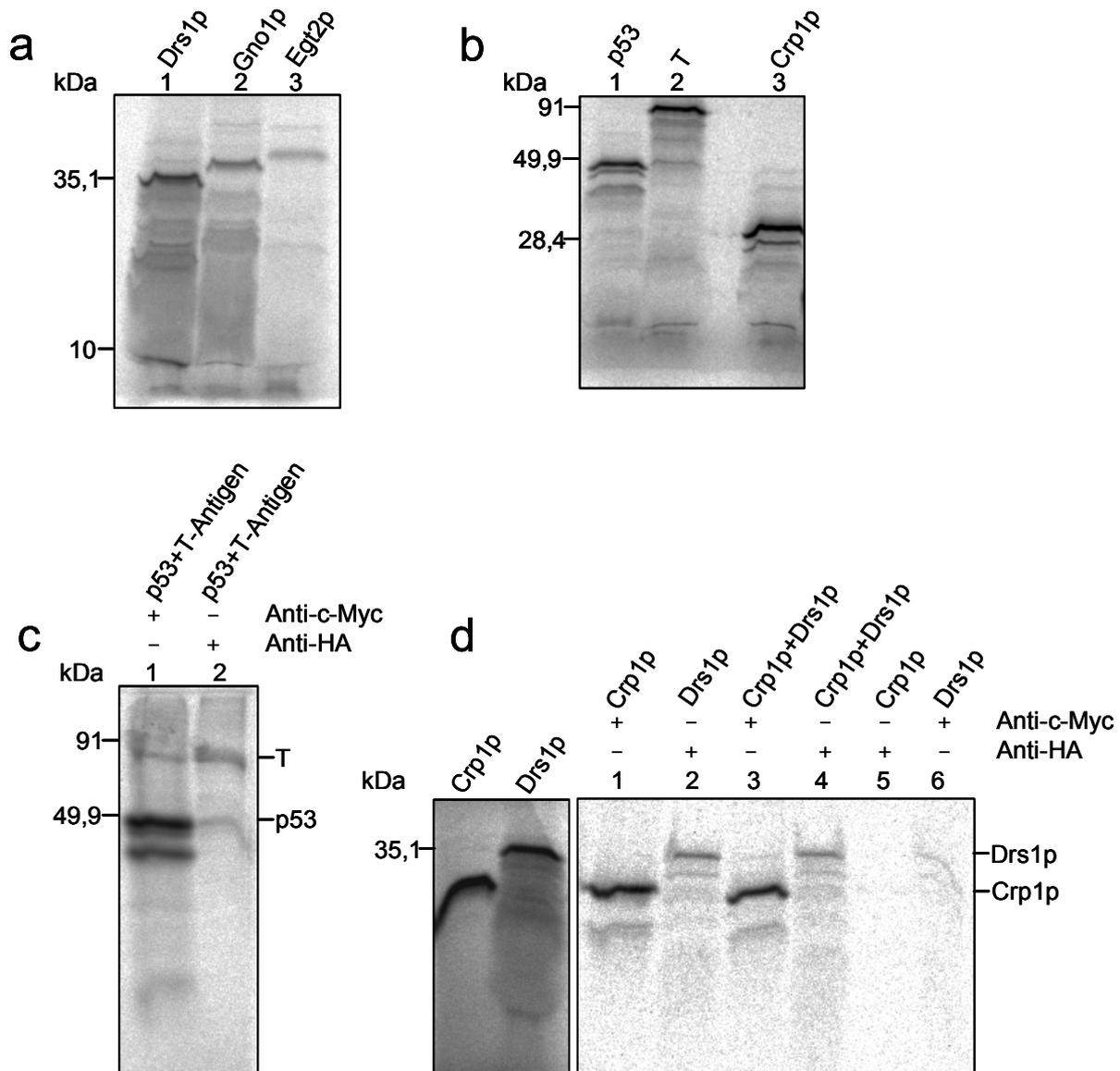
#### 3.4.2.1. Immunopräzipitation *in vitro* exprimierter Proteine

Bei dieser Variante der Immunopräzipitation wurden die Köder- und Beuteproteine *in vitro* transkribiert und translatiert (vgl. Seite 33). Dabei erfolgte eine radioaktive Markierung der Proteine durch Einbau von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin, so dass später ein einfacher Nachweis durch *Phosphorimaging* möglich war. Crp1p<sup>aa1-160</sup> wurde direkt vom Köderplasmid pGBKT7 exprimiert. Durch Transkription vom T7-Promotor, der zwischen der codierenden Region für die GAL4-DNA-BD und dem Ködergen liegt, entsteht dabei c-Myc-Crp1p<sup>aa1-160</sup> (vgl. Abbildung 5). Die c-Myc-Epitopmarkierung diente der Präzipitation durch einen monoklonalen Antikörper. Die Beutegene wurden von den Beuteplasmiden durch PCR amplifiziert und dabei mit einem T7-Promotor und

der codierende Sequenz für eine N-terminale HA-Epitopmarkierung versehen (vgl. Seite 44). Das PCR-Produkt diente als Matrize für die *in vitro* Expression. Die HA-Epitopmarkierung diente der Präzipitation durch einen monoklonalen Antikörper.

Die *in vitro* exprimierten Beuteproteinfragmente sind in Abbildung 28a dargestellt. Die Produkte ergeben sich jeweils aus einem Methioninrest, der 10 Aminosäuren umfassenden Epitopmarkierung, einem 12 Aminosäuren umfassenden Übergang zum Beuteprotein und dem Beuteproteinanteil selbst. Daraus ergeben sich 237 Aminosäuren für das Drs1p- und 288 Aminosäuren für das Gno1p-Derivat mit apparenten Molekülmassen von 36 bzw. 40 kDa. Die *EGT2*-Sequenz trägt nicht das geneigene Stop-Codon. Daraus resultiert eine willkürliche Sequenz von 22 Aminosäuren, die eine Folge von 12 Argininresten beinhaltet, am C-Terminus des Egt2p-Derivats, das damit insgesamt 317 Aminosäuren umfasst und eine apparente Molekülmasse von etwa 45 kDa aufweist.

Die Unterschiede in der Signalstärke ergeben sich zum Teil aus der Anzahl an Methioninresten, die in einem Derivat vorkommen. Im Falle von Drs1p und Gno1p sind es jeweils vier, bei Egt2p nur drei. In Abbildung 28b sind die als Positivkontrolle verwendeten Proteine c-Myc-p53 und HA-T-Antigen, sowie das Köderprotein c-Myc-Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit apparenten Molekülmassen von 49, 90 bzw. 29 kDa dargestellt. Die Positivkontrollen wurden von den Vektoren pGBKT7-p53 und pGADT7-T exprimiert. Beide Proteine wurden in gleichen Mengen bezüglich der radioaktiven Signale gemischt und präzipitiert (Abbildung 28c). Bei Verwendung des Antikörpers gegen die c-Myc-Epitopmarkierung an p53 wurde ein Anteil an T-Antigen co-präzipitiert. Im Gegenexperiment wurde p53 bei Verwendung des Anti-HA Antikörpers co-präzipitiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Anti-HA Antikörper unter den vorliegenden Bedingungen nur einen geringen Anteil seines Zielproteins präzipitierte, weshalb die Signale bei diesem Ansatz insgesamt schwächer ausfielen.



**Abbildung 28: In vitro Translation und Co-Immunopräzipitationsexperimente.**

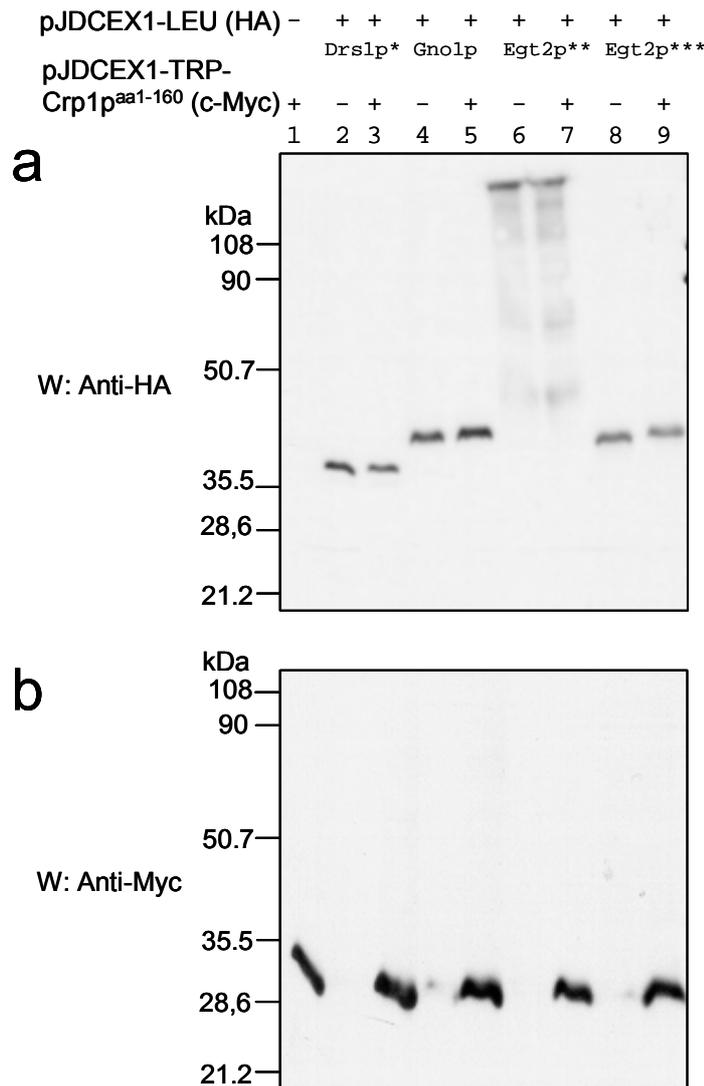
(a) Beuteproteinfragmente von Drs1p, Gno1p und Egt2p, die *in vitro* von der aus der cDNA-Bank isolierten DNA-Sequenz translatiert wurden (vgl. Seite 33) und (b) *in vitro* translatierte Kontrollproteine p53/großes T-Antigen des SV40-Papovavirus und Köderprotein Crp1p<sup>aa1-160</sup>. Je 5 µl eines 50 µl-Expressionsansatzes wurden in 15%-igen (w/v) SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und radioaktiv markierte Proteine mittels *Phosphorimaging* nachgewiesen. Die Laufweiten und Molekülmassen der verwendeten Molekulargewichtsmarker sind angegeben. (c) Co-Immunopräzipitationsexperiment (vgl. Seite 44) mit p53 und dem T-Antigen und (d) mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> und dem Beuteproteinfragment Drs1p. Die Präzipitate der einzelnen Reaktionen wurden je in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgeköcht, der Überstand in 15%-igen (w/v) SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und radioaktiv markierte Proteine mittels *Phosphorimaging* nachgewiesen. Die Laufweiten und Molekülmassen der verwendeten Molekulargewichtsmarker sind angegeben. Weiterhin ist der jeweils zur Präzipitation verwendete Antikörper angezeigt. Crp1p<sup>aa1-60</sup> und p53 trugen eine c-Myc- alle anderen Proteine eine HA-Epitopmarkierung. Die ersten beiden Spuren in (d) zeigen das Ausgangsmaterial der Immunopräzipitation (5 µl). Jeweils die doppelte Menge wurde in einem Co-Immunopräzipitationsexperiment eingesetzt.

Abbildung 28d zeigt den Versuch der Co-Immunopräzipitation von Drs1p und Crp1p und die Kontrollreaktionen der einzelnen Proteine mit jeweils dem Anti-HA Antikörper und dem Anti-c-Myc Antikörper. Die Proteine lassen sich mit dem jeweils spezifischen Antikörper präzipitieren und zeigen keine Kreuzreaktion mit dem jeweils für das andere Protein spezifischen Antikörper. Eine Co-Immunopräzipitation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Entsprechende Versuche mit Gno1p und Egt2p wurden ebenfalls durchgeführt, lieferten aber keine auswertbaren Ergebnisse (nicht gezeigt). Beide Proteine zeigten schon nach der Expression nur relativ schwache Signale, und konnten nach einer Präzipitation mit dem für sie spezifischen Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten war das Ausbleiben einer nachweisbaren Co-Immunopräzipitation nicht aussagekräftig.

Als Alternative zum dargestellten Vorgehen wurde die Expression der Beuteproteine und des Köderproteins in Hefe, mit anschließender Immunopräzipitation, gewählt. Dies hat mehrere Vorteile: (1) man kann leicht mehr Protein herstellen, das darüber hinaus (2) im natürlichen Zustand vorliegt. Da die Interaktion der Proteine in Hefe-Lysaten getestet wird, kann man auch (3) indirekte Interaktionen nachweisen.

#### **3.4.2.2. Co-Immunopräzipitation von in Hefe exprimierten Proteinen**

Bei dieser Variante der Immunopräzipitation wurden die Köder- und Beuteproteine im Hefestamm W303-1A exprimiert. Crp1p<sup>aa1-160</sup> trug eine c-Myc-Epitopmarkierung, die Beuteproteine je eine HA-Epitopmarkierung. Die Expression erfolgte auf Basis der Vektoren pJD-CEX1-LEU und pJD-CEX1-TRP unter der Kontrolle des konstitutiven CUP1-Promotors (vgl. Seite 54). Die Proteine wurden jeweils einzeln oder in Köder/Beute-Kombination exprimiert (vgl. Seite 32) und nach Herstellung von Lysaten auf einem *Western-blot* immunologisch nachgewiesen (vgl. Seite 39). Abbildung 29 zeigt die Expression der einzelnen Proteine (Spuren 1, 2, 3, 6 und 8) und die Expression der Köder/Beute-Kombinationen (Spuren 3, 5, 7 und 9). Die Proteine wurden erwartungsgemäß exprimiert und konnten mittels ihrer Epitopmarkierungen nachgewiesen werden.

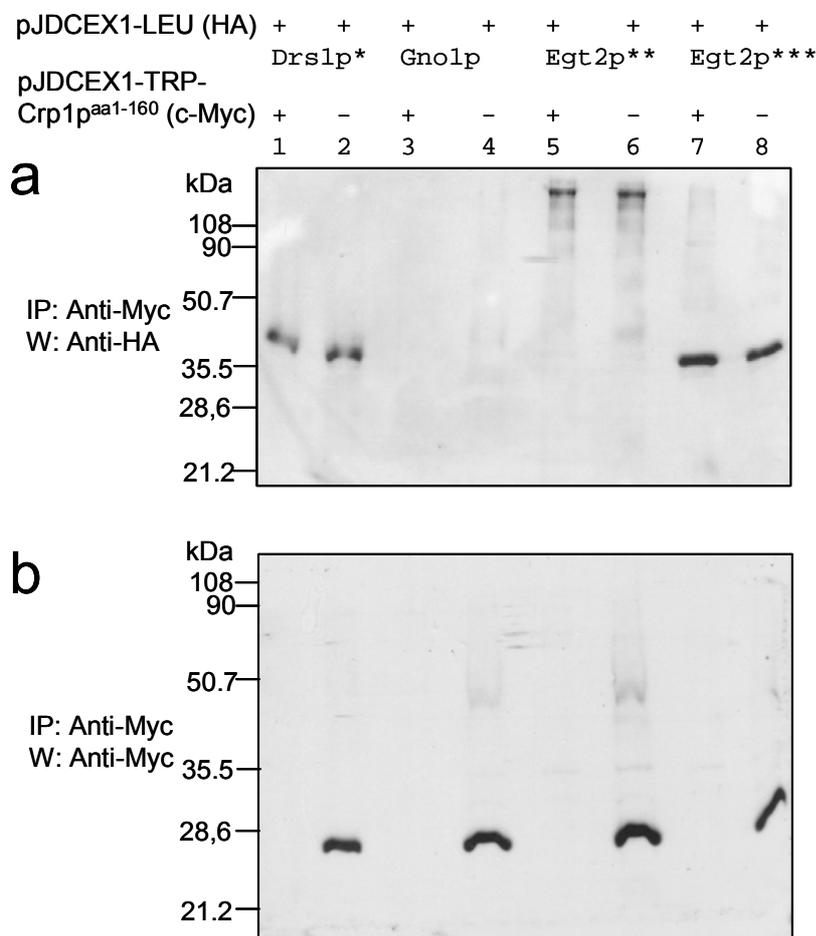


**Abbildung 29: In *S. cerevisiae* exprimierte Köder- und Beuteproteine für Co-Immunopräzipitationsexperimente.**

Je 3  $\mu$ l Lysat (vgl. Seite 32) von Zellen, die je ein Köder- oder Beuteprotein bzw. eine Kombination von beiden über verschiedene pJDCEX1-Derivate exprimierten (enthaltene Vektoren sind durch + oder - über der Abbildung angegeben), wurden in einem 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membran übertragen. Mit Hilfe eines **(a)** Anti-HA Antikörpers bzw. **(b)** eines Anti-Myc Antikörpers wurden die Epitopmarkierung tragenden Proteine immunologisch nachgewiesen. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. (W steht für *Western*, \*aa538-752 \*\*aa1-1001 \*\*\*aa14-285).

*DRS1* konnte in mehreren Versuchen nicht in voller Länge kloniert werden. Deshalb wurde hier das ursprünglich in der 2-Hybrid-Analyse identifizierte Fragment verwendet ( $\text{Drs1p}^{\text{aa538-752}}$ ). *Gno1p* und *Egt2p* wurden als Volle-Länge-Proteine exprimiert. Dabei stellte sich heraus, dass *Egt2p* in voller Länge in W303-1A-Lysaten nicht nachweisbar ist. Erst als ein Fragment ohne die für die Zellwandverankerung notwendige  $\omega$ -Region verwendet wurde, konnte ein entsprechendes Protein

nachgewiesen werden. Außer dieser Variante von Egt2p, die Aminosäuren 1-1001 umfasst, wurde auch Egt2p<sup>aa14-285</sup>, welches dem in der 2-Hybrid-Analyse identifizierten Fragment entspricht, verwendet.

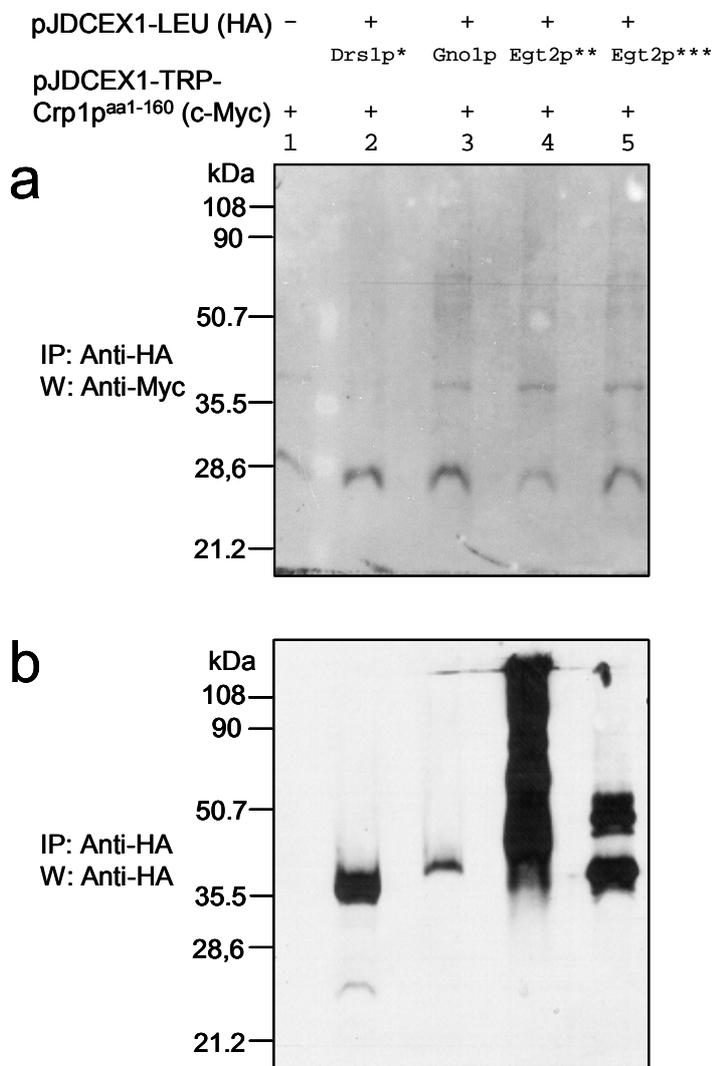


**Abbildung 30: Co-Immunopräzipitationsexperiment von in *S. cerevisiae* exprimierten Köder- und Beuteproteinen mit einem Anti-Myc Antikörper.**

Die Präzipitate (vgl. Seite 45) der einzelnen Reaktionen wurden je in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht, der Überstand in 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membran übertragen. Das in einer Reaktion enthaltene Beuteprotein bzw. die jeweilige Köder-/Beuteprotein-Kombination ist über der Abbildung angegeben. **(a)** Immunopräzipitation (IP) mit Hilfe eines Anti-Myc Antikörpers und immunologischer Nachweis durch einen Anti-HA Antikörper (W steht für *Western*). **(b)** Kontrollreaktionen: Immunopräzipitation (IP) und immunologischer Nachweis mit Hilfe eines Anti-Myc Antikörpers, um die ordnungsgemäße Expression/Präzipitation von Crp1p<sup>aa1-160</sup> zu testen. Die Laufweiten und Molekulmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. (\*aa538-752 \*\*aa1-1001 \*\*\*aa14-285).

