

**Zur Rolle des RNA-Polymerase-II Elongators aus *Saccharomyces cerevisiae* für die Wirkung des *Kluyveromyces lactis* Toxins**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn

**Dipl.-Biol. Frank Frohloff**

geb. am 20.09.1963 in Berlin

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Bölker, Philipps-Universität Marburg
2. PD. Dr. habil. R. Schaffrath, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den 15. 04. 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008441**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008441>]

		Seite
<b>I</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	1
II	Kongresse	1
III	Abstracts	2
IV	Poster	2
<b>1</b>	<b>Einführung</b>	3
1.1	Einleitung	3
1.2	Lineare Plasmide in Hefen	4
1.3	Genomorganisation der <i>K. lactis</i> Killerplasmide	7
1.4	Replikation der <i>K. lactis</i> Killerplasmide k1 und k2	8
1.5	Genexpression der <i>K. lactis</i> Killerplasmide k1 und k2	9
1.6.	Das k1 Killerplasmid kodierte Zymocin	10
1.7	Der Zymocin vermittelte Zellzyklusarrest	10
1.8	Zymocin-Bindung und $\gamma$ -Toxintranslokation in die Zielzelle	12
1.9	Immunität & Resistenz gegen das <i>K. lactis</i> Zymocin	14
1.10	Zielstellung der Promotionsarbeit	16
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	17
2.1	Material	17
2.1.1	Bezugsquellen	17
2.1.1.1	Chemikalien	17
2.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.1.3	Geräte	19
2.1.1.4	Puffer	20
2.1.1.5	Kits	21
2.1.2	<b>Proteine</b>	21
2.1.2.1	Protein-Marker	21
2.1.2.2	Enzyme	21
2.1.2.3	Antikörper	21
2.1.3	<b>Nukleinsäuren</b>	22
2.1.3.1	Genbank	22
2.1.3.2	DNA-Marker	22
2.1.3.3	Vektoren & Plasmide	22
2.1.3.4	Oligonukleotide	23
2.1.3.5	Primer	23
2.1.4	<b>Kulturmedien &amp; Kulturplatten</b>	26
2.1.4.1	<i>E. coli</i> Wachstumsmedien	26
2.1.4.2	Hefe Wachstumsmedien	26
2.1.5	<b>Mikroorganismen</b>	27
2.1.5.1	Bakterienstämme	27
2.1.5.2	Hefestämme	28
2.1.5.3	<i>Kluyveromyces lactis</i> Stämme	28
2.1.5.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	28
2.2.1	<b>Methoden</b>	30
2.2.1.1	Wachstum der Bakterien	30
2.2.1.2	Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen	30
2.2.1.3	Bakterien-Transformation durch Elektroporation	30
2.2.1.4	Wachstum der Hefezellen ( <i>S. cerevisiae</i> )	31