Mit den in Abbildung 29 gezeigten Lysaten wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt (vgl. Seite 45). Dabei konnten die Beuteproteine nicht mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> co-präzipitiert werden (Abbildung 30). In den Fällen, in denen ein Signal für ein Beuteprotein beobachtet werden konnte, fand es sich

auch in der entsprechenden Negativkontrolle ohne Crp1p<sup>aa1-160</sup> (Abbildung 30, Spuren 1, 5, 7 und Kontrollspuren 2, 6, 8). Abbildung 30b zeigt, dass Crp1p<sup>aa1-160</sup> indessen wie erwartet präzipitiert wurde.



**Abbildung 31: Co-Immunopräzipitationsexperiment von in *S. cerevisiae* exprimierten Köder- und Beuteproteinen mit einem Anti-HA Antikörper.**

Die Präzipitate (vgl. Seite 45) der einzelnen Reaktionen wurden je in 30  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgekocht, der Überstand in 12%-igen (w/v) SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membran übertragen. Alle Reaktionen enthalten das Köderprotein Crp1p<sup>aa1-160</sup> und kein (Spur 1) bzw. das jeweils über der Abbildung angegebene Beuteprotein. **(a)** Immunopräzipitation (IP) mit Hilfe eines Anti-HA Antikörpers und immunologischer Nachweis durch einen Anti-Myc Antikörper (W steht für *Western*). **(b)** Kontrollreaktionen: Immunopräzipitation (IP) und immunologischer Nachweis mit Hilfe eines Anti-HA Antikörpers, um die ordnungsgemäße Expression/Präzipitation der jeweiligen Beuteproteine zu testen. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben. (\*aa538-752 \*\*aa1-1001 \*\*\*aa14-285).

Die Gegenprobe, nämlich der Versuch, Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit einem der Beuteproteine zu präzipitieren, brachte das gleiche, negative Ergebnis (Abbildung 31). Während die

Beuteproteine präzipitiert wurden (Abbildung 31b), ergab sich für Crp1p<sup>aa1-60</sup> in allen Fällen nur ein Hintergrund-Signal, wie es auch in Abwesenheit der Beuteproteine zu finden war (vgl. Abbildung 31a, Spuren 1 und 2 bis 5). Die Crp1p-Signale bei Verwendung der Beuteproteine Drs1p<sup>aa538-752</sup> und Gno1p waren zwar etwas intensiver als das Hintergrundsignal, aber insgesamt erbrachte der Versuch keine eindeutige Bestätigung der 2-Hybrid-Interaktionen.

Die biochemische Untersuchung der in der 2-Hybrid-Analyse gefundenen Kandidaten konnte also die Interaktion mit Crp1p nicht verifizieren. Dieser Befund ist nicht als Falsifizierung möglicher Interaktionen zu bewerten, da nicht jede *in vivo* auftretende Interaktion durch eine Co-Immunopräzipitation *in vitro* nachweisbar ist. Ein alternativer biochemischer Test wurde aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr unternommen.

### 3.5. Weiterführende Experimente

#### 3.5.1. Crp1p und Mdg1p

Mdg1p ist das Protein mit der größten Sequenzähnlichkeit zu Crp1p. Die Homologie zu Crp1p ist im N-terminalen Bereich von Aminosäure 1-160 mit 41% Sequenzidentität am stärksten. Über die gesamte Sequenz des 366 Aminosäuren großen Mdg1p ergibt sich immer noch eine Identität von 28%.

Eine genetische Studie zu *MDG1* legt die Vermutung nahe, dass das Protein eine Rolle in der Zellantwort auf Pheromone bei der Paarung von *S. cerevisiae* spielt. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Abschwächung eines Phänotyps, der durch ein defizientes G-Protein der Signaltransduktion verursacht wird, wenn Mdg1p überexprimiert wird (Leberer *et al.*, 1996). Darüber hinaus sind keine Daten zu Mdg1p verfügbar. Das Protein wurde hier in Hinblick auf seine Ähnlichkeit zu Crp1p betrachtet (Abbildung 32). Da sich passend zur X-DNA-Bindedomäne von Crp1p eine ähnliche Ansammlung positiver Ladungen in Mdg1p fand, stellte sich die Frage, ob auch Mdg1p in der Lage ist, X-DNA zu binden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden drei Mdg1p-Derivate in ein pET-11a-Derivat kloniert (vgl. Seite 52). Die konstruierten Expressionsplasmide, pUR107, pUR108 und pUR109, codierten die Zielproteine Mdg1p<sup>aa1-120</sup>, Mdg1p<sup>aa1-263</sup> und Volle-Länge-Mdg1p (aa 1-366) je mit N-terminalem His-tag, um die Reinigung der Proteine zu vereinfachen.

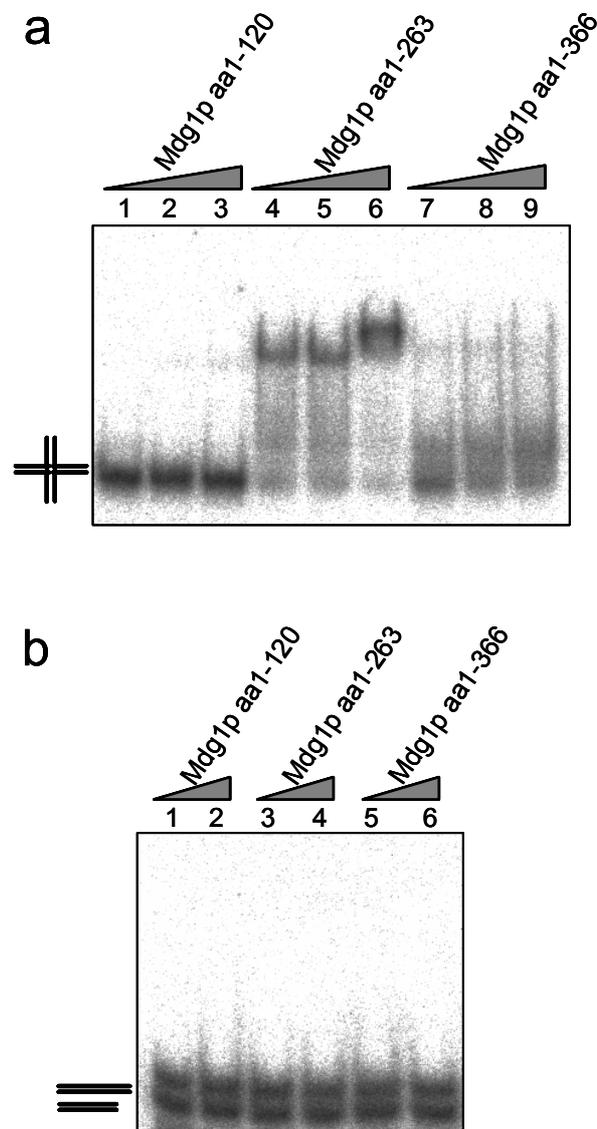
Die Expression der auf Sequenzebene kontrollierten Plasmide erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS und die Reinigung der Zielproteine mit Hilfe einer Ni-NTA-Matrix (vgl. Seite 47). Die apparenten Molekülmassen entsprachen mit 23 kDa für Mdg1p<sup>aa1-120</sup>, 45 kDa für Mdg1p<sup>aa1-263</sup> und 65 kDa für Mdg1p<sup>aa1-366</sup> in etwa denen vergleichbarer Crp1p-Derivate (vgl. Abbildung 16). Die Mdg1p-Derivate blieben im Gegensatz zu Crp1p stabil, so dass keine Spaltprodukte beobachtet wurden. Die Derivate wurden in Anwesenheit von Poly(d[I-C]) auf X-DNA-Bindung getestet. Die EMSA-Analyse (Abbildung 33a) zeigte, dass Mdg1p<sup>aa1-120</sup> wie das korrespondierende Crp1p-Derivat keine X-DNA bindende Aktivität besitzt. Mdg1p<sup>aa1-263</sup> hingegen, das die zur X-DNA-Bindedomäne von Crp1p korrespondierende Region trägt, zeigte X-DNA-Bindung. Erstaunlicherweise nahm die Affinität zu X-DNA beim Volle-Länge-Protein wieder stark ab. Dieser Befund könnte bedeuten, dass die DNA bindende Region von Mdg1p im Protein verborgen liegt und erst durch eine Konformationsänderung/Spaltung des Volle-Länge-Proteins aktiv wird. Ob ein solcher Vorgang natürlicherweise auftritt, ist bisher nicht untersucht worden.

Ein Test mit den vom X-DNA Substrat abgeleiteten Doppelstrang-Substraten (vgl. Seite 21) in Abwesenheit von Poly(d[I-C]) zeigte, dass die beobachtete X-DNA-Bindung auch bei Mdg1p strukturspezifisch ist, denn die Kontrollsubstrate wurden nicht erkannt (Abbildung 33b).

		1		50
Cbplp	(1)	MSSSELMFN	YTF	SWPAGPKD
Mdglp	(1)	-MQSSL	PQFTEK	WPKGPEAI
Konsensus	(1)	L	NFTF	WP GP IILTGT
				FDDWR
				GTLPLVK
				TAKGN
				FEITL
				MPVK
		51		100
Cbplp	(51)	LANKDD	TFFQ	FKFIV
Mdglp	(50)	FDSPSS	KFYFK	FIVD
Konsensus	(51)	F	FKFIV	DG W S
				YK I
				EG
				EN
				FI
				DLI
				E A
		101		150
Cbplp	(101)	GASRI	PEAG	LLCG
Mdglp	(99)	SSTLV	PESAG	LAVS
Konsensus	(101)	AS	IPEA	AGL K
				P A
				KK
				KK
				KR
				K
				K S
		151		200
Cbplp	(150)	-NKK	SNE	SLDD
Mdglp	(149)	IFSQ	EVV	ELP
Konsensus	(151)	L	D	EDE
				T
				G
				S
				T
				I
				V
				E
		201		250
Cbplp	(199)	HLL	PID	QSAD
Mdglp	(195)	AIK	PYE	ENH
Konsensus	(201)	I	P	D
				N
				LV
				G
				L
				D
				L
		251		300
Crplp	(249)	NKKE	EVPE	VAG
Mdglp	(220)	GKTQ	-----	SS
Konsensus	(251)	K		ES
				L
				E
				S
				DD
				D
				A
				S
		301		350
Cbplp	(299)	EAV	TPL	INE
Mdglp	(261)	EASE	DQ	NKEP
Konsensus	(301)	EA		EP
				I
				SA
				E
				E
				L
				I
				V
		351		400
Cbplp	(349)	DGS	KK	VEN
Mdglp	(311)	PTGK	-----	VA
Konsensus	(351)	K		TD
				QT
				E
				K
				AP
				A
				K
		401		450
Cbplp	(398)	EKK	KK	Q
Mdglp	(344)	IEA	KK	A
Konsensus	(401)	KK		K
				SK
				P
				K
				T
				P
				K
		451		468
Cbplp	(448)	EPK	KK	KT
Mdglp	(349)	KNP	AK	NG
Konsensus	(451)	K		G
				FF
				KL
				L
				K

Abbildung 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Crp1p und Mdg1p.

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen von Crp1p (465 aa) und Mdg1p (366 aa) aus *S. cerevisiae* sowie eine abgeleitete Konsensus-Sequenz. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren grau. Die X-DNA bindende Domäne von Crp1p (aa 120 bis 141) und der korrespondierende Bereich von Mdg1p (aa 118 bis 139) sind mit einem Rahmen markiert.

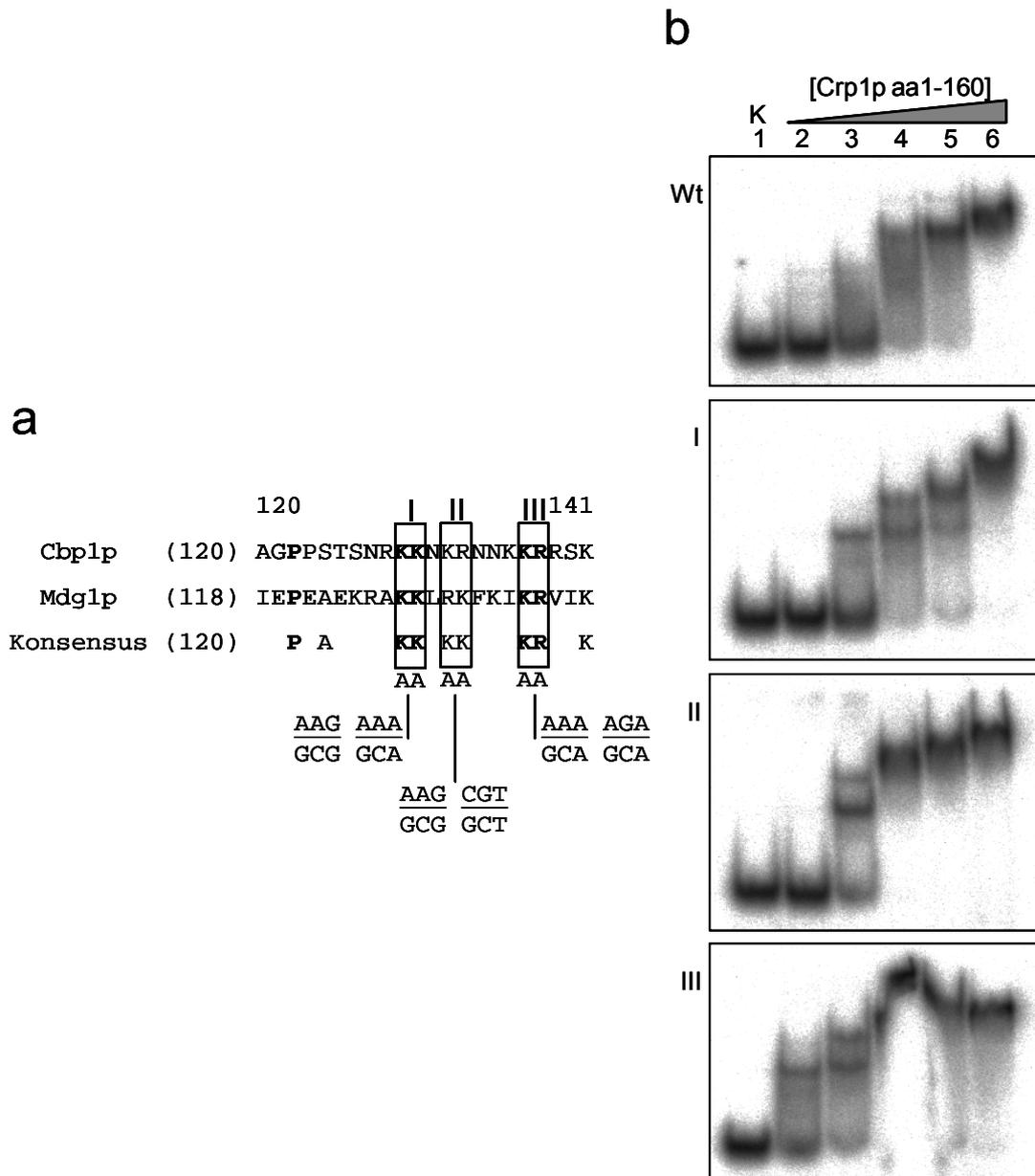


**Abbildung 33: Mdg1p bindet X-DNA.**

EMSA-Analyse von rekombinantem Mdg1p. Die mit Symbolen dargestellten DNA-Substrate (je 0,1 nM) wurden mit steigenden Mengen der angegebenen Mdg1p-Derivate unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. **(a)** Je Mdg1p-Derivat sind 3 Spuren mit 0,5, 1 bzw. 2 µg Protein dargestellt. Das X-DNA-Substrat CF110 wird in Anwesenheit der Kompetitor-DNA Poly[d(I-C)] (5 µg) von Mdg1p<sup>aa1-120</sup> nicht, von Mdg1p<sup>aa1-263</sup> effizient und von Mdg1p<sup>aa1-366</sup> nur in schwachem Maße retardiert. **(b)** Je Mdg1p-Derivat sind 2 Spuren mit 0,5, bzw. 1 µg Protein dargestellt. Die von der Sequenz von CF110 abgeleiteten Doppelstrang-Substrate werden von keinem der Mdg1p-Derivate retardiert.

**Implikationen für die X-DNA-Bindedomäne von Crp1p.** Da sich gezeigt hatte, das Mdg1p, zumindest in der Form Mdg1p<sup>aa1-263</sup>, X-DNA bindet, wurde der Sequenzvergleich mit Crp1p genutzt, um konservierte Aminosäuren in der X-DNA-Bindedomäne zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die Lage von drei positiv geladenen Aminosäurepaaren in der X-DNA-Bindedomäne zwischen beiden Proteinen identisch ist (Abbildung 34a). Um zu klären, ob die Paare positiver Ladung essentiell für die X-DNA-Bindung sind, wurden die Lysine bzw. Arginine jeweils eines Paares durch Alanine ersetzt (vgl. Seite 53). Die Expression der entsprechenden Plasmide erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS und die Reinigung der Zielproteine mit Hilfe einer Ni-NTA-Matrix (vgl. Seite 47). Eine EMSA-Analyse zeigte, dass die einzelnen Mutanten die Fähigkeit zur X-DNA-Bindung nicht eingebüßt haben. (Abbildung 34b).

Obwohl hier keine essentiellen Aminosäuren der X-DNA-Bindung identifiziert wurden, könnte dieser erste Test als Grundlage für eine weitere Untersuchung der X-DNA-Bindedomäne dienen. In weiteren Experimenten könnten die einzelnen Mutationen in einer Mutante vereinigt werden. Ferner könnte die auffällige Verteilung der ungeladenen Asparagine zwischen den positiv geladenen Aminosäuren in der X-DNA-Bindedomäne von Crp1p untersucht werden. Falls sie eine „Platzhalter-Funktion“ ausüben, könnte ihre Deletion zum Verlust der spezifischen X-DNA-Bindung führen.



**Abbildung 34: Mutationsanalyse von Crp1p.**

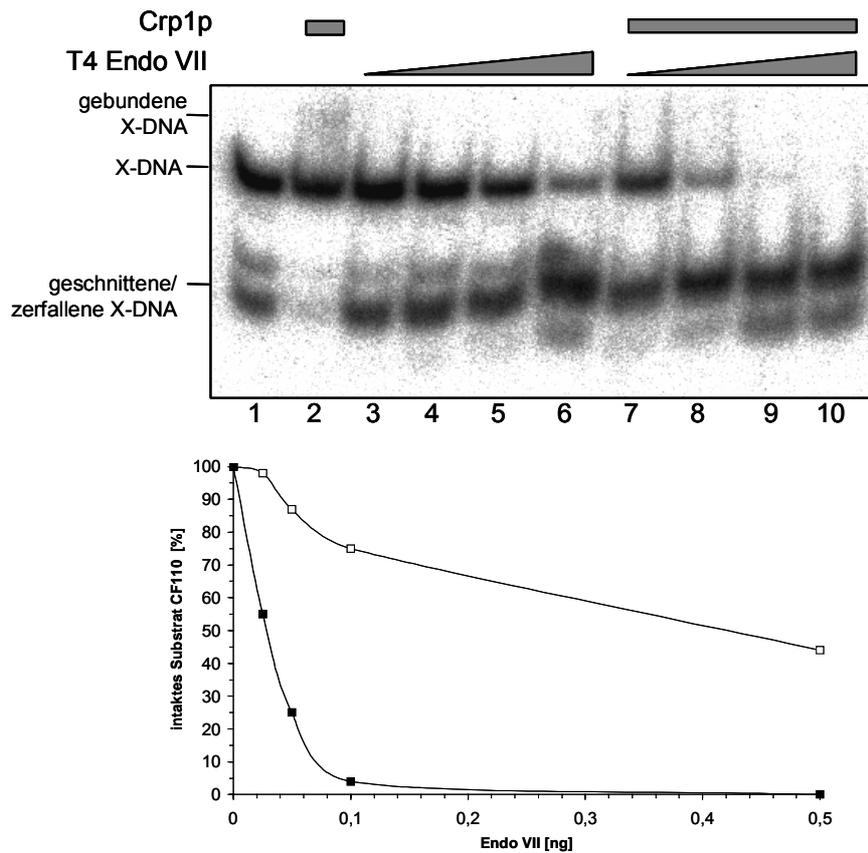
(a) Aminosäuresequenzen von Crp1p (X-DNA-Bindedomäne aa 120 bis 141) und Mdg1p (aa 118 bis 139), sowie eine abgeleitete Konsensus-Sequenz. Identische Aminosäuren sind hervorgehoben. Die konservierten Paare aus K und/oder R (mit I bis III bezeichnet) wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Die dazu vorgenommenen Veränderungen in der codierenden DNA-Sequenz sind gezeigt (oben wildtypische Sequenz, unten mutierte Sequenz). (b) EMSA-Analyse von Crp1p<sup>aa1-160</sup> in wildtypischer (Wt) und mutierter Form (I bis III). X-DNA CF110 (0,1 nM), wurde in Abwesenheit von Kompetitor-DNA jeweils ohne Protein (K) und mit steigenden Mengen der angegebenen Crp1p-Derivate unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel, und die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Spuren 2 bis 6 enthielten 100, 250, 500, 750 bzw. 1000 ng Protein. Alle getesteten Crp1p-Derivate retardierten die X-DNA CF110.

### 3.5.2. Crp1p stimuliert die X-Solvase-Aktivität der Endonuklease VII

Eine interessanter Befund bezüglich der X-DNA-Bindung von Crp1p war der bereits anhand von Hefe-Fractionen gezeigte stimulierende Effekt auf die X-Solvase-Aktivität von Endo II (vgl. Abbildung 4). Da die Vorinkubation der X-DNA CF110 mit Crp1p zu einem effizienteren Abbau durch Endo II führte, ist anzunehmen, dass Crp1p die X-DNA in eine Konfiguration zwingt, die leichter von Endo VII aufgelöst werden kann. Diese Interpretation lässt darauf schließen, dass Crp1p gleichzeitig mit anderen Proteinen an eine Holliday-Struktur binden kann und damit eventuell als Teil eines Rekombinosoms/Resolvasoms wirken könnte. Die Endo VII-Stimulation wurde hier mit rekombinantem Crp1p getestet und verifiziert (für die genaue Vorgehensweise vgl. Seite 51). Ferner wurde gezeigt, dass Crp1p dabei die Positionen, an denen Endo VII Schnitte in die X-DNA einführt, nicht beeinflusst.

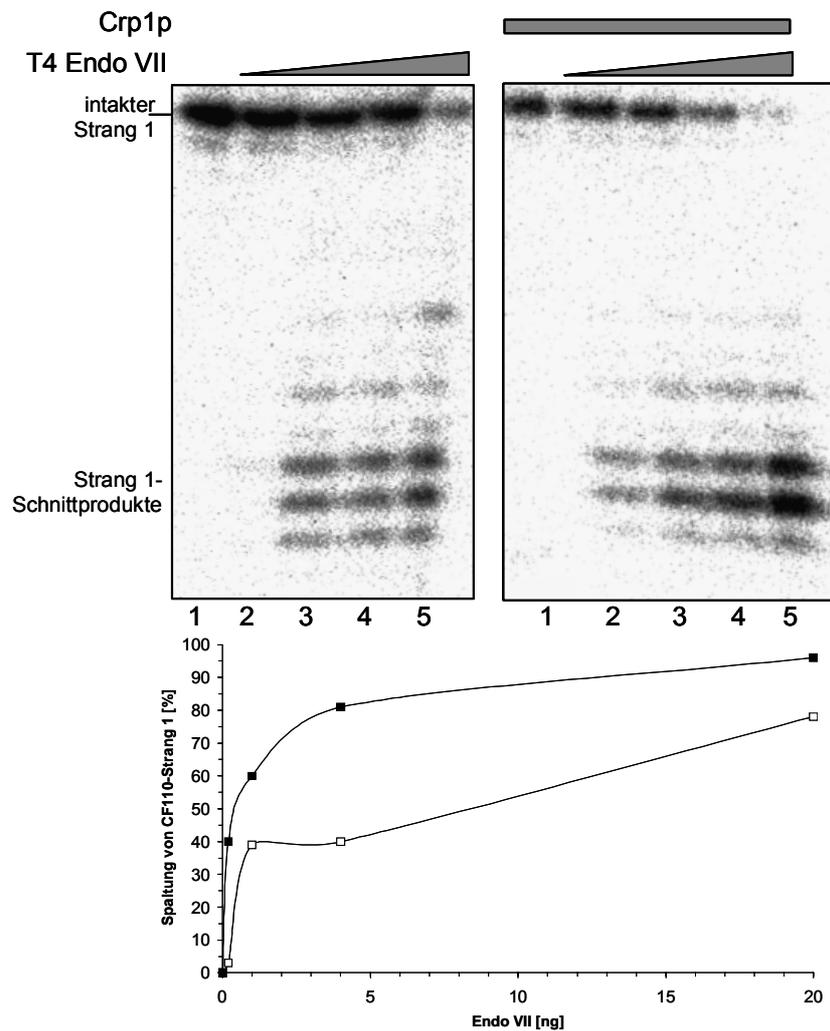
Abbildung 35 zeigt die Analyse des X-DNA-Abbaus durch Endo VII auf einem nativen Gel, Abbildung 36 auf einem denaturierenden Gel. In beiden Fällen führt eine Vorinkubation mit Crp1p<sup>aa1-263</sup> zu einer erhöhten Abbaurate. Endo VII schneidet dabei die X-DNA über 2 Achsen (Kemper *et al.*, 1984). Es werden also korrespondierende Schnitte in Strang 1 und 3 oder Strang 2 und 4 eingeführt (vgl. Abbildung 7). Als Produkt fallen in beiden Fällen zwei DNA-Doppelstränge mit einem Einzelstrangbruch an. Diese bleiben im nativen Gel zusammen und können nicht unterschieden werden. Im denaturierenden Gel zerfällt die DNA in die einzelnen Oligonukleotide. Dies bedeutet, dass man die genauen Schnittpositionen im jeweils markierten Strang nachweisen kann. Im vorliegenden Fall konnte so gezeigt werden, dass sich die Stimulation von Endo VII durch Crp1p<sup>aa1-263</sup> nicht auf die Schnittpositionen auswirkt.

Der abknickende Kurvenverlauf bei diesem Ansatz erklärt sich durch den weiteren Abbau des Produktes der ersten Schnittreaktion, also dem Doppelstrang mit Einzelstrangbruch, durch Endo VII (Pottmeyer & Kemper, 1992). Dieser Reaktionsteil verläuft langsamer, da die Affinität von Endo VII zu diesem Substrat wesentlich niedriger ist als zu X-DNA. Dennoch wird er bei höheren Konzentrationen sichtbar. Diese durch einen flachen Kurvenverlauf gekennzeichnete Reaktion wird nicht mehr durch crp1p<sup>aa1-263</sup> beschleunigt. Auch dieser Befund spricht für die Vorstellung, dass Crp1p<sup>aa1-263</sup> auf der X-DNA „sitzt“, während Endo VII sie auflöst.



**Abbildung 35: Rekombinantes Crp1p stimuliert die X-Solvase-Aktivität von Endo VII.**

EMSA-Analyse von unbehandeltem (Spur 1) bzw. von mit 100 ng Crp1p<sup>aa1-263</sup> vorinkubiertem (Spur 2) X-DNA Substrat CF110 nach einer Schnittreaktion mit T4 Endo VII (Spuren 3 bis 10, für die Reaktionsbedingungen vgl. Seite 51). Spuren 3 bis 6 zeigen das unbehandelte und 7 bis 10 das vorinkubierte Substrat, welches jeweils mit 0,025, 0,05, 0,1 bzw. 0,5 ng Endo VII geschnitten wurde. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 8%-igen (w/v), nativen PAA-Gel. Die DNA-Banden wurden durch *Phosphorimaging* sichtbar gemacht. Die Analyse zeigt, dass die Vorinkubation mit Crp1p<sup>aa1-263</sup> zu einer erhöhten Abbaurate führt. **(b)** Graphische Darstellung dieses Effektes nach Quantifizierung des Anteils an intaktem Substrat je Spur (als %-Anteil des in Spuren 1 bzw. 2 befindlichen intakten Substrats wiedergegeben). Schwarze Quadrate repräsentieren mit Crp1p<sup>aa1-263</sup> vorinkubierte Proben, weiße Quadrate die Ansätze ohne Crp1p<sup>aa1-263</sup>.

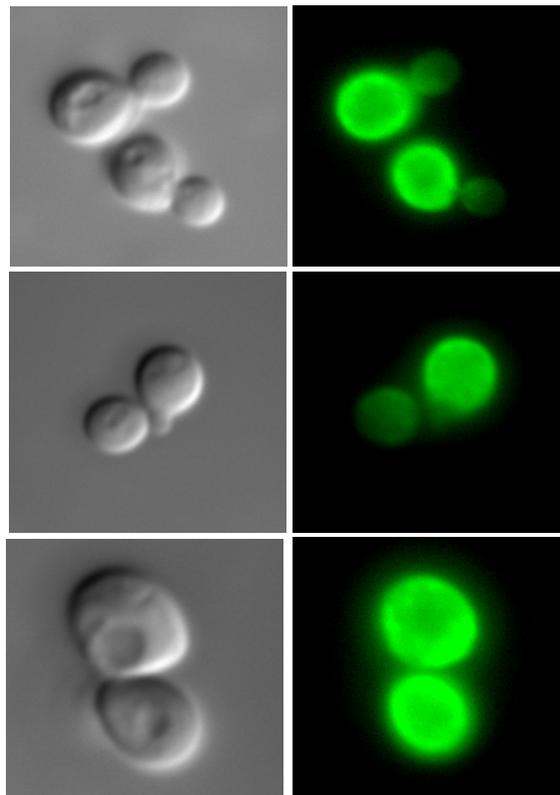


**Abbildung 36: Die Stimulation von Endo VII durch rekombinantes Crp1p lässt die Schnittpositionen unbeeinflusst.**

Das X-DNA-Substrat CF110 wurde nach Inkubation ohne (Spur 1) bzw. mit 0,1, 2, 4 und 20 ng Endo VII (Spuren 2 bis 5) in einem 15%-igen (w/v), denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt. Dabei zerfällt die X-DNA in ihre Oligonukleotide, so dass die Verkürzung des radioaktiv markierten Strang 1 nachgewiesen werden kann. Die rechte Seite zeigt das gleiche Experiment nach Vorinkubation der X-DNA mit 100 ng Crp1p<sup>aa1-263</sup> (für die Reaktionsbedingungen vgl. Seite 51). Während sich die Schnittpositionen in Strang 1 nicht ändern, führt die Vorinkubation mit Crp1p<sup>aa1-263</sup> zu einer erhöhten Abbaurate. **(b)** Graphische Darstellung dieses Effektes nach Quantifizierung des Anteils an Spaltprodukten je Spur (als %-Anteil des in einer Spur befindlichen Signals wiedergegeben). Schwarze Quadrate repräsentieren mit Crp1p<sup>aa1-263</sup> vorinkubierte Proben, weiße Quadrate die Ansätze ohne Crp1p<sup>aa1-263</sup>.

### 3.5.3. Subzelluläre Lokalisation von GFP-Crp1p

*CRP1* wurde genomisch mit der codierenden Sequenz für *Aequorea victoria* GFP versehen und dabei zusätzlich unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gesetzt (vgl. Seite 55). Entsprechende Zellen (Stamm URY24) wurden mikroskopisch untersucht (vgl. Seite 58). Dabei wurde eine cytoplasmatische Lokalisation in der Zellperipherie nachgewiesen (Abbildung 37). Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Erwartung, Crp1p als DNA-bindendes Protein im Zellkern zu finden.



**Abbildung 37: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Crp1p.**

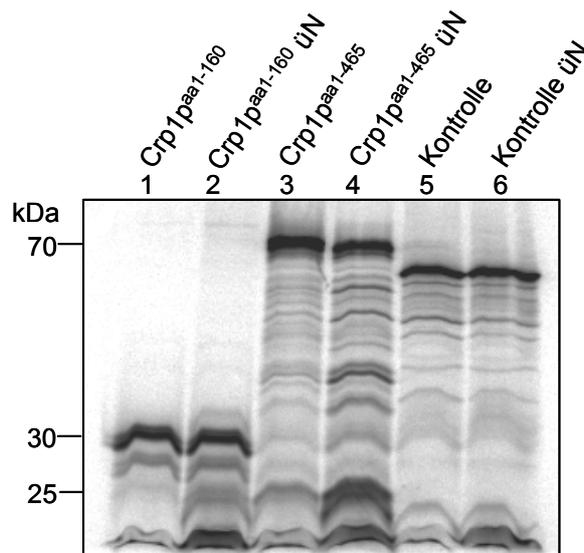
Nachweis von GFP-Crp1p in Zellen des Stammes YUR24. Nomarski- (links) und Fluoreszenz-Bilder (rechts) wurden in schneller Folge aufgenommen (vgl. Seite 58). GFP-Crp1p ist in der Zellperipherie angereichert.

Allerdings muss beachtet werden, dass die Fusion an GFP und die Überexpression des Fusionsproteins zu einer artifiziellen Fehllokalisierung geführt haben können. Es sei darauf hingewiesen, dass die hier gezeigte periphere Lokalisation kürzlich in einer systematischen Lokalisierungsstudie zu Hefeproteinen bestätigt wurde. In dieser Studie (Huh *et al.*, 2003) wurde das Protein unter dem geneigenen Promotor mit C-terminal fusioniertem GFP exprimiert.

In weiteren Versuchen könnte ein immunologischer Nachweis der Lokalisation durchgeführt werden. Hierzu muss das Protein nur durch eine Epitopmarkierung von wenigen Aminosäuren verändert werden. Da zu erwarten ist, dass dies die wildtypische Lokalisierung nicht beeinflusst, könnte man so klären, ob die periphere Lokalisation der wildtypischen Lokalisation entspricht.

### 3.5.4. Untersuchungen zur Spaltung von Crp1p

Rekombinante Derivate von Crp1p werden effizient in der direkten Nachbarschaft von Aminosäure 160 posttranslational gespalten (vgl. Abbildung 16). Um die Möglichkeit einer Autoproteolyse näher zu untersuchen, wurde Volle-Länge-Crp1p *in vitro* exprimiert und mit dem putativen Spaltprodukt Crp1p<sup>aa1-160</sup> verglichen (Abbildung 38).



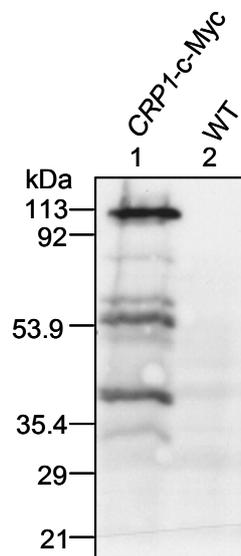
**Abbildung 38: *In vitro* translatiertes Crp1p bleibt stabil.**

Crp1p<sup>aa1-160</sup>, Volle-Länge-Crp1p und ein Kontrollprotein (Luziferase) wurden pGBKT7-vermittelt *in vitro* translatiert (vgl. Seite 33). Je 5 µl eines 50 µl-Expressionsansatzes pro Spur wurden in einem 15%-igen (w/v) SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und radioaktiv markierte Proteine mittels *Phosphorimaging* nachgewiesen. Für jedes Protein ist eine Probe, die unmittelbar nach der Translation präpariert wurde sowie eine Probe nach üN-Inkubation bei RT aufgetragen worden. Die Laufweiten und Molekülmassen des verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben.

Die *in vitro* translatierte Form von Crp1p konnte als stabiles Produkt von etwa 70 kDa nachgewiesen werden. Eine spezifische Spaltung, die das Volle-Länge-Produkt in die 29 kDa-Form von Crp1p<sup>aa1-160</sup> überführt, konnte hier nicht festgestellt werden. Da die Möglichkeit bestand, dass der Spaltungsprozess unter den veränderten Bedingungen

verlangsamt abläuft, wurde das Volle-Länge-Proteins üN bei RT inkubiert. Dabei blieb Crp1p weiterhin stabil.

Um den Zustand von Crp1p in Hefe zu untersuchen, wurde *CRP1* genomisch mit einer c-Myc-Epitopmarkierung versehen (vgl. 55) und unter dem geneigenen Promotor belassen. Der entsprechende Stamm URY34 wurde für den immunologischen Nachweis des Proteins verwendet (Abbildung 39). Endogenes Crp1p wurde aufgrund seines bereits beobachteten aberranten Laufverhaltens in SDS-PAA-Gelen bei ca. 70 kDa erwartet. Die c-Myc-Epitopmarkierung besteht hier aus 182 aa, so dass sich die erwartete Molekülmasse um etwa 20 kDa erhöht. Das endogene Protein Crp1p-c-Myc wurde in etwa mit der Voraussage übereinstimmend bei ca. 100 kDa nachgewiesen. Neben dem Volle-Länge-Produkt wurden reproduzierbare Banden bei etwa 54 und 38 kDa nachgewiesen. Bei der 54-kDa Bande könnte es sich um ein zu dem putativen N-terminalen Spaltprodukt Crp1p<sup>aa1-160</sup> korrespondierendes, C-terminales Crp1p-Derivat handeln. Diese Frage ist bislang nicht abschließend geklärt. Eine so effiziente und auf eine Position festgelegte Spaltung wie bei rekombinantem Crp1p konnte hier nicht festgestellt werden.



**Abbildung 39: Immunologischer Nachweis von Crp1p in *S. cerevisiae*-Lysat.**

Die Zellen aus je 500 µl einer YPDA-Flüssigkultur des Stammes URY34 bzw. des Wildtyps BY4741 wurden bei einer optischen Dichte von 1 bei 600 nm abzentrifugiert, in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht und in einem 12%-igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf Nitrozellulosemembran wurden Proteinspezies mit c-Myc-Epitopmarkierung mit Hilfe eines Anti-Myc Antikörpers nachgewiesen. Crp1p-c-Myc erschien in Form dreier Banden bei ~100, 54 und 38 kDa. Der Wildtyp lieferte kein Signal. Die Molekülmassen eines verwendeten Molekulargewichtsmarkers sind angegeben.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das bisher unbekannte Protein Crp1p der Hefe *S. cerevisiae* gefunden und untersucht. Seine auffälligste Eigenschaft ist die hoch spezifische Erkennung von X-DNA. Da diese DNA der Holliday-Struktur sehr ähnlich ist, die *in vivo* während der HR auftritt, stellt sich die Frage, ob Crp1p an solchen Rekombinationsprozessen beteiligt ist. Neben dieser sehr speziellen Betrachtungsweise soll aber auch berücksichtigt werden, dass Crp1p eine andere biologische Funktion haben könnte und die beobachtete Bindung von X-DNA lediglich durch eine mehr oder weniger zufällige strukturelle Überlappung dieses Substrates mit der biologisch relevanten Struktur bedingt ist. Unter diesem Aspekt sollen im Folgenden die Befunde zu den Eigenschaften von Crp1p, der phänotypischen Analyse von *crp1Δ*-Zellen und der Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudie diskutiert werden.

### 4.1. Reinigung und Identifizierung von Crp1p

Crp1p war zunächst als X-DNA bindende Aktivität in EMSAs mit fraktionierten Hefe-Extrakten nachgewiesen worden (Rass, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in EMSAs zu beobachtende Aktivität mit einer durch die *Southwestern* Technik nachweisbaren X-DNA bindenden Aktivität korrelierte. Diese Aktivität trat in Form von radioaktiv markierten Banden bei den Molekülmassen 24 kDa, 26 kDa und 28 kDa auf. Wie in EMSAs trat die X-DNA bindende Aktivität auf *Southwestern-blots* auch bei hohem Überschuss an linearer Kompetitor-DNA auf.

Durch die Kenntnis der Molekülmassen der X-DNA bindenden Proteine war es möglich, diese auf mit Silbernitrat gefärbten SDS-PAA-Gelen zu identifizieren. Nach einer neuen, größer angelegten chromatographischen Reinigung der X-DNA bindenden Aktivität konnten entsprechende Proteine aus einem mit Coomassie gefärbten SDS-PAA-Gel isoliert werden. Die Analyse der tryptischen Massenspektren ergab, dass alle drei Proteinbanden Fragmente desselben Proteins enthielten. Durch LC-ESI MS-MS wurden tryptische Fragmente des größten Derivats (28 kDa) sequenziert und dem Genprodukt des offenen Leserasters *YHR146W* zugeordnet. Dem zu diesem Zeitpunkt hypothetischen Protein wurde der funktionelle Name *Cruciform DNA-Recognising Protein 1* bzw. Crp1p gegeben.

Bei der Expression von rekombinantem Crp1p in *E. coli* zeigte sich, dass das Protein posttranslational gespalten wird. Da die rekombinante Form eine Folge von sechs Histidinresten am N-Terminus trug, war eine Affinitätschromatographische Reinigung mittels Ni-NTA-Matrix möglich. Als Folge der Spaltung wurde nicht das erwartete 51,1 kDa Protein, sondern ein N-terminales Fragment mit einer apparenten Molekülmasse von 29 kDa angereinigt. EMSA-Analysen dieses Fragments zeigten, dass sich das rekombinante Protein so verhielt wie die in Hefe-Extrakten nachgewiesene X-DNA bindende Aktivität. In beiden Fällen wurden verzweigte X- und Y-DNA Substrate gebunden, während weder die von der Sequenz der X-DNA abgeleiteten linear doppelsträngigen Substrate, noch ein einzelsträngiges Substrat erkannt wurden. Diese Übereinstimmung im Substratspektrum spricht dafür, dass es sich bei der in Hefe-Extrakten beobachteten Aktivität tatsächlich um Crp1p handelte. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass im Hintergrund von Crp1p andere X-DNA bindende Proteine einen Teil des in EMSAs nachgewiesenen Signals ausmachten.

## 4.2. Posttranslationale Spaltung von Crp1p

Der Nachweis einer posttranslationalen Spaltung von Crp1p wurde mit Hilfe einer N- und einer C-terminal mit His-tag versehenen Variante erbracht. Es zeigte sich, dass das Protein in voller Länge zunächst gebildet und dann erst gespalten wird. Je nach Lage des His-tag wurde das N- bzw. C-terminale Fragment mit einem Anteil an Voll-Länge-Protein immunologisch auf einem *Western-blot* nachgewiesen (vgl. Abbildung 15). Danach wurde mit Hilfe einer Reihe von Crp1p-Derivaten mit Deletionen am N- und C-Terminus die Spaltstelle in Crp1p lokalisiert. Die Spaltung erfolgt in direkter Nachbarschaft von Aminosäure 160. Diese Angabe stützt sich auf das in etwa gleiche Laufverhalten des N-terminalen Spaltproduktes und des stabilen Derivats Crp1p<sup>aa1-160</sup>. Eine genauere Kartierung durch N-terminale Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes scheiterte, da keine eindeutige Sequenz gewonnen werden konnte.

Die beobachtete Spaltung von rekombinantem Crp1p geschieht durch genau ein definiertes endoproteolytisches Ereignis. Dieses findet auch bei den Derivaten Crp1p<sup>aa1-200</sup> und Crp1p<sup>aa142-465</sup> statt. Folglich trägt der Bereich zwischen Aminosäuren 142 und 200, eventuell in Verbindung mit jeweils dem N- bzw. C-Terminus von Crp1p, die notwendige Information für eine gerichtete Endoproteolyse. Eine solch gezielte

Endoproteolyse muss von einem unspezifischen Abbau eines Proteins in Peptide und Aminosäuren unterschieden werden. Im Gegensatz zum Totalabbau ist der gezielte Eingriff eher eine Prozessierung, die man auch als Reifung betrachten könnte, wenn eines der Spaltprodukte eine andere biologische Funktion erfüllt als Volle-Länge-Crp1p. Die gute Übereinstimmung des apparenten Molekulargewichts zwischen der Hauptspezies der in Hefe gefundenen Crp1p-Derivate (28 kDa) und dem N-terminalen Spaltprodukt des rekombinanten Proteins (29 kDa) deuten darauf hin, dass in beiden Organismen oder Lysaten ein ähnlicher endoproteolytischer Vorgang stattfand. Dabei ist kaum vorstellbar, dass beide Organismen ein ähnliches Enzym besitzen, welches Crp1p in der gleichen Weise prozessiert. Deshalb sind weitere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen.

(1) Eine Möglichkeit, wie die beobachtete Ortsspezifität der Spaltung erreicht werden kann, ist die Autoproteolyse. Dazu müssten einzelne Aminosäuren im Bereich von Aminosäure 160, eventuell in Verbindung mit jeweils dem N- bzw. C-Terminus von Crp1p, in der Lage sein, diesen Vorgang zu katalysieren. Das Phänomen der Autoproteolyse von Proteinen kennt man z.B. von Inteinen, die im Prozess des *protein splicing* aus einem Vorläuferprotein ausgeschnitten werden, wobei gleichzeitig die N- und C-terminalen Bereiche des Vorläufers als Extesin fusionieren (Perler, 2002). Ein anderes Beispiel sind bestimmte *hedgehog* Proteine, bei denen eine gezielte Spaltung den N-terminalen Teil aktiviert und gleichzeitig mit einem Lipidanker (Cholesterin) für die Membranlokalisierung des Proteins versieht (Beachy *et al.*, 1997). Diese Reaktionen beginnen alle mit dem nukleophilen Angriff eines konservierten Threonins, Serins oder Cysteins auf die Peptidbindung an der Spaltstelle (Perler, 2002). Im Falle von *hedgehog* entsteht dabei ein Intermediat, bei dem der N-terminale Teil des Proteins über eine Thioesterbindung statt einer Peptidbindung mit dem C-terminalen Teil des Proteins verbunden ist. Im Folgenden bindet der C-terminale Teil von *hedgehog* ein Cholesterin-Molekül, das mittels einer Hydroxylgruppe die Thioesterbindung angreift. Durch eine Umesterung wird das Cholesterinmolekül an den N-Terminus von *hedgehog* gebunden, während der C-terminale Teil entlassen wird.

Ähnliche autoproteolytische Vorgänge kennt man auch bei der Hefe, so z.B. beim Nukleoporin Nup145p (Teixeira *et al.*, 1997) und Ecm40p (auch Arg7p genannt; Abadjieva *et al.*, 2000), einem Enzym der Arginin Biosynthese. Für diese beiden

Beispiele wurde gezeigt, dass die Autoproteolyse in Hefe und nach Expression in *E. coli* stattfindet. Weiterhin wurde gezeigt, dass *in vitro* exprimiertes Emc40p seine eigene Prozessierung katalysiert und dass diese von einem Threonin an Position 215 abhängt. Serin- und Threoninreste finden sich auch bei Crp1p in direkter Umgebung der Spaltstelle (z.B. Serin an Position 156, Threonin an Position 167). Ob diese Aminosäuren an einem autokatalytischen Prozess beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht. Ein direkter Nachweis könnte über gezielten Austausch dieser Aminosäuren gegen Alanin geführt werden. Alternativ könnte geprüft werden, ob die Übertragung der Spaltstellensequenz von Crp1p in ein anderes, stabiles Protein auch dort zur Proteolyse führt. Allerdings könnte dabei im Falle eines Negativergebnisses nicht ausgeschlossen werden, dass der Prozess von weiteren N- bzw. C-terminal gelegenen Aminosäuren von Crp1p abhängt oder dass im neuen Protein strukturelle Besonderheiten den Prozess verhindern.

Ähnlichkeiten bei der Spaltung von Emc40p bzw. Nup145p und rekombinantem Crp1p liegen darin, dass der Prozess schnell und effizient abläuft, so dass immer nur ein kleiner Anteil an Volle-Länge-Protein nachgewiesen werden kann. Ein grundlegender Unterschied besteht jedoch in der fehlenden Prozessierung von *in vitro* translatiertem Crp1p (vgl. Abbildung 38). Dieser Befund spricht gegen die Möglichkeit der Autoproteolyse. Allerdings könnte das mittels Reticulocyten-Lysat exprimierte Crp1p, etwa durch Fehlfaltung, an der Autoproteolyse gehindert worden sein.

(2) Eine weitere Möglichkeit, die Spaltung von Crp1p auf eine Stelle zu begrenzen, könnte in der Struktur des Proteins liegen. Es wäre vorstellbar, dass die Spaltstelle besonders exponiert und zugänglich für Proteasen ist, während der N- und C-Terminus kompakt und unzugänglich strukturiert sind. Damit würde die Lage der Spaltstelle wie bei einer Autoproteolyse vom Protein selbst bestimmt, so dass ihr gleichzeitiges Auftreten in Hefe und *E. coli* plausibel wäre. Eine Voraussetzung für diese Variante ist, dass die strukturell bedingte Exposition der Spaltstelle auch bei umfangreichen Deletionen am N- bzw. C-Terminus erhalten bleibt.

In beiden aufgeführten Möglichkeiten ist die Spaltung von Crp1p auf eine Stelle begrenzt. Im Falle der Autoproteolyse wäre darüber hinaus eine biologische Bedeutung des Vorgangs anzunehmen. Bei einer strukturell bedingten Spezifität ist dies weniger

nahe liegend, wenn auch nicht ausgeschlossen. Grundsätzlich würden beide Vorgänge eine Möglichkeit zur posttranslationalen Regulation der Aktivität von Crp1p bieten. Da Volle-Länge-Crp1p genau wie das N-terminale Subpeptid Crp1p<sup>aa1-160</sup> X-DNA bindet, kann die Endoproteolyse nicht die Aktivität selbst regulieren (vgl. Seite 87). Es wäre aber denkbar, dass die Lokalisierung von Crp1p von seiner Spaltung abhängt. So könnte der Kernimport für Volle-Länge-Crp1p blockiert sein, während das N-terminale Subpeptid, vermittelt durch die möglichen NLS-Sequenzen zwischen Aminosäure 129 und 152, die Kernmembran passieren kann (vgl. Abbildung 12).

### 4.3. Bindung von Crp1p an DNA

Crp1p aus Hefe und rekombinantes Crp1p binden ausschließlich verzweigte DNA-Substrate. Die Untersuchung einer Reihe von Crp1p-Derivaten zeigte, dass zwei Regionen des Proteins X-DNA-Bindung vermitteln (vgl. Seite 80). Die Position der C-terminal gelegenen Region wurde nicht näher bestimmt. Sie ist zwischen Aminosäure 260 und 465 angesiedelt. Eventuell handelt es sich um die Lysin-reiche Region zwischen Aminosäure 352 und 420. Bei Anwesenheit von Kompetitor-DNA geht die hier vermittelte X-DNA-Bindung verloren. Die N-terminale, als X-DNA bindende Domäne bezeichnete Region bindet X-DNA auch in der Anwesenheit von Kompetitor-DNA. Sie überlappt mit einer zweiten Lysin-reichen Region zwischen Aminosäure 129 und 152. Da linear doppelsträngige DNA-Substrate, die zusammen die Sequenzinformation der X-DNA tragen, auch in Abwesenheit von Kompetitor-DNA nicht erkannt werden, scheidet generelle Bindung von DNA sowie Sequenzspezifität für die Erkennung von X-DNA aus. Auch DNA-Substrate mit Störungen in der Doppelhelix, wie einer CC-Fehlpaarung und einer ungepaarten Einzelstrangschleife von 8 Nukleotiden, werden nicht gebunden. Folglich erkennt Crp1p bestimmte strukturelle Eigenschaften von X- und Y-DNA, etwa die spezifische räumliche Anordnung der DNA-Stränge und/oder eine charakteristische Störung der B-Form der DNA am Verzweigungspunkt. Diese Strukturspezifität wird zusätzlich von dem Befund unterstützt, dass Crp1p auch an die in unserer Arbeitsgruppe verwendete X-DNA CFK1a01 (Neef *et al.*, 2002) mit einer völlig anderen Basensequenz als der von CF110 bindet (nicht gezeigt).

Die Dissoziationskonstante für Crp1p<sup>aa1-160</sup> und X-DNA liegt bei 800 nM. Dies liegt im Bereich der Dissoziationskonstanten für HMG-Box-Bereiche der Transkriptionsfaktoren UBF, SRY und HMG1 mit 1500 nM, 47 nM bzw. 200 nM (Pöhler *et al.*, 1998). Die HMG-Box ist die am besten untersuchte X-DNA bindende Domäne. Dabei ist bemerkenswert, dass HMG-Box-Proteine, wie die meisten anderen X-DNA bindenden Proteine, auch linear doppelsträngige DNA binden, wenngleich X-DNA mit höherer Affinität. Crp1p bindet dagegen exklusiv X- und Y-DNA.

Einen erster Hinweis auf eine biologischen Relevanz der X-DNA-Bindung von Crp1p kommt von Versuchen zu Stimulation der X-Solvase-Aktivität von Endo VII. Hier zeigte sich zum einen, dass Crp1p auch unter Anwesenheit physiologischer Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen X-DNA bindet und dass es in konzertierter Aktion mit einem Enzym an der Struktur wirken kann.

#### 4.4. Die X-DNA bindende Domäne von Crp1p

Die X-DNA bindende Domäne von Crp1p erstreckt sich über Aminosäuren 120-141. Diese Domäne wurde als eigenständiges Peptid in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Es zeigte sich, dass dieses kleine Peptid die Fähigkeit zur X-DNA Bindung besitzt. Dabei wurden auf EMSAs keine scharf umrissenen Banden beobachtet, wie im Falle von Crp1p<sup>aa1-160</sup>, sondern die Bildung eines „Schmier“ an retardiertem DNA-Substrat. Das lässt darauf schließen, dass mehrere Peptide gleichzeitig an die X-DNA binden, dann aber teilweise während des Gellaufs wieder abfallen. Dies zeigt, dass die Minimalsequenz von Aminosäure 120 bis 141 zwar ausreicht, um spezifisch X-DNA zu erkennen, andere Bereiche von Crp1p die Bindungseigenschaften des Proteins aber mitbestimmen.

Die X-DNA bindende Domäne ist stark positiv geladen. Damit eignet sie sich *per se* zur Bindung an das negativ geladene Rückgrad von Nukleinsäuren. Wie bereits erwähnt, überschneidet sich die X-DNA bindende Domäne mit einer Lysin-reichen Region, und es ist anzunehmen, dass auch Aminosäuren dieser Region, die außerhalb der Minimalsequenz liegen, an der DNA-Bindung teilnehmen (vgl. Abbildung 18a). Im Bereich zwischen Aminosäure 120 und 152 finden sich 16 positiv geladene Reste, während alle anderen ungeladen sind. Negativ geladene Reste, die eine Abstoßung des DNA-Rückgrades verursachen könnten, fehlen. Wie die Interaktion dieses stark positiv

geladenen Bereichs und der X-DNA aussieht, muss noch untersucht werden. Es ist noch nicht ersichtlich, wie diese Aminosäuresequenz verzweigte und lineare DNA unterscheidet.

## 4.5. Teilnahme von Crp1p an Rekombinationsprozessen

Um eine mögliche Teilnahme von Crp1p an Rekombinationsprozessen zu testen, wurde die Lebensfähigkeit von *crp1Δ*-Zellen in Situationen getestet, in denen die Zelle auf rekombinogene DNA-Reparatur angewiesen ist. Es zeigte sich zunächst, dass die Deletion von *CRP1* keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Hefe hat. Auch nach Induktion von DNA-Schäden durch Bestrahlung mit UV- bzw. Röntgenstrahlen verhielten sich *crp1Δ*-Zellen wie der Wildtyp. Außerdem wurde die Fähigkeit von *crp1Δ*-Zellen zur Sporulation getestet. Dabei ergab sich kein Hinweis auf einen Defekt in der meiotischen Rekombination. Um diese Befunde bewerten zu können, muss man sich detailliert die molekularen Prozesse der rekombinogenen DNA-Reparatur und der meiotischen Rekombination der Hefe vor Augen führen.

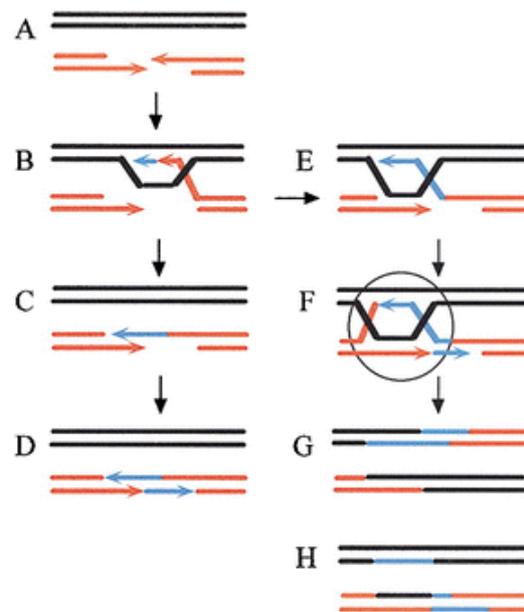
### 4.5.1. Mitotische Rekombination

In der Einleitung wurde bereits das kanonische DSBR-Modell der HR vorgestellt (vgl. Abbildung 1). Nach diesem Modell endet ein Rekombinationsereignis mit der Auflösung des *joint molecule* aus beiden rekombinierenden DNA-Doppelsträngen. Durch die Orientierung der Schnitte, die eine X-Solvase in den verbindenden Holliday-Strukturen einführt, kommt es zur Genkonversion mit oder ohne *cross-over* der flankierenden Bereiche. Dies spiegelt den experimentellen Befund wider, dass sich bei Rekombination zwischen chromosomaler und plasmidcodierter rDNA *cross-over*- mit nicht-*cross-over*-Ereignissen die Waage halten (Orr-Weaver & Szostak, 1983). Insbesondere bei der mitotischen Rekombination wurden später aber niedrigere *cross-over*-Häufigkeiten festgestellt. Diese Abweichung ließe sich durch einen Auflösungsmechanismus erklären, wie er sich bei *E. coli* findet. Hier bevorzugt das RuvABC-Resolvasom bestimmte Schnittachsen, was in der Mehrzahl der Fälle zu nicht-*cross-over*-Ereignissen führt (Bennett & West, 1995). Eine alternative Erklärung bieten neue Modelle zur HR, die unter dem Namen *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) entwickelt wurden (Nassif *et al.*, 1994; Ferguson & Holloman, 1996; Paques *et al.*, 1998; zusammengefasst in Haber, 1999). Verschiedene SDSA-Varianten könnten

bei der Hefe in der Mehrzahl der mitotischen Rekombinationsereignisse zur Anwendung kommen, so dass diese eventuell in einigen grundlegenden Punkten vom DSBR-Modell abweichen.

Wie beim DSBR-Modell steht beim SDSA-Modell am Anfang ein DNA-DSB, aus dem durch Abbau der 5'-Enden 3'-Überhänge hervorgehen (Abbildung 40A). Ein freies 3'-Ende wird in ein homologes Donormolekül eingeführt und durch Reparatursynthese mit dem Donorstrang als Matrize verlängert (Abbildung 40B). Ab jetzt verläuft SDSA anders als die DSBR: Nach der Synthese dissoziiert der Akzeptorstrang vom Donor und dient nun selbst als Matrize für den zweiten, verkürzten Einzelstrang des Akzeptormoleküls (Abbildung 40C). Entscheidend ist, dass es bei diesem Prozess nicht durch Ligationen zur Bildung echter Holliday-Strukturen kommt.

Diesem Modell entsprechen vom DSBR-Modell abweichende Befunde bezüglich der Beschränkung der Heteroduplex-DNA auf das Akzeptormolekül (McGill *et al.*, 1989) und dort auf nur eine Seite des ursprünglichen DSB (Gilbertson & Stahl, 1996). Außerdem konnte in verschiedenen Ansätzen gezeigt werden, dass sich Bereiche neu synthetisierter DNA auf das Akzeptormolekül beschränken. Dies wurde indirekt durch die Analyse fehlerhafter Syntheseereignisse nachgewiesen. So konnte die Anhäufung von Basenaustauschen (Strathern *et al.*, 1995) und die Verkürzung oder Ausdehnung von Sequenzwiederholungen (Paques *et al.*, 1998) während eines Rekombinationsereignisses nur im Akzeptormolekül festgestellt werden. Beim rekombinogenen Paarungstypenwechsel von *S. pombe* konnte die Beschränkung der Neusynthese auf das Akzeptormolekül mittels Dichtegradientenzentrifugation verifiziert werden (Arcangioli, 2000). Demnach sollte die Hefe über eine Variante der HR verfügen, die ohne Ausbildung von Holliday-Strukturen verläuft und immer zu nicht-*cross-over*-Ereignissen führt. Allerdings wurde auch bei Rekombinationsereignissen, deren Produkte sich am besten durch das SDSA-Modell erklären lassen, der Austausch von flankierenden Regionen festgestellt. Dies legt nahe, dass es auch hierbei zur Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur und deren Auflösung durch X-Solvasen kommen kann (Paques *et al.*, 1998).



**Abbildung 40: Schematische Darstellung des *synthesis-dependent strand annealing*.**

Das Rekombinationsereignis findet zwischen einem schwarz (Donormolekül) und einem rot (Akzeptormolekül) dargestellten DNA-Doppelstrang statt. Weitere Erklärungen im Text (neu synthetisierte DNA ist blau dargestellt; zweifarbige Bereiche in einem Doppelstrang kennzeichnen Heteroduplex-Bereiche; Abbildung verändert nach Haber & Heyer, 2001).

Die Ausbildung der Holliday-Strukturen kann hier durch die sog. *2nd end capture* erklärt werden. Dies geschieht, wenn, ähnlich wie beim DSBR-Modell, nach der Invasion des ersten Einzelstrangs in das Donormolekül der zweite Einzelstrang ebenfalls mit dem Donormolekül hybridisiert (Abbildung 40E). Der Unterschied zum klassischen DSBR-Modell liegt darin, dass die beiden Holliday-Strukturen, die das nun entstandene *joint molecule* zusammenhalten auf der gleichen Seite des ursprünglichen DSB liegen (Abbildung 40F, mit einem Kreis markiert). Die Auflösung der Holliday-Strukturen führt wie beim DSBR-Modell zur Bildung von *cross-over*- (Abbildung 40G) oder nicht-*cross-over*-Ereignissen (vgl. Abbildung 40H).

Der für diese Arbeit entscheidende Unterschied zwischen DSBR-Modell und SDSA-Modell liegt in der Bildung der Holliday-Strukturen. Während ein DSBR-Prozess zwangsläufig auf Funktionen angewiesen ist, die Holliday-Strukturen prozessieren, gestalten sich die Anforderungen beim SDSA-Prozess flexibler. Dieser führt wahrscheinlich in der Mehrzahl der Fälle nicht zur Ausbildung eines *joint molecule* und ist daher unabhängiger von Holliday-Struktur prozessierenden Funktionen. Für Mutanten mit Defekten in Funktionen der späten Phase der HR bedeutet dies, dass sie nicht zwangsläufig einen Phänotyp zeigen. Die Hefe könnte

flexibel auf Defekte in strukturellen oder enzymatischen Funktionen der Holliday-Struktur Prozessierung reagieren, und die HR in von der Holliday-Struktur unabhängige Abläufe kanalisieren. Für Crp1p bedeutet dies, dass das Ausbleiben eines Phänotyps in *crp1Δ*-Zellen nach der Induktion von DSBs eine Beteiligung an der Prozessierung von Holliday-Strukturen nicht ausschließt. Dennoch zeigt dieser Befund, dass Crp1p keine essentielle Rolle in der mitotischen Rekombination spielt.

Mit der Möglichkeit, Rekombinationsprozesse ohne die Bildung eines *joint molecule* ablaufen zu lassen, könnte auch zusammenhängen, dass bisher mittels Mutationsanalyse nur Enzyme der eukaryotischen HR identifiziert wurden, die vor der Bildung der Holliday-Strukturen wirken (vgl. Abbildung 1). Gleichzeitig weiß man aber von biochemischen Ansätzen, dass eine Vielzahl von Proteine, die eine Holliday-Struktur Prozessierung im Sinne des DSBR-Modells katalysieren können, existieren. Diese Diskrepanz spiegelt vermutlich die Fähigkeit der Hefe wider, durch Zurückgreifen auf verschiedene Rekombinationswege flexibel auf Defekte im Ablauf reagieren zu können.

Eine aktuelle Studie schlägt einen Mechanismus vor, mit dem die Hefe die mitotische Rekombination aktiv in Richtung SDSA-nicht-*cross-over*-Ereignis kanalisieren könnte (Ira *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde in einem interchromosomalen Rekombinationstest ein spezifisches allelisches Rekombinationsereignis untersucht. Das Testsystem erlaubt die Induktion eines bestimmten, einzelnen DSB und die Unterscheidung von *cross-over*- und nicht-*cross-over*-Ereignis beim Reparaturvorgang durch phänotypische Analyse der verwendeten Marker. Es zeigte sich, dass die *cross-over*-Rate bei wildtypischen Zellen bei 23,2% lag, während sie sich bei *srsΔ*-Zellen auf 50,6% erhöhte. Daraus ergibt sich, dass *SRS2* die Frequenz der *cross-over*-Ereignisse eindämmt.

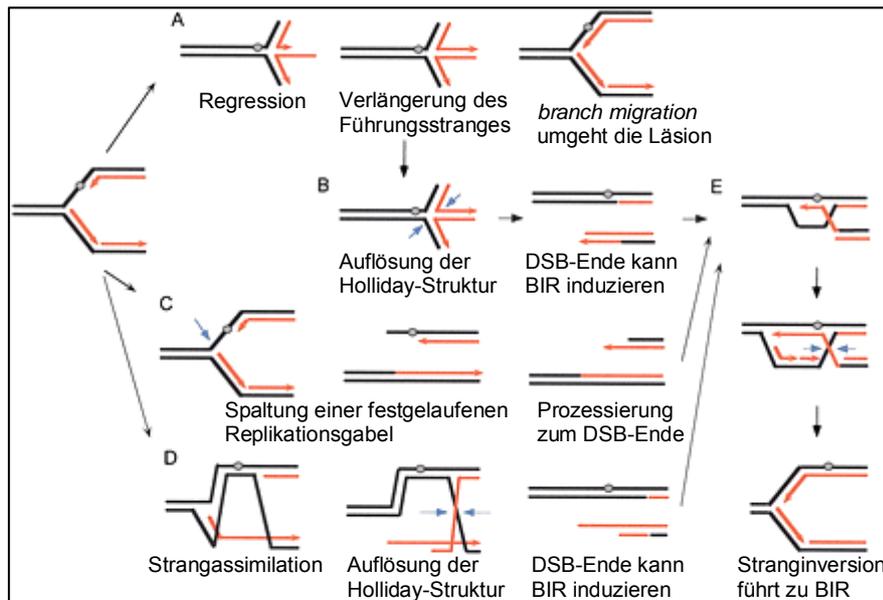
Ein weiteres Ergebnis der genannten Studie ist die Entdeckung eines Unterschiedes in der Kinetik von *cross-over*- und nicht *cross-over*-Ereignissen in der mitotischen Rekombination, was darauf hindeutet, dass beide Arten von Produkten aus unterschiedlichen molekularen Prozessen hervorgehen. Dies zeigt, dass das DSBR-Modell nicht alle Rekombinationsereignisse erklären kann, da hier durch die alternative Auflösung der Holliday-Strukturen *cross-over*- und nicht *cross-over*-

Produkte zum gleichen Zeitpunkt entstehen. Es zeichnet sich also ab, dass Srs2p aktiv die Dissoziation von frühen Rekombinationsintermediaten unterstützt und so den Ausgang der Rekombination in Richtung SDSA-Ereignis ohne *cross-over* treibt. Außerdem könnte Srs2p in bestimmten Situationen Nukleoproteinfilamente aus Rad51p und Einzelstrang-DNA auflösen, um so ungewollte Rekombinationsereignisse an der Entstehung zu hindern (Krejci *et al.*, 2003; Veaute *et al.*, 2003). In Abwesenheit von Srs2p wird das frühe Rekombinationsintermediat stabilisiert und reift schließlich zum *joint molecule* mit zwei Holliday-Strukturen. Die Auflösung dieser Holliday-Strukturen führt dann zu *cross-over*- oder nicht-*cross-over*-Produkten.

Wenn man also davon ausgeht, dass Srs2p am Scheidepunkt zwischen einem SDSA- und einem DSBR-artigen Prozess steht, dann bietet sich das in der genannten Studie verwendete Testsystem auch für eine nähere Untersuchung von *crp1*-Mutanten an. Durch die Messung von *cross-over*-Ereignissen in *srsΔcrp1Δ*-Zellen mit dem oben angesprochenen interchromosomalen Rekombinationstest könnte man die Rolle von Crp1p in der Prozessierung von Holliday-Strukturen näher untersuchen. Dabei könnte sich zeigen, dass Crp1p einen Einfluss auf den Ausgang eines Rekombinationsereignisses hat, ohne essentiell an diesem beteiligt zu sein. Derartige Effekte könnten durch die Messung der Lebensfähigkeit nach Induktion von DSBs, das heißt einem Test zur Fähigkeit einer Mutante, überhaupt HR durchzuführen, nicht festgestellt werden.

#### **4.5.2. Mitotische Rekombination und DNA-Replikation**

Holliday-Strukturen können auch dann auftreten, wenn Replikationsgabeln durch ein Hindernis blockiert werden. Die Prozessierung dieser Holliday-Strukturen ist notwendig, um die Replikation wieder in Gang zu bringen (McGlynn & Lloyd, 2002). In Abbildung 41 sind einige Szenarien des Replikations-Neustarts dargestellt.



**Abbildung 41: Mechanismen zum Neustart von Replikationsgabeln.**

Gezeigt sind verschiedene Möglichkeiten, eine blockierte Replikationsgabel wieder zu starten. Die zu replizierende DNA ist schwarz, neu synthetisierte DNA rot und die blockierende DNA-Läsion als grauer Kreis dargestellt. Weitere Erklärungen im Text (rote Pfeile markieren die Richtung der DNA-Synthese, blaue Pfeile endonukleolytische Schnitte; Abbildung verändert nach Haber & Heyer, 2001).

Durch die Regression der Replikationsgabel an einer Läsion entsteht ein Knotenpunkt von vier doppelsträngigen DNA-Segmenten (Abbildung 40A). Die Bildung dieser Art von Holliday-Strukturen wurde mehrfach nachgewiesen (Zou & Rothstein, 1997; Seigneur *et al.*, 1998; Postow *et al.*, 2001; Sogo *et al.*, 2002). Ist ein solches Intermediat gebildet worden, muss es prozessiert werden, um einen Neustart der Replikation zu ermöglichen. Dies kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, bei denen entweder eine Art *branch migration* oder eine nukleolytische Spaltung der Holliday-Struktur erfolgt (Abbildung 41B). Eine Spaltung führt zu einem rekombinogenen Doppelstrangende. Dieses kann wieder durch Rad51p-vermittelte Stranginversion in den schadhafte Doppelstrang eingefädelt werden. Es käme dann zur Ausbildung eines *D-loop*, an dem durch einsetzende Reparatursynthese wiederum eine Holliday-Struktur entstünde. Einen solchen Vorgang nennt man *break induced replication* (BIR), und er führt am Ende wieder zu einer intakten Replikationsgabel jenseits der Läsion (Abbildung 41E).

Alternativen zur Kanalisierung in den BIR-Prozess sind die Spaltung der blockierten Replikationsgabel vor ihrer Regression durch eine spezifische Endonuklease

(Abbildung 41C) oder ein HR-ähnlicher Prozess. Dazu würde bei der Synthese zunächst eine Lücke gegenüber der Läsion gelassen. Der entstandene einzelsträngige Bereich würde dann unter Ausbildung einer Holliday-Struktur mit der Matrize des anderen neu synthetisierten Stranges paaren (Abbildung 41D). Die Auflösung der Holliday-Struktur führt zu einem DSB, der die BIR einleitet.

Um zu testen, ob ein Protein eine spezialisierte Funktion in den beschriebenen, rekombinogenen Vorgängen übernimmt, kann man entsprechende Mutanten UV-Strahlung aussetzen. Durch die Bestrahlung werden Cyclobutan Pyrimidindimere und (6-4) Photoprodukte in der DNA erzeugt. An diesen Läsionen kommt es verstärkt zur Blockierung von Replikationsgabeln, was bei Abwesenheit eines Reparaturfaktors zu einer herabgesetzten Lebensfähigkeit der Zelle führt. Ein Beispiel für einen solchen Effekt ist die kürzlich in *S. pombe*, *S. cerevisiae* und im Menschen gefundene, mögliche X-Solvase: Mus81. Ihre Abwesenheit führt in mitotischen Hefezellen zu einer Anhäufung von Holliday-Strukturen (Gaillard *et al.*, 2003) und zu UV-Sensitivität. Anders als bei den Vertretern der RAD52-Epistasegruppe führt die Deletion von *MUS81* aber nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlung.

Da die Lebensfähigkeit von *crp1Δ*-Zellen nach UV-Bestrahlung im Vergleich zum Wildtyp nicht herabgesetzt war, ist davon auszugehen, dass Crp1p keine wesentliche Rolle im rekombinogenen DNA-Replikations-Neustart der Hefe spielt.

#### 4.5.3. Meiotische Rekombination

Experimentelle Daten zur meiotischen Rekombination belegen klar die vom DSBR-Modell geforderte Bildung von *joint molecules* mit zwei Holliday-Strukturen (Collins & Newlon, 1994; Schwacha & Kleckner, 1994). Diese Rekombinationsintermediate können von der bakteriellen X-Solvase RuvC unter Freisetzung von *cross-over*- oder nicht-*cross-over*-Produkten aufgelöst werden (Schwacha & Kleckner, 1995). Trotzdem wurde auch hier das DSBR-Modell erweitert. Die ursprüngliche Idee, dass die Entscheidung über die Beschaffenheit der Rekombinationsprodukte allein über die alternativen Auflösungsmöglichkeiten des *joint molecule* gefällt wird, wurde in aktuellen Arbeitsmodellen modifiziert. Man geht heute davon aus, dass bereits zu einem früheren Zeitpunkt Rekombinationsereignisse gezielt

in einen Prozess kanalisiert werden können, welcher zu nicht-*cross-over*-Ereignissen führt.

Der Nachweis von Intermediaten, die durch die Invasion eines Einzelstranges des Akzeptormoleküls in den Donor-Doppelstrang entstehen, sog. *single end invasion*- (SEI) Intermediate, zeigte, dass die beiden DNA-Enden eines DSB zeitlich versetzt mit dem Donor interagieren. Dies öffnet ein Zeitfenster für die Regulation von *cross-over*- und nicht-*cross-over*-Ereignissen (Hunter & Kleckner, 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass *joint molecules* mit zwei Holliday-Strukturen zur gleichen Zeit in der Meiose erscheinen wie nicht-*cross-over*-Rekombinanten. Die *cross-over*-Rekombinanten tauchen hingegen erst einige Zeit später auf (Allers & Lichten, 2001a). Nach dem DSBR-Modell sollten allerdings beide Rekombinanten-Typen gleichzeitig auftreten. Obwohl denkbar wäre, dass der Weg zu frühen nicht-*cross-over*-Rekombinanten über sehr kurzlebige Holliday-Strukturen führt, wurden die Daten dahingehend interpretiert, dass beide Rekombinanten-Typen durch unterschiedliche Mechanismen entstehen. Diese Vorstellung entspricht der aktuellen Sicht auf die mitotische Rekombination, die oben bereits beschrieben wurde.

Eine detaillierte Analyse der verschiedenen Rekombinanten in Hinblick auf Lage der Heteroduplex-Bereiche (Allers & Lichten, 2001b) führte zu folgendem Modell: Die Rekombination beginnt mit der Invasion eines Einzelstranges des Akzeptors in den Donor-Doppelstrang. Danach kann dieses SEI-Intermediat wieder destabilisiert werden, bevor es zu einer Interaktion des zweiten Bruchendes mit dem Donor kommt. Die Folge ist eine Rekombination nach dem SDSA-Modell. Wird das SEI-Intermediat stabilisiert, laufen die weiteren Schritte in guter Übereinstimmung mit dem klassischen DSBR-Modell bzw. nach dem SDSA-Modell mit *2nd end capture* ab (vgl. Abbildung 1 und Abbildung 40E bis H).

Man könnte also wie im Falle der mitotischen Rekombination argumentieren, dass die Zelle den Verlust von Holliday-Struktur prozessierenden Funktionen flexibel ausgleichen kann. Allerdings ist die Hefe bei der meiotischen Rekombination, anders als bei der mitotischen Rekombination, auf das Auftreten von *cross-over*-Ereignissen angewiesen, um lebensfähige Sporen zu bilden. Daher besteht hier eine unumgängliche Abhängigkeit von Funktionen der Holliday-Struktur Prozessierung. Um zu testen, ob

Crp1p eine Rolle in der meiotischen Rekombination spielt, wurden *crp1Δ*-Zellen zur Sporulation gebracht und mikroskopisch mit wildtypischen Zellen verglichen. Die Deletionsmutante ist zur Sporulation fähig und erzielt eine dem Wildtyp vergleichbare Sporulationseffizienz. Eine Stichprobe der gebildeten Sporen wuchs zu 100% zu Kolonien heran, so dass man von einer unbeeinträchtigten meiotischen Rekombination ausgehen kann. Damit wurde gezeigt, dass Crp1p keine grundlegende Rolle bei der Prozessierung von Holliday-Strukturen in der meiotischen Rekombination spielt. Allerdings gilt auch hier, dass subtilere Effekte, wie z.B. eine Veränderung der *cross-over*-Wahrscheinlichkeit an bestimmten Loci, oder eine verlangsamte Prozessierung von Rekombinationsintermediaten mit dieser Art phänotypischer Analyse nicht hätten offen gelegt werden können.

#### 4.5.4. Fazit

Seit dem maßgeblichen Postulat der Holliday-Struktur (Holliday, 1964) fahndet eine Vielzahl von Wissenschaftlern nach den eukaryotischen Faktoren, die diese Struktur prozessieren. Als Vorbild gilt das bakterielle RuvABC-Resolvasom. Vergleichbare Faktoren bei anderen Organismen konnten bisher nicht identifiziert werden.

Die phänotypische Analyse von *crp1Δ*-Zellen ergab keinen Hinweis auf eine Beteiligung an mitotischen oder meiotischen Rekombinationsprozessen. Gleichzeitig schließt sie die Beteiligung von Crp1p an Rekombinationsprozessen jedoch nicht gänzlich aus. Eine mögliche Störung im Ablauf der Rekombination könnte durch das Zurückgreifen auf einen alternativen Mechanismus ausgeglichen worden sein. Abgesehen davon besteht die Möglichkeit redundanter Proteinfunktionen, die die Rolle von Crp1p in seiner Abwesenheit übernehmen. Da Mdg1p aufgrund seiner Sequenzhomologie zu Crp1p als eine solche redundante Funktion in Frage kam, wurden bei der Analyse der UV- und Röntgenstrahlungstoleranz auch *mdg1Δcrp1Δ*-Doppelmutanten untersucht. Diese verhielten sich aber ebenso wie *crp1Δ*-Zellen wie der Wildtyp.

Um die Frage einer Beteiligung von Crp1p an Rekombinationsprozessen weiter zu klären, müssten einzelne Rekombinationsereignisse, wie bereits angesprochen, auf DNA-Ebene untersucht werden. Dabei könnten subtile Effekte von Crp1p auf die

Rekombination aufgedeckt werden. Solche Effekte könnten sich aus der Modulation einer X-Solvase-Aktivität, um den korrekten mechanistischen und zeitlichen Ablauf der Holliday-Struktur Auflösung zu garantieren, oder eine Präferenz für eine der alternativen Auflösungsmöglichkeiten zu schaffen, ergeben. Außerdem sind generell Rollen bei der Bildung und Stabilisierung von DNA-Intermediaten der Rekombination nicht auszuschließen. Da die Fülle an postulierten Intermediaten mit den Erweiterungen des klassischen DSBR-Modells zunimmt, sollte auch in Betracht gezogen werden, weitere DNA-Substrate auf Bindung durch Crp1p zu testen.

#### **4.6. Mögliche Protein-Protein Interaktionen von Crp1p**

Neben dem Versuch, eine mögliche Rolle von Crp1p in Rekombinationsprozessen nachzuweisen, wurde mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Methode nach Proteinen gesucht, die mit Crp1p in Wechselwirkung treten. Drei mögliche Interaktionspartner wurden identifiziert und geben, obwohl sie bislang nicht in biochemischen Experimenten verifiziert werden konnten, einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle von Crp1p *in vivo*.

##### **4.6.1. Ergebnisse der Hefe-2-Hybrid-Analyse**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Hefe-DNA-Banken durchmustert. Dazu wurden zunächst verschiedene Derivate von Crp1p, jeweils als C-terminale Fusion an der DNA bindenden Domäne von Gal4p als mögliche Köderproteine kloniert. Die Derivate GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-160</sup>, GAL4-DND-BD-Crp1p<sup>aa160-465</sup> und GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-465</sup> zeigten apparente Molekülmassen von 50 kDa, 70 kDa bzw. 92 kDa. Dabei nahm die Signalstärke, die für diese Derivate immunologisch auf *Western-blots* nachgewiesen werden konnte, in der gleichen Reihenfolge ab (vgl. Abbildung 25). Es ist unklar, ob Volle-Länge-Crp1p schwach exprimiert wurde oder aber instabil war. Da aber keine dem Derivat Crp1p<sup>aa1-160</sup> entsprechenden Bande nachgewiesen werden konnte, kam es hier nicht zu der in *E. coli* beobachteten, spezifischen Spaltung in der Nachbarschaft von Aminosäure 160. Alternativ könnte die Spaltung doch stattgefunden haben, aber dann müsste das Spaltprodukt weiter abgebaut worden sein. Möglicherweise wurde ein solcher Totalabbau durch die Expression von Crp1p als Fusionsprotein bedingt. Da aber mit GAL4-DNA-BD-Crp1p<sup>aa1-160</sup> das X-DNA bindende Subpeptid von Crp1p zur

Verfügung stand und für das Gelingen der Methode eine zuverlässige Expression des Köderproteins notwendig ist, wurde dieses Crp1p-Derivat verwendet. Falls in Hefe unter normalen Bedingungen ein vergleichbares X-DNA bindendes Derivat auftritt, sind es genau seine Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, die für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Bei den durchmusterten Hefe-DNA-Banken handelt es sich zum einen um eine genomische, zum anderen um eine cDNA-Bank. Das Durchmustern der genomischen Bank lieferte zunächst 18 Kandidaten, die zu einer Aktivierung der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* führten. Die entsprechenden Beuteplasmide wurden isoliert und sequenziert. Nur fünf der Plasmide codierten für *bona fide* Proteinsequenzen. Diese enthielten durchschnittlich 75 Aminosäuren. Kontrollexperimente zeigten, dass alle fünf proteincodierenden Plasmide zur Autoaktivierung der Reporter in Abwesenheit des Köderproteins führten (vgl. Seite 99). Damit kann hier keine Aussage über eine mögliche Wechselwirkung der identifizierten Proteine mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> gemacht werden. Da bei 10<sup>6</sup> durchmusterten Transformanten keine reproduzierbaren Hefe-2-Hybrid-Interaktionen nachgewiesen werden konnten, wurde die Arbeit mit dieser genomischen DNA-Bank eingestellt.

Das folgende Durchmustern einer cDNA-Bank lieferte 26 Kandidaten, die zu einer Reporterantwort führten. Nach Untersuchung der entsprechenden Beuteplasmide stellte sich heraus, dass ein großer Teil von ihnen, nämlich 22, für Hefe-Proteinfragmente codierten. 16 der 22 codierenden Sequenzen lagen im Leseraster der N-terminal fusionierten Aktivierungsdomäne von Gal4p. Die entsprechenden Beuteplasmide wurden Kontrollexperimenten unterzogen, bei denen sich die beobachtete Interaktion in drei Fällen bestätigte (vgl. Abbildung 26). Dabei handelte es sich um Fragmente der Proteine Drs1p, Gno1p und Egt2p (vgl. Abbildung 27). Der durch die Reportergene vermittelte Phänotyp Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Mel1<sup>+</sup> war im Falle von Gno1p wesentlich schwächer als in den beiden anderen Fällen. Da der Phänotyp aber reproduzierbar auftrat und keine Reporterantwort bei den Negativkontrollen erfolgte, wurde auch Gno1p weiter untersucht. Gno1p erscheint auch deshalb interessant, weil das Protein dem gleichen molekularen Prozess zuzuordnen ist wie Drs1p. Beide sind Funktionen der rRNA-Reifung, bei der sie an der Prozessierung des primären 35S rRNA Transkripts beteiligt sind (Ripmaster *et al.*, 1992; Guglielmi & Werner, 2002).

Der dritte Kandidat, Egt2p, wirkt wahrscheinlich als extrazelluläre Glukanase bei der Separation von Mutter- und Tochterzelle nach der Cytokinese (Pan & Heitman, 2000; Kovacech *et al.*, 1996).

#### 4.6.2. Biochemische Untersuchung der gefundenen Hefe-2-Hybrid-Interaktionen

Die gefundenen Hefe-2-Hybrid-Interaktionen von Crp1p<sup>aa1-160</sup> wurden biochemisch mittels Immunopräzipitation weiter untersucht. Dazu wurden zunächst *in vitro* exprimierte Spezies der zu testenden Proteine, die genau den im Hefe-2-Hybrid-System in Wechselwirkung tretenden Fragmenten entsprachen, verwendet. Die Proteinfragmente trugen hier nicht die jeweiligen Gal4p-Domänen, sondern lediglich eine c-Myc-Epitopmarkierung (Crp1p<sup>aa1-160</sup>) oder eine HA-Epitopmarkierung (Beuteproteine). Mit Antikörpern gegen je eine dieser Markierungen wurde versucht, beide Proteine zu präzipitieren. Eine solche Co-Immunopräzipitation konnte in einer Kontrollreaktion mit p53 und dem großen T-Antigen des SV40-Papovavirus gezeigt werden. Bei den Reaktionen mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> und den Beuteproteinen ergaben sich jedoch mehrere Schwierigkeiten:

(1) Die radioaktive Markierung der *in vitro* exprimierten Proteine erfolgte durch den Einbau von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin. Da die Beuteproteine aber nur 3 bis 4 Methionine enthielten, waren ihre *Phosphorimage*-Signale relativ schwach. Die Kontrollreaktion mit p53 und dem großen T-Antigen zeigte außerdem, dass auch bei bekanntermaßen interagierenden Proteinen die Ausbeute an Co-Präzipitat bei dieser Methode relativ gering ist (vgl. Abbildung 28c). Ein kombinierter Effekt des schwachen Signals der Beuteproteine zu Beginn der Reaktion und einer geringen Ausbeute bei der Co-Präzipitation müssen hier also ebenso für das Ausbleiben einer nachweisbaren Interaktion in Betracht gezogen werden, wie das tatsächliche Fehlen einer Interaktion.

(2) Die Präzipitation durch den gegen die Beuteproteine gerichteten Anti-HA Antikörper funktionierte weniger effizient als die Präzipitation durch den Anti-c-Myc Antikörper. Daher stellt sich speziell bei dieser Variante der Präzipitation die Frage, ob das Ausbleiben einer Co-Immunopräzipitation auf fehlende Wechselwirkung der Proteine oder einen Konzentrationseffekt zurückgeht.

Die technischen Schwierigkeiten führten dazu, dass für die Beuteproteine Gno1p und Egt2p keine auswertbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten. Beide Proteine waren nach einer Präzipitation durch den für sie spezifischen Anti-HA Antikörper nicht mehr nachweisbar. Daher war das Ausbleiben einer Co-Immunopräzipitation von Crp1p<sup>aa1-160</sup> nicht repräsentativ. In der Gegenreaktion mit dem Anti-c-Myc Antikörper konnte zwar Crp1p<sup>aa1-160</sup> präzipitiert werden, aber keines der beiden Beuteproteine. Auch hier stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis repräsentativ ist. Bei den Reaktionen mit Drs1p (vgl. Abbildung 28), das von allen drei Beuteproteinen das stärkste Anfangssignal aufwies, konnte ebenfalls keine Interaktion mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht gegen eine direkte Interaktion von Drs1p und Crp1p. Das Ergebnis könnte allerdings auch durch die oben genannten technischen Probleme zu Stande gekommen sein.

In einem zweiten Versuch, die im Hefe-2-Hybrid-System nachgewiesenen Wechselwirkungen zwischen Crp1p<sup>aa1-160</sup> und den Beuteproteinen Drs1p, Gno1p und Egt2p biochemisch zu verifizieren, wurden die Proteine im *S. cerevisiae* Stamm W303-1A exprimiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Proteine in einem System exprimiert werden, welches eine wildtypische posttranslationale Modifikation und Faltung erlaubt. Außerdem können große Mengen an Protein erzeugt werden. Da die Immunopräzipitation in einem Hefe-Lysat stattfindet, können auch indirekte Interaktionen, die durch ein drittes Protein vermittelt werden, nachgewiesen werden.

Für die entsprechenden Versuche wurden die Beuteproteine Drs1p<sup>aa538-752</sup>, Volle-Länge-Gno1p, Egt2p<sup>aa14-285</sup> und Egt2p<sup>aa1-1001</sup> sowohl einzeln als auch in Kombination mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> exprimiert. Drs1p<sup>aa538-752</sup> und Egt2p<sup>aa14-285</sup> entsprechen den Proteinanteilen, die in der Hefe-2-Hybrid-Analyse gefunden worden waren. *DRS1* konnte aus unbekanntem Gründen nicht in voller Länge kloniert werden. *EGT2* wurde zwar in voller Länge kloniert, das entsprechende Volle-Länge-Protein konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies geht wahrscheinlich auf die extrazelluläre Verankerung von wildtypischem Egt2p zurück (vgl. Seite 103). Bei der Lysatherstellung wurde es vermutlich mit den Zellwandtrümmern abzentrifugiert. Beim Derivat Egt2p<sup>aa1-1001</sup> fehlt die zur wildtypischen Lokalisation notwendige Region. Dieses Derivat konnte immunologisch nachgewiesen und getestet werden. Alle Beuteproteinderivate, die eine HA-Epitopmarkierung trugen, und Crp1p<sup>aa1-160</sup>, welches

eine c-Myc-Epitopmarkierung trug, wurden erwartungsgemäß exprimiert und konnten immunologisch nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 29). Weiterhin wurde gezeigt, dass die einzelnen Proteine über ihre jeweilige Epitopmarkierung präzipitiert werden konnten (vgl. Abbildung 30b und Abbildung 31b). Eine eindeutige Co-Immunopräzipitation ließ sich aber bei keiner Kombination eines Beuteproteins mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> feststellen (vgl. Abbildung 30a und Abbildung 31a). Die Signale für Crp1p<sup>aa1-160</sup> waren bei Präzipitation der Beuteproteine Drs1p<sup>aa538-752</sup> und Gno1p zwar etwas stärker als bei Egt2p<sup>aa14-285</sup> und Egt2p<sup>aa1-1001</sup>, hoben sich jedoch nicht stark genug vom Hintergrundsignal ab, um von einer Co-Immunopräzipitation zu sprechen. Außerdem spiegelte sich dieser Effekt in der Gegenreaktion bei Präzipitation mit dem Anti-HA Antikörper nicht wider.

Insgesamt brachten die Immunopräzipitationsversuche nicht die erhoffte biochemische Verifizierung der Hefe-2-Hybrid-Interaktionen von Crp1p<sup>aa1-160</sup>. Während die Versuche mit *in vitro* exprimierten Proteinen wegen technischer Limitierungen nicht zu repräsentativen Ergebnissen führten, verliefen die Versuche mit in Hefe exprimierten Proteinen erfolgsversprechend. Die Proteine waren in vergleichbarer Intensität nachweisbar und konnten über ihre jeweilige Epitopmarkierung präzipitiert werden. Da eine Co-Immunopräzipitation ausblieb, lässt sich schließen, dass die im Hefe-2-Hybrid-System nachgewiesenen Wechselwirkungen unter den verwendeten Bedingungen nicht stabil genug sind, um sie noch nachweisen zu können. Dies könnte besonders dann der Fall sein, wenn eine schwache oder transiente Wechselwirkung zwischen den Crp1p und einem der Beuteproteine vorliegt. Eine solche Interaktion könnte im Hefe-2-Hybrid-System nachgewiesen werden, denn dort wird das durch die Interaktion bewirkte Signal auf der Ebene der Transkription und Translation um ein Vielfaches potenziert. Der negative biochemische Befund schließt eine *in vivo* stattfindende Wechselwirkung also nicht aus.

In weiteren Versuchen sollten alternative biochemische Testverfahren, wie beispielsweise die Gelfiltration, angewandt werden. Dazu müssten die Proteine in gereinigter Form vorliegen, so dass sie sowohl alleine als auch in Kombination getestet werden können. Zeigt sich dabei eine Änderung der Elutionsgeschwindigkeit, könnte dies eine Wechselwirkung bestätigen. Alternativ könnte statt einer Co-Präzipitation ein affinitätschromatographischer Test gemacht werden. Dazu könnte das bereits

verfügbare rekombinante Crp1p<sup>aa1-160</sup> mit His-tag oder eine mit GST fusionierte Variante an eine Nickel- bzw. Glutathionsäule gebunden werden. Danach könnten Lysate der oben beschriebenen W303-1A-Stämme, die jeweils eines der Beuteproteine exprimieren, über die mit Crp1p<sup>aa1-160</sup> beladene Säule gegeben werden, um dann festzustellen, ob sich eines von ihnen anreichern lässt. Für weitere Arbeiten an Crp1p wäre eine biochemische Verifizierung der gefundenen Hefe-2-Hybrid-Interaktionen wünschenswert, um die Implikationen, welche die mutmaßlichen Interaktionspartner für Crp1p mit sich bringen, in die weitere Versuchsplanung einbeziehen zu können.

#### 4.6.3. Implikationen der Hefe-2-Hybrid-Interaktionen für die Rolle von Crp1p

Drs1p, Gno1p und Egt2p wurden durch die Hefe-2-Hybrid-Analyse als mögliche Interaktionspartner von Crp1p identifiziert. Da bislang die biochemische Verifizierung einer oder mehrerer dieser Interaktionen nicht gelang, stellt sich die Frage, welche der möglichen Wechselwirkungen aufgrund bekannter Daten zu den einzelnen Beuteproteinen plausibel erscheinen. Geht man davon aus, dass die *in vitro* beobachtete X-DNA Bindung von Crp1p auch *in vivo* eine Rolle spielt, ist eine Wechselwirkung mit dem extrazellulär lokalisierten Egt2p eher unwahrscheinlich. Außerdem muss bei diesem Kandidaten berücksichtigt werden, dass das im Hefe-2-Hybrid-System gefundene Fragment eine Sequenz von 22 proteinfremden Aminosäuren am C-Terminus trägt (vgl. Seite 105), die eventuell mit für die beobachtete Wechselwirkung verantwortlich ist. In diesem Fall wäre die Interaktion wahrscheinlich artifiziell. Um diesen Sachverhalt zu klären, könnte die Hefe-2-Hybrid-Analyse für Egt2p mit der bereinigten Aminosäuresequenz wiederholt werden. Einen genetischen Ansatz zur Frage der Interaktion von Crp1p und Egt2p bietet der Phänotyp von *egt2pΔ*-Zellen. Sie zeigen eine charakteristische Anlagerung von jeweils vier Zellen, die sich nach der Zellteilung erst verspätet trennen (Kovacech *et al.*, 1996). Da dieser Effekt lichtmikroskopisch nachweisbar ist, eignet er sich zur unkomplizierten Analyse bei *egt2pΔcrp1Δ*-Doppelmutanten. Eine Veränderung des Phänotyps könnte auf die tatsächliche Interaktion der beiden Proteine deuten.

Interessanter erscheint jedoch eine mögliche Interaktion mit Drs1p und Gno1p. Beide Proteine sind an der rRNA-Reifung beteiligt, und ihre Mutation führt zu Defekten im Prozess der Ribosomenbiogenese (Lafontaine & Tollervey, 2001). Dabei binden sie

wie Crp1p an Nukleinsäuren. Ihre Zielstruktur ist zwar die hoch strukturierte rRNA und nicht strukturierte DNA, wie bei Crp1p, aber strukturelle Gemeinsamkeiten dieser unterschiedlichen Nukleinsäurespezies sind durchaus denkbar. Man könnte also die Hypothese aufstellen, dass die eigentliche Zielstruktur von Crp1p nicht X-förmige DNA, sondern strukturierte RNA ist. Verschiedene Beobachtungen stützen diese Hypothese:

(1) Crp1p bindet strukturspezifisch DNA und zeigt keinerlei Affinität zu linearer Doppelstrang-DNA. Damit ist die Sekundärstruktur der DNA der exklusive Bindungsparameter. Hierin liegt die Möglichkeit eines Überlappungseffektes zwischen der beobachteten X-DNA-Bindung *in vitro* und einer potentiellen RNA-Bindung *in vivo*. Es wäre denkbar, dass lineare B-Form-DNA dem Protein deshalb keine Angriffspunkte bietet, da es auf die andersgeartete Konfiguration der RNA ausgerichtet ist, welche eine Vielzahl von Sekundärstrukturen ausbilden kann (Ban *et al.*, 2000). Die Dimensionen der kleinen bzw. großen Furche von DNA und RNA unterscheiden sich stark voneinander, und im Gegensatz zu DNA, die in der linearen Form die B-Form annimmt, ist doppelsträngige RNA nie über weite Strecken in der kanonischen A-Form organisiert. Stattdessen ist sie flexibler, und die Furchenweite variiert. Eine für B-Form-DNA untypische Konfiguration am Kreuzungspunkt der X-DNA könnte einer für bestimmte RNAs typischen Konfiguration ähneln. Auf diese Weise könnte sich die Affinität von Crp1p zu RNA *in vitro* als X-DNA-Bindung manifestieren.

(2) Zwei erst vor kurzem beschriebene X-DNA bindende Proteine sind BTF3 und  $\alpha$ NAC aus *S. pombe* (Whitby & Dixon, 2001). Jedes von ihnen alleine bindet X-DNA, während sich die Affinität nach Heterodimer-Bildung noch erhöht. Die beiden Proteine wurden in zellfreien Hefe-Extrakten mittels EMSA nachgewiesen und chromatographisch gereinigt. Die Identifikation erfolgte durch Proteinsequenzierung. Interessanterweise verhält sich der NAC-Komplex in DNA-Bindungsstudien, deren Reaktionsbedingungen sehr ähnlich zu den in dieser Arbeit beschriebenen DNA-Bindungsstudien sind, wie Crp1p. Er bindet X- und Y-DNA, aber kein anderes angebotenes Substrat aus einer Gruppe, die auch lineare Doppelstrang-DNA und Doppelstrang-Substrate mit ungepaarten Teilbereichen aufweist. Ebenso wie bei Crp1p kann die X-DNA-Bindung nicht von einem hohen Überschuss an Kompetitor-DNA verhindert werden. Damit ist der NAC-Komplex von allen bekannten X-DNA

bindenden Proteinen den Eigenschaften von Crp1p am ähnlichsten. Anders als im Falle von Crp1p, war der NAC-Komplex schon vor einer Reinigung über seine X-DNA bindende Aktivität bekannt. Er ist mit cytosolischen Ribosomen assoziiert und bindet an neu entstehende Polypeptidketten, deren spätere Lokalisation er beeinflusst (Wiedmann *et al.*, 1994). Da bei *S. cerevisiae* eine Untereinheit des NAC-Komplexes auch als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde (Parthun *et al.*, 1992), stellt sich die Frage, ob die gefundene X-DNA-Bindung die Assoziation des NAC-Komplexes mit Ribosomen über die rRNA, oder die mögliche zweite Rolle des Komplexes als Transkriptionsfaktor widerspiegelt. Die großen Übereinstimmungen der Eigenschaften von Crp1p und des NAC-Komplexes könnten jedenfalls ein Indiz dafür sein, dass auch Crp1p RNA bindet.

(3) Betrachtet man vor diesem Hintergrund die X-DNA-Bindedomäne von Crp1p, fallen Ähnlichkeiten mit RNA bindenden Proteinen auf. Wie bei verschiedenen RNA bindenden Proteinen findet sich eine Häufung positiver Ladungen. Im Falle der RNA bindenden Proteine spricht man von Arginin-reichen Sequenzen. Der Name bezieht sich auf den umfangreichen Gebrauch von Argininen für RNA-Kontakte, wobei es aber keine konservierten Positionen gibt, so dass man nicht von einem klassischen Motiv sprechen kann (Draper, 1999). Der Umstand, dass die X-DNA bindende Domäne von Crp1p keine Homologie zu bekannten DNA bindenden Domänen aufweist, könnte also auch bedeuten, dass es sich um ein derartiges flexibles RNA bindendes Sequenzmotiv handelt.

(4) Die beobachtete subzelluläre Lokalisation von GFP-Crp1p (vgl. Abbildung 37) spricht gegen eine nukleäre Rolle von Crp1p und damit gegen eine Rolle im DNA-Metabolismus. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei der cytoplasmatischen Lokalisation von GFP-Crp1p auch um einen artifiziellen Effekt aufgrund der Überexpression und N-terminalen Fusion des GFP-Anteils handeln kann. Geht man aber davon aus, dass Crp1p auch im wildtypischen Zustand im Cytoplasma zu finden ist, könnte es dort an Ribosomen binden. Dann stellt sich aber die Frage, wie Crp1p mit Drs1p und Gno1p, welche im Zellkern – genauer im Nukleolus – an der rRNA-Reifung und dem Zusammenbau der Ribosomen beteiligt sind, interagieren könnte. Eine mögliche Antwort liefert wiederum der Vergleich mit dem bereits angesprochenen NAC-Komplex. Dieser liegt wie GFP-Crp1p größtenteils im Cytoplasma vor. Allerdings können seine Untereinheiten durch die Kernmembran

transportiert werden und sich vorübergehend im Kern aufhalten (Franke *et al.*, 2001). Dort binden sie wahrscheinlich an ihr Zielobjekt Ribosom und verlassen den Kern dann ribosomenassoziiert. Wenn Crp1p eine ähnliche Route durch den Kern nimmt, könnte es dort im Prozess des Ribosomen-Zusammenbaus transient mit Drs1p und Gno1p in Wechselwirkung treten.

Diese Überlegungen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch sehr spekulativ. Im Falle einer Verifizierung der Wechselwirkungen zwischen Crp1p, Drs1p und Gno1p können sie allerdings die Grundlage für weiterführende Experimente zu Crp1p sein.

#### **4.7. Ausblick**

Crp1p ist ein neues Mitglied der Gruppe der X-DNA bindenden Proteine. Die zukünftige Arbeit an diesem Protein sollte sich an der Frage der biologischen Rolle von Crp1p und der biologischen Signifikanz der beobachteten X-DNA-Bindung orientieren.

Die Frage, ob Crp1p an Rekombinationsprozessen beteiligt ist, bleibt bislang ungeklärt. Wie bereits ausgeführt, spielt Crp1p keine entscheidende Rolle beim reibungslosen Ablauf der HR. Dennoch ist eine Einflussnahme nicht auszuschließen. Insbesondere der stimulierende Effekt von Crp1p auf die X-Solvase-Aktivität von Endo VII spricht für eine solche Einflussnahme. Subtile Effekte könnten durch den bereits angesprochenen interchromosomalen Rekombinationstest (vgl. Seite 132), bei dem einzelne Rekombinationsprozesse im Detail untersucht werden können, nachgewiesen werden.

Neben der Rekombination wurde durch die Hefe-2-Hybrid-Interaktionen ein zweiter molekularer Prozess sichtbar, an dem Crp1p beteiligt sein könnte: Die Biogenese bzw. Funktion der Ribosomen. In diesem Zusammenhang bieten sich zwei Betätigungsfelder an. Das eine ist die weitere Charakterisierung der Wechselwirkungen von Crp1p mit Nukleinsäuren. Als nächstes sollte hier eine mögliche Bindung von strukturierter, eventuell X-förmiger RNA untersucht werden. Wenn Crp1p an RNA-Substrate bindet, erhärtet sich einerseits der Verdacht einer Interaktion mit Drs1p und Gno1p. Andererseits könnte dies die auch beim X-DNA bindenden Protein-Komplex NAC gefundene, exklusive Bindung von X- und Y-DNA erklären. Man müsste dann davon ausgehen, dass Crp1p – wie vielleicht auch andere X-DNA bindende Proteine –

molekular auf die Bindung von RNA abgestimmt ist und deshalb keine lineare Doppelstrang-DNA erkennt. Hilfreich für das Verständnis der Nukleinsäurebindung wäre ein Co-Kristall von Crp1p und einer X-DNA oder gegebenenfalls einer X-RNA. Hier ließen sich vermutlich die entscheidenden Aminosäuren für die Nukleinsäure-Bindung direkt sehen.

Das zweite Betätigungsfeld wäre die Untersuchung von *crp1drs1*- und *crp1gnol*-Doppelmutanten. Dabei sollte die Frage untersucht werden, ob sich der Phänotyp der Einzelmutanten, die Anhäufung von unprozessierten rRNA-Zwischenprodukten, verstärkt. Wenn ein solcher Effekt nachgewiesen werden könnte, wären nicht nur die Hefe-2-Hybrid Interaktionen bestätigt. Man hätte damit auch ein physiologisches Testsystem für zukünftige Mutagenese-Studien an Crp1p.

Ein weiterer Aspekt ist die Architektur der Chromosomen. Sowohl auf der Ebene einzelner Regulatorelemente als auch auf der höheren Ebene der Chromosomenkondensation finden sich Proteinfunktionen, die *in vitro* spezifisch an X-DNA binden. Dazu gehören die DNA-Architektur vermittelnden HMG-Box-Proteine (Thomas, 2001) und 14-3-3 Proteine, die an cruziforme DNA an Replikationsursprüngen binden (Zannis-Hadjopoulos *et al.*, 2002). Daneben wurde gezeigt, dass Histone und Condensine (Yokomori, 2003) X-förmige DNA binden (Varga-Weisz *et al.*, 1993; Varga-Weisz *et al.*, 1994; Kimura & Hirano, 1997; Akhmedov *et al.*, 1998). Diese Proteine gehen vielfältige Kontakte mit der DNA ein, so dass die *in vitro* beobachtete X-DNA Bindung auf das gleichzeitige erkennen zweier benachbarter DNA-Doppelstränge und nicht auf die spezielle Architektur des Kreuzungspunktes zurückzuführen sein könnte. In dieser Richtung sind für Crp1p aus Zeitgründen bisher noch keine Untersuchungen gemacht worden. In Zukunft sollten daher *crp1*-Mutanten auch auf intakte Chromosomenorganisation geprüft werden.

Neben den speziellen Fragen, die Crp1p betreffen, bleibt die globale Frage nach den Funktionen der späten HR bei Eukaryoten. Hier wird sich zeigen, ob die mittlerweile bei Hefe angewandte genomweite, systematische Suche nach neuen *RAD*-Genen die unentdeckten Funktionen zu Tage fördert (Game *et al.*, 2003). Der biochemische Ansatz sollte für die Suche nach diesen Funktionen eventuell neben der Holliday-Struktur um die typischen Intermediate des SDSA-Modells erweitert werden.

## 5. Zusammenfassung

Bei genetischen Rekombinationsvorgängen tritt eine vierarmige DNA-Struktur, die sog. Holliday-Struktur auf. Für *in vitro* Experimente wird ein Struktur analog, die sog. X-DNA verwendet. Eine Reihe sehr unterschiedlicher Proteine ist in der Lage, diese charakteristische DNA-Struktur spezifisch zu erkennen. In einigen Fällen lässt sich ein klarer Bezug zur Rekombination herstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues X-DNA bindendes Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Durch eine Serie von Flüssigkeitschromatographien wurde es aus Rohextrakten soweit angereinigt, dass seine Identität geklärt werden konnte. Die Identifikation gelang mit Hilfe der *Southwestern* Technik. Eine anschließende Proteinsequenzierung ergab, dass es sich um das bisher uncharakterisierte Produkt des offenen Leserasters *YHR146W* handelte. Dem 465 Aminosäuren umfassenden Protein wurde der funktionelle Name *Cruciform DNA-Recognising Protein 1* (Crp1p) gegeben.

Das Gen *CRP1* wurde kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die Aktivität des rekombinanten Proteins in EMSAs bestätigte Crp1p als Urheber der mit Hefe-Extrakten beobachteten Aktivität. Das rekombinante Protein erwies sich allerdings als anfällig für eine effiziente posttranslationale Spaltung in der direkten Umgebung von Aminosäure 160. Dabei ergibt sich ein X-DNA bindendes N-terminales- und ein unter bestimmten Bedingungen X-DNA bindendes, aber in Anwesenheit von Kompetitor-DNA inaktives, C-terminales Subpeptid. Die auf der Architektur des DNA-Substrates beruhende DNA-Bindung des N-terminalen Peptids wird durch eine neuartige X-DNA-Bindedomäne vermittelt. Diese besitzt nach derzeitigem Stand eine 22 Aminosäuren umfassende, positiv geladene Minimalsequenz, die als autonomes X-DNA bindendes Subpeptid fungieren kann. Phänotypische Untersuchungen an *crp1*-Mutanten ergaben bislang keinen Hinweis auf eine Beteiligung an Rekombinationsprozessen. So ließ sich keine erhöhte Sensitivität gegenüber UV- oder Röntgenstrahlung und kein meiotischer Defekt nachweisen. Um weiter zu klären, an welchem molekularen Ablauf Crp1p beteiligt ist, wurde mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Analyse nach Proteinen gesucht, die mit Crp1p in Wechselwirkung treten. Dabei wurden zwei RNA bindende Proteine, Drs1p und Gno1p gefunden. Beide sind an der rRNA-Reifung beteiligt, so dass die Möglichkeit aufgeworfen wurde, dass Crp1p *in vivo* nicht strukturierte DNA, sondern RNA bindet.

## 6. Anhang

Liste X-DNA bindender Proteine (Stand: Dezember 2003).

<b>Protein</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
Hmg1	<i>Rattus norvegicus</i>	Bianchi <i>et al.</i> , 1989
Adprt	<i>Bos taurus</i>	Sastry & Kun, 1990
RuvA	<i>E. coli</i>	Parsons <i>et al.</i> , 1992
SRY	<i>Homo sapiens</i>	Ferrari <i>et al.</i> , 1992
Hu	<i>E. coli</i>	Pontiggia <i>et al.</i> , 1993
H1	<i>Gallus gallus</i>	Varga-Weisz <i>et al.</i> , 1993
H5	<i>Gallus gallus</i>	Varga-Weisz <i>et al.</i> , 1994
UBF	<i>Xenopus laevis</i>	Kuhn <i>et al.</i> , 1994
Nhp6Ap	<i>S. cerevisiae</i>	Paull & Johnson, 1995
Nhp6Bp	<i>S. cerevisiae</i>	Paull & Johnson, 1995
SWI/SNF	<i>S. cerevisiae</i>	Quinn <i>et al.</i> , 1996
Condensin	<i>Xenopus laevis</i>	Kimura & Hirano, 1997
Hmp1	<i>Ustilago maydis</i>	Dutta <i>et al.</i> , 1997
Msh2p	<i>S. cerevisiae</i>	Alani <i>et al.</i> , 1997
p53	<i>Homo sapiens</i>	Lee <i>et al.</i> , 1997
Rp S16	<i>E. coli</i>	Bonnefoy, 1997
CBP	<i>Homo sapiens</i>	Todd <i>et al.</i> , 1998
Smc1p	<i>S. cerevisiae</i>	Akhmedov <i>et al.</i> , 1998
Smc2p	<i>S. cerevisiae</i>	Akhmedov <i>et al.</i> , 1998
mtTF1	<i>Homo sapiens</i>	Ohno <i>et al.</i> , 2000
E6	Papilloma Virus	Ristriani <i>et al.</i> , 2000
BRAF35	<i>Homo sapiens</i>	Marmorstein <i>et al.</i> , 2001
NAC	<i>S. pombe</i>	Whitby & Dixon, 2001
XPA	<i>Homo sapiens</i>	Missura <i>et al.</i> , 2001
Bmh1p	<i>S. cerevisiae</i>	Callejo <i>et al.</i> , 2002
Bmh2p	<i>S. cerevisiae</i>	Callejo <i>et al.</i> , 2002
Crp1p	<i>S. cerevisiae</i>	Rass & Kemper, 2002
VLF-1	Baculovirus	Mikhailov & Rohrmann, 2002
Rad51B	<i>Homo sapiens</i>	Yokoyama <i>et al.</i> , 2003
Vimentin	Säugerzellen	Li <i>et al.</i> , 2003

## 7. Literaturverzeichnis

- Abadjieva, A., Hilven, P., Pauwels, K. & Crabeel, M. (2000). The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* *275*, 11361-11367.
- Akhmedov, A.T., Frei, C., Tsai-Pflugfelder, M., Kemper, B., Gasser, S.M. & Jessberger, R. (1998). Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure [In Process Citation]. *J Biol Chem* *273*, 24088-24094.
- Alani, E., Lee, S., Kane, M.F., Griffith, J. & Kolodner, R.D. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J. Mol. Biol.* *265*, 289-301.
- Allers, T. & Lichten, M. (2001a). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* *106*, 47-57.
- Allers, T. & Lichten, M. (2001b). Intermediates of yeast meiotic recombination contain heteroduplex DNA. *Mol. Cell* *8*, 225-231.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. (1999). G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 342-344.
- Arcangioli, B. (2000). Fate of mat1 DNA strands during mating-type switching in fission yeast. *EMBO Rep.* *1*, 145-150.
- Ariyoshi, M., Vassylyev, D.G., Iwasaki, H., Nakamura, H., Shinagawa, H. & Morikawa, K. (1994). Atomic structure of the RuvC resolvase: A Holliday junction-specific endonuclease from *E.coli*. *Cell* *78*, 1063-1072.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* *289*, 905-920.
- Barnes, W.M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 2216-2220.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTech* *14*, 920-924.
- Beachy, P.A., Cooper, M.K., Young, K.E., von Kessler, D.P., Park, W.J., Hall, T.M., Leahy, D.J. & Porter, J.A. (1997). Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *62*, 191-204.
- Bennett, R.J., Dunderdale, H.J. & West, S.C. (1993). Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion. *Cell* *74*, 1021-1031.

- Bennett, R.J. & West, S.C. (1995). RuvC protein resolves Holliday junctions via cleavage of the continuous (noncrossover) strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5635-5639.
- Benson, F.E. & West, S.C. (1994). Substrate specificity of the *Escherichia coli* RuvC protein. Resolution of three- and four-stranded recombination intermediates. *J. Biol. Chem.* *269*, 5195-5201.
- Bianchi, M.E. (1988). Interaction of a protein from rat liver nuclei with cruciform DNA. *EMBO J.* *7*, 843-849.
- Bianchi, M.E., Beltrame, M. & Paonessa, G. (1989). Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* *243*, 1056-1059.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., III & Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* *107*, 537-548.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.D. & Russell, P. (2000). Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8758-8766.
- Bonnefoy, E. (1997). The ribosomal S16 protein of *Escherichia coli* displaying a DNA-nicking activity binds to cruciform DNA. *Eur. J. Biochem.* *247*, 852-859.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & 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.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Brunborg, G., Resnick, M.A. & Williamson, D.H. (1980). Cell-cycle-specific repair of DNA double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.* *82*, 547-558.
- Burke, D., Dawson, D. & Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual.* (Plainview: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Callejo, M., Alvarez, D., Price, G.B. & Zannis-Hadjopoulos, M. (2002). The 14-3-3 protein homologues from *Saccharomyces cerevisiae*, Bmh1p and Bmh2p, have cruciform DNA-binding activity and associate *in vivo* with ARS307. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 38416-38423.
- Chen, X.B., Melchionna, R., Denis, C.M., Gaillard, P.H.L., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M.N., Russell, P., Vialard, J. & McGowan, C.H. (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves holliday junctions *in vitro*. *Mol. Cell* *8*, 1117-1127.

- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 9578-9582.
- Collins, I. & Newlon, C.S. (1994). Meiosis-specific formation of joint DNA molecules containing sequences from homologous chromosomes. *Cell* *76*, 65-75.
- Constantinou, A., Chen, X.B., McGowan, C.H. & West, S.C. (2002). Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO Journal* *21*, 5577-5585.
- Constantinou, A., Davies, A.A. & West, S.C. (2001). Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell* *104*, 259-268.
- de la Cruz, J., Kressler, D. & Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 192-198.
- Dingwall, C., Sharnick, S.V. & Laskey, R.A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* *30*, 449-458.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* *16*, 6127-6145.
- Draper, D.E. (1999). Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.* *293*, 255-270.
- Dutta, S., Gerhold, D.L., Rice, M., Germann, M. & Kmiec, E.B. (1997). The cloning and overexpression of a cruciform binding protein from *Ustilago maydis*. *Biochim. Biophys. Acta* *1352*, 258-266.
- Edman, P. & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* *1*, 80-91.
- Eggleston, A.K. & West, S.C. (1996). Exchanging partners: Recombination in *E. coli*. *TIG* *12*, 20-26.
- Elborough, K.M. & West, S.C. (1988). Specific binding of cruciform DNA structures by a protein from human extracts. *Nucleic Acids Res.* *16*, 3603-3616.
- Elborough, K.M. & West, S.C. (1990). Resolution of synthetic Holliday junctions in DNA by an endonuclease activity from calf thymus. *EMBO J.* *9*, 2931-2936.
- Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. & Davis, R.W. (1991). Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 1731-1735.
- Fabre, F., Boulet, A. & Roman, H. (1984). Gene conversion at different points in the mitotic cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *195*, 139-143.

- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K. & Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* *30*, 235-238.
- Fasullo, M., Giallanza, P., Dong, Z., Cera, C. & Bennett, T. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* rad51 mutants are defective in DNA damage-associated sister chromatid exchanges but exhibit increased rates of homology-directed translocations. *Jpn. J Genet.* *158*, 959-972.
- Ferguson, D.O. & Holloman, W.K. (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 5419-5424.
- Ferrari, S., Harley, V.R., Pontiggia, A., Goodfellow, P.N., Lovell Badge, R. & Bianchi, M.E. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* *11*, 4497-4506.
- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.
- Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Kohlerl, M. & Wiedmann, B. (2001). Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J. Cell Sci.* *114*, 2641-2648.
- Gaillard, P.H., Noguchi, E., Shanahan, P. & Russell, P. (2003). The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol. Cell* *12*, 747-759.
- Game, J.C., Birrell, G.W., Brown, J.A., Shibata, T., Baccari, C., Chu, A.M., Williamson, M.S. & Brown, J.M. (2003). Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation. *Radiat. Res.* *160*, 14-24.
- Gao, W., Tyagi, S., Kramer, F.R. & Goldman, E. (1997). Messenger RNA release from ribosomes during 5'-translational blockage by consecutive low-usage arginine but not leucine codons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *25*, 707-716.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. & Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* *418*, 387-391.

- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. & Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* *11*, 355-360.
- Gietz, R.D. & Sugino, A. (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* *74*, 527-534.
- Gilbertson, L.A. & Stahl, F.W. (1996). A test of the double-strand break repair model for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jpn. J Genet.* *144*, 27-41.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563-546, 567.
- Gonzalez-Barrera, S., Cortes-Ledesma, F., Wellinger, R.E. & Aguilera, A. (2003). Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast. *Mol. Cell* *11*, 1661-1671.
- Grigoriev, M. & Hsieh, P. (1997). A histone octamer blocks branch migration of a Holliday junction. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 7139-7150.
- Guglielmi, B. & Werner, M. (2002). The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition. *J. Biol. Chem.* *277*, 35712-35719.
- Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 271-275.
- Haber, J.E. & Heyer, W.D. (2001). The fuss about Mus81. *Cell* *107*, 551-554.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. & Kitada, K. (1999). Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* *181*, 3886-3889.
- Hargreaves, D., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., Artymiuk, P.J., Lloyd, R.G. & Rafferty, J.B. (1998). Crystal structure of *E.coli* RuvA with bound DNA Holliday junction at 6 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 441-446.
- Heyer, W.D., Ehmsen, K.T. & Solinger, J.A. (2003). Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends Biochem. Sci.* *28*, 548-557.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic Research* *5*, 282-304.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. & O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686-691.

- Hunter, N. & Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106, 59-70.
- Hyde, H., Davies, A.A., Benson, F.E. & West, S.C. (1994). Resolution of recombination intermediates by a mammalian activity functionally analogous to *Escherichia coli* RuvC resolvase. *J. Biol. Chem.* 269, 5202-5209.
- Interthal, H. & Heyer, W.D. (2000). MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 812-827.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. & Haber, J.E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* 115, 401-411.
- Jensch, F. (1989). Nachweis, Reinigung und Charakterisierung einer DNA-Struktur-spezifischen Endonuclease (Endonuclease X3) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Köln.
- Jensch, F., Kosak, H., Seeman, N.C. & Kemper, B. (1989). Cruciform cutting endonucleases from *Saccharomyces cerevisiae* and phage T4 show conserved reactions with branched DNAs. *EMBO J.* 8, 4325-4334.
- Jeyaseelan, R. & Shanmugam, G. (1988). Human placental endonuclease cleaves Holliday junctions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156, 1054-1060.
- Kadyk, L.C. & Hartwell, L.H. (1992). Sister Chromatids Are Preferred over Homologs as Substrates for Recombinational Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jpn. J. Genet.* 132, 387-402.
- Kaliraman, V., Mullen, J.R., Fricke, W.M., Bastin-Shanower, S.A. & Brill, S.J. (2001). Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev.* 15, 2730-2740.
- Keeney, S., Giroux, C.N. & Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375-384.
- Kemper, B., Jensch, F., von Depka-Prondzynski, M., Fritz, H.J., Borgmeyer, U.M. & Mizuuchi, K. (1984). Resolution of Holliday structures by endonuclease VII as observed in interactions with cruciform DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49, 815-825.
- Kimura, K. & Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90, 625-634.
- Kleff, S., Kemper, B. & Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* 11, 699-704.

- Kotani, H., Kmiec, E.B. & Holloman, W.K. (1993). Purification and properties of a cruciform DNA binding protein from *Ustilago maydis*. *Chromosoma* 102, 348-354.
- Kovacech, B., Nasmyth, K. & Schuster, T. (1996). EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol. Cell Biol.* 16, 3264-3274.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T. & Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* 423, 305-309.
- Kuhn, A., Voit, R., Stefanovsky, V., Evers, R., Bianchi, M. & Grummt, I. (1994). Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity. *EMBO J.* 13, 416-424.
- Kupfer, C. (1998). Charakterisierung von cruciform-DNA-auflösenden Enzymen (X-Solvase) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Köln.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafontaine, D.L. & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 514-520.
- Leberer, E., Chenevert, J., Leeuw, T., Harcus, D., Herskowitz, I. & Thomas, D.Y. (1996). Genetic interactions indicate a role for Mdg1p and the SH3 domain protein Bem1p in linking the G-protein mediated yeast pheromone signalling pathway to regulators of cell polarity. *Mol. Gen. Genet.* 252, 608-621.
- Lee, S.M., Cavallo, L. & Griffith, J. (1997). Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 272, 7532-7539.
- Li, B. & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7, 957-963.
- Li, G., Tolstonog, G.V. & Traub, P. (2003). Interaction in vitro of type III intermediate filament proteins with Z-DNA and B-Z-DNA junctions. *DNA Cell Biol.* 22, 141-169.
- Lilley, D.M. & White, M.F. (2001). The junction-resolving enzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 433-443.
- Lilley, D.M.J. & Norman, D.G. (1999). The Holliday junction is finally seen with crystal clarity. *Nature Struct. Biol.* 6, 897-899.

- Longtine, M.S., McKenzie, A., III, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. & Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953-961.
- Lukowsky, K. (1991). Nachweis einer X-Solvase und eines X-DNA-bindenden Proteins in Rohextrakten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit geschlossener cruciformer DNA. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Marmorstein, L. Y., Kinev, A.V., Chan, G.K., Bochar, D.A., Beniya, H., Epstein, J.A., Yen, T.J. & Shiekhatter, R. (2001). A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* *104*, 247-257.
- McGill, C., Shafer, B. & Strathern, J. (1989). Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell* *57*, 459-467.
- McGlynn, P. & Lloyd, R.G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 859-870.
- Meselson, M.S. & Radding, C.M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 358-361.
- Mikhailov, V. & Rohrmann, G. (2002). Binding of the baculovirus very late expression factor 1 (VLF-1) to different DNA structures. *BMC. Molecular. Biology.* *3*, 14.
- Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hubscher, U., Kasparkova, J., Brabec, V. & Naegeli, H. (2001). Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO J.* *20*, 3554-3564.
- Mizuuchi, K., Kemper, B., Hays, J. & Weisberg, R.A. (1982). T4 endonuclease VII cleaves Holliday structures. *Cell* *29*, 357-365.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* *28*, 292.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R. & Gloor, G.B. (1994). Efficient Copying of Nonhomologous Sequences from Ectopic Sites via P-Element-Induced Gap Repair. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1613-1625.
- Neef, K., Birkenbihl, R. P. & Kemper, B. (2002). Holliday Junction Resolving Enzymes from Eight Hyperthermophile Archaea Differ in Reactions with Cruciform DNA. *Extremophiles* *6*, 359-367.
- Ohno, T., Umeda, S., Hamasaki, N. & Kang, D. (2000). Binding of human mitochondrial transcription factor A, an HMG box protein, to a four-way DNA junction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 492-498.

- Orr-Weaver, T.L. & Szostak, J.W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 4417-4421.
- Pan, X. & Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8364-8372.
- Panyutin, I.G., Biswas, I. & Hsieh, P. (1995). A pivotal role for the structure of the Holliday junction in DNA branch migration. *EMBO J.* *14*, 1819-1826.
- Paques, F. & Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 349-404.
- Paques, F., Leung, W.Y. & Haber, J.E. (1998). Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* *18*, 2045-2054.
- Parsons, C.A., Stasiak, A., Bennett, R.J. & West, S.C. (1995). Structure of a multisubunit complex that promotes DNA branch migration. *Nature* *374*, 375-378.
- Parsons, C.A., Tsaneva, I., Lloyd, R.G. & West, S.C. (1992). Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5452-5456.
- Parsons, C.A. & West, S.C. (1993). Formation of a RuvAB-Holliday junction complex in vitro. *J. Mol. Biol.* *232*, 397-405.
- Parthun, M.R., Mangus, D.A. & Jaehning, J.A. (1992). The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding. *Mol. Cell Biol.* *12*, 5683-5689.
- Paull, T.T. & Johnson, R.C. (1995). DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation. *J. Biol. Chem.* *270*, 8744-8754.
- Pearson, C.E., Zannis Hadjopoulos, M., Price, G.B. & Zorbas, H. (1995). A novel type of interaction between cruciform DNA and a cruciform binding protein from HeLa cells. *EMBO J.* *14*, 1571-1580.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551-3567.
- Perler, F.B. (2002). InBase: the Intein Database. *Nucleic Acids Res.* *30*, 383-384.
- Pontiggia, A., Negri, A., Beltrame, M. & Bianchi, M.E. (1993). Protein HU binds specifically to kinked DNA. *Mol. Microbiol.* *7*, 343-350.

- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V. & Cozzarelli, N.R. (2001). Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J. Biol. Chem.* *276*, 2790-2796.
- Pottmeyer, S. & Kemper, B. (1992). T4 endonuclease VII resolves cruciform DNA with nick and counter-nick and its activity is directed by local nucleotide sequence. *J. Mol. Biol.* *223*, 607-615.
- Pöhler, J.R., Norman, D.G., Bramham, J., Bianchi, M.E. & Lilley, D.M. (1998). HMG box proteins bind to four-way DNA junctions in their open conformation. *EMBO J.* *17*, 817-826.
- Prado, F., Cortes-Ledesma, F., Huertas, P. & Aguilera, A. (2003). Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *42*, 185-198.
- Quinn, J., Fyrberg, A.M., Ganster, R.W., Schmidt, M.C. & Peterson, C.L. (1996). DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* *379*, 844-847.
- Rafferty, J.B., Sedelnikova, S.E., Hargreaves, D., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sharples, G.J., Mahdi, A.A., Lloyd, R.G. & Rice, D.W. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science* *274*, 415-421.
- Rass, U. (1999). Nachweis, Reinigung und Charakterisierung einer cruziforme-DNA-bindenden Aktivität der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Rass, U. & Kemper, B. (2002). Crp1p, a new cruciform DNA-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* *323*, 685-700.
- Richardson, C.C. (1965). Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage- infected *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *54*, 158-165.
- Ripmaster, T.L., Vaughn, G.P. & Woolford, J.L., Jr. (1992). A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 11131-11135.
- Ristriani, T., Masson, M., Nomine, Y., Laurent, C., Lefevre, J.F., Weiss, E. & Trave, G. (2000). HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J. Mol. Biol.* *296*, 1189-1203.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. & Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* *64*, 615-623.
- Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* *11*, 2600-2621.
- Roepstorff, P. (1997). Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr. Opin. Biotechnol.* *8*, 6-13.

- Rothstein, R.J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* *101*, 202-211.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*, C. Nolan, ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5463-5467.
- Sastry, S.S. & Kun, E. (1990). The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *167*, 842-847.
- Schmiemann, V. (2001). Experimente zur Identifizierung von X-DNA bindenden Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Schwacha, A. & Kleckner, N. (1994). Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell* *76*, 51-63.
- Schwacha, A. & Kleckner, N. (1995). Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* *83*, 783-791.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. & Michel, B. (1998). RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* *95*, 419-430.
- Sharples, G.J., Ingleston, S.M. & Lloyd, R.G. (1999). Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J. Bacteriol.* *181*, 5543-5550.
- Snyder, L. & Champness, W. (2003). *Molecular Genetics of Bacteria.* (Washington DC: American Society for Microbiology).
- Sogo, J.M., Lopes, M. & Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* *297*, 599-602.
- Strathern, J.N., Shafer, B.K. & McGill, C.B. (1995). DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair. *Jpn. J Genet.* *140*, 965-972.
- Studier, W.F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1991). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In *Methods in Enzymology* Vol. 185, D.V. Goeddel, ed. (San Diego: Academic Press, Inc.), pp. 60-89.
- Sugawara, N., Wang, X. & Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol. Cell* *12*, 209-219.
- Sugiyama, T. & Kowalczykowski, S.C. (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* *277*, 31663-31672.

- Sung, P., Trujillo, K.M. & Van Komen, S. (2000). Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 451, 257-275.
- Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630-70, table of contents.
- Symington, L.S. & Kolodner, R. (1985). Partial purification of an enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* that cleaves Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7247-7251.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. & Stahl, F.W. (1983). The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Teixeira, M.T., Siniossoglou, S., Podtelejnikov, S., Benichou, J.C., Mann, M., Dujon, B., Hurt, E. & Fabre, E. (1997). Two functionally distinct domains generated by in vivo cleavage of Nup145p: a novel biogenesis pathway for nucleoporins. *EMBO J.* 16, 5086-5097.
- Thiemann, F. (1995). Nachweis, Reinigung und Charakterisierung von cruciforme DNA bindenden Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Köln.
- Thomas, B.J. & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619-630.
- Thomas, J.O. (2001). HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 395-401.
- Todd, A., Cossons, N., Aitken, A., Price, G.B. & Zannis-Hadjopoulos, M. (1998). Human cruciform binding protein belongs to the 14-3-3 family. *Biochemistry* 37, 14317-14325.
- Varga-Weisz, P., Van Holde, K. & Zlatanova, J. (1993). Preferential binding of histone H1 to four-way helical junction DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 20699-20700.
- Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S.H., Schroth, G.P. & Van Holde, K. (1994). Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four-way junction DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3525-3529.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Le Cam, E. & Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 423, 309-312.
- Ward, A.C. (1990). Single-step purification of shuttle vectors from yeast for high frequency back-transformation into *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 18, 5319.
- West, S.C. (1996). The RuvABC proteins and holliday junction processing in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 178, 1237-1241.
- West, S.C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* 31, 213-244.

- West, S.C. & Korner, A. (1985). Cleavage of cruciform DNA structures by an activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 6445-6449.
- Whitby, M.C. & Dixon, J. (2001). Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J. Mol. Biol.* *306*, 703-716.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A. & Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* *370*, 434-440.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W. & . (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* *285*, 901-906.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. & Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* *17*, 3469-3478.
- Ye, Q. & Worman, H.J. (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp. Cell Res.* *219*, 292-298.
- Yokomori, K. (2003). SMC protein complexes and the maintenance of chromosome integrity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *274*, 79-112.
- Yokoyama, H., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S. & Shibata, T. (2003). Holliday Junction Binding Activity of the Human Rad51B Protein. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 2767-2772.
- Zannis-Hadjopoulos, M., Novac, O., Alvarez, D. & Price, G.B. (2002). 14-3-3s are DNA-replication proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 397-401.
- Zhang, S.G., Lockshin, C., Herbert, A., Winter, E. & Rich, A. (1992). Zuo1, a Putative Z-DNA Binding Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*. *EMBO J.* *11*, 3787-3796.
- Zlatanova, J. & Van Holde, K. (1998). Binding to four-way junction DNA: a common property of architectural proteins? *FASEB J.* *12*, 421-431.
- Zou, H. & Rothstein, R. (1997). Holliday junctions accumulate in replication mutants via a RecA homolog-independent mechanism. *Cell* *90*, 87-96.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bőrries Kemper für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Ich habe bei meiner Forschung von der konstruktiven und angenehmen Arbeitsatmosphäre sehr profitiert. Für meine Fragen und Probleme hatte Prof. Dr. Kemper stets ein offenes Ohr.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Übernahme des Co-Referats und die Betreuung meiner Arbeit im Rahmen des Doktorandenprogramms.

Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich ebenfalls für die Betreuung im Doktorandenprogramm und seine kompetente Beratung in allen Fragen zum Thema Hefe. Ein großes Dankeschön auch an die Mitglieder seiner Forschungsgruppe, insbesondere Ingrid Schwienhorst, Marcel Fröhlich, Markus London und Kristina Uzunova, die sich immer Zeit für Hilfestellung bei meinen Experimenten nahmen.

Ein großer Dank auch an Anja Hochheiser und Shivani Chatterjee für ihre Hilfe bei der Massenspektroskopie. Sajith Dass und Patrick Kalscheuer danke ich für die Einführung in die Benutzung der Röntgenstrahlenquelle. Martin Hobe danke ich für seine Hilfsbereitschaft beim Vorbereiten von Vorträgen und beim Korrekturlesen von Texten aller Art. Weiterhin danke ich Imke Barnstedt und Christoph Rass für die praktische Hilfe bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Sehr dankbar bin ich auch für die gute Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppenmitgliedern Vera-Bräutigam-Illner, Viola Schmiemann, Klaus Neef, Rainer Birkenbihl und Holger Hasselmann.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir das Promotionsstudium ermöglicht haben.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. B. Kemper betreut worden.

Köln, Dezember 2003

Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit:

Rass, U. & Kemper, B. (2002). Crp1p, a new cruciform DNA-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 323, 685-700.

## Curriculum Vitae

### Ulrich Rass

Gerolsteiner Strasse 13  
50937 Köln

Geburtsdatum: 01. Dezember 1973

Geburtsort: Saarlouis

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

- |               |  |
|---------------|--|
| Seit 2000     | Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotionsstudent bei Professor Börries Kemper im Labor für Genetik und Gentechnologie, Institut für Genetik, Universität zu Köln<br>Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs „Genetik zellulärer Systeme“  |
| 1999          | Studienabschluss mit Diplom in Biologie  |
| 1999          | Studentische Hilfskraft und Diplomand bei Professor Börries Kemper im Labor für Genetik und Gentechnologie, Institut für Genetik, Universität zu Köln<br>Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Nachweis, Reinigung und Charakterisierung einer cruziforme-DNA-bindenden Aktivität der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ |
| 1997 bis 1999 | Hauptstudium an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten Genetik, Biochemie und Entwicklungsbiologie  |
| 1993 bis 1997 | Grundstudium an der Universität des Saarlandes, Fachbereich Biologie   |
| 1995 bis 1996 | Zivildienst als Mitarbeiter des Deutschen Roten Kreuz  |
| 1993          | Schulabschluss mit Abitur  |
| 1991          | Schulabschluss mit amerikanischem High-School-Diplom   |
| 1990 bis 1991 | Auslandsjahr mit Besuch der Okemos High-School in Okemos, Michigan, USA  |
| 1985 bis 1993 | Besuch des Robert-Schuman-Gymnasiums in Saarlouis  |

Köln, Dezember 2003