2.2.1.5	Anlegen von Hefe-Dauerkulturen	31
2.2.1.6	Hefe-Transformation durch Lithium-Acetat	31
2.2.1.7	Hefe-Transformation durch Elektroporation	32
2.2.2	<b>Phänotypische Analysen</b>	32
2.2.2.1	Killertoxin-Eklipse-Assay	32
2.2.2.2	Endotoxin-Assay	32
2.2.2.3	Weitere Phänotypische Analysen	32
2.2.2.4	β-Galaktosidase exprimierenden Hefen = LacZ-Assay	33
2.2.2.5	Kreuzen der Hefezellen	33
2.2.3	<b>DNA-Methoden</b>	33
2.2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.2.3.2	Isolierung Chromosomaler DNA aus Hefezellen	34
2.2.3.3	Reinigung & Konzentrierung von Nukleinsäuren	34
2.2.3.4	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCA) Extraktion	34
2.2.3.5	Ethanol-Präzipitierung	35
2.2.3.6	Konzentrationsbestimmung mit dem Spektralphotometer	35
2.2.3.7	Analytische & präparative Gelelektrophorese von DNA	35
2.2.4	<b>Enzymatische Reaktionen an der DNA</b>	36
2.2.4.1	Restriktionsverdau von DNA	36
2.2.4.2	Klonierung von DNA	36
2.2.4.3	Dephosphorylierung von DNA	36
2.2.4.4	Ligation von DNA	36
2.2.4.5	TOPO™ TA Cloning®	36
2.2.4.6	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.4.7	Primer	37
2.2.4.8	PCR zur Amplifizierung eines ORFs aus dem Hefegenom	38
2.2.4.9	Anfügen von Adenin am 3'-Ende eines linearen DNA-Stranges	38
2.2.4.10	PCR vermittelte Gendisruption in Hefezellen	38
2.2.5	<b>Lokalisation der mTn3 Insertion im Hefegenom</b>	39
2.2.5.1	Ligierung der Anchor-Bubble Primer	39
2.2.5.2	Die Vektorette PCR an der Hefe DNA	40
2.2.5.3	Sequenzierung mit dem ABI 377	40
2.2.5.4	Analyse & Vergleich der Sequenzdaten	40
2.2.6	<b>Protein-Methoden</b>	41
2.2.6.1	Protein-Extraktion aus Hefezellen	41
2.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	41
2.2.6.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-Page)	41
2.2.6.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	42
2.2.6.5	<i>In vivo</i> Epitop-Tagging der Hefezellen	43
2.2.6.6	Co-Immunpräzipitation	43
2.2.6.7	Kopplung der Antikörper an die Protein A-Sepharose (PAS)	43
2.2.6.8	Co-Immunpräzipitation der Proteinextrakte	44
2.2.6.9	Immunlokalisation von Proteinen in der Hefezelle	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	46
3.1	Identifizierung der <i>TOT</i> Gene durch mTn3-Mutagenese	46
3.1.1	Lokalisierung der mTn3 Insertion im Hefegenom	48
3.2	Analyse der <i>tot1-5Δ</i> Phänotypen	50
3.3	Disruption der <i>TOT6/ELP6</i> und <i>TOT7/ELP4</i> Gene	55
3.3.1	Analyse der <i>tot6Δ/elp6Δ</i> und <i>tot7Δ/elp4Δ</i> Phänotypen	56
3.4	Homologe Totp Proteine	59

3.5	Überexpression der <i>TOT</i> Gene	62
3.6	Phänotypische Analyse erhöhter <i>TOT4</i> Gendosis	63
3.7	Die HAT-Aktivität des Tot3p Proteins	65
3.7.1	Einfluß der HAT-Aktivität von Tot3p auf die <i>tot</i> -Phänotypen	66
3.7.2	N-terminale Histon H3 und H4 Mutationen	67
3.8	Nachweis der Totp Proteine	69
3.8.1	Immunlokalisation der Totp Proteine in der Hefezelle	70
3.9	Co-Immunpräzipitation der Totp Proteine	70
3.9.1	Die Interaktion der Totp Proteine im Elongator-Komplex	72
3.9.2	Die Deletion von <i>TOT1</i> und <i>TOT2</i>	73
3.9.3	Die Deletion von <i>TOT3</i>	74
3.9.4	Die Deletion & erhöhte <i>TOT4</i> Gendosis beim Elongatoraufbau	75
3.9.5	Die Deletion von <i>TOT1</i> , <i>TOT2</i> , <i>TOT3</i> , <i>TOT6</i> und <i>TOT7</i>	76
3.9.6	C-Terminale Verkürzungen von <i>TOT1</i>	79
3.9.7	C-Terminale Verkürzungen von <i>TOT2</i>	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	86
4.1	Identifikation der <i>TOT</i> Gene & Analyse der Phänotypen	86
4.1.1	Disruption der <i>TOT6</i> und <i>TOT7</i> Gene	87
4.2	Homologe Totp Proteine in anderen Organismen	89
4.3	Die Histonacetyltransferasen (HATs) der Hefezelle	92
4.3.1	Die HAT-Aktivität von Tot3p	92
4.3.2	N-terminale Histon H3 und H4 Mutationen	93
4.4	Erhöhte Gendosis der <i>TOT</i> Gene	94
4.5	Nachweis und Co-Immunpräzipitation der Totp Proteine	96
4.6	Immunlokalisation der Tot1-4p Proteine in der Hefezelle	97
4.7	Die Interaktion der Tot1p-6p Proteine im Elongator-Komplex	98
4.8	Das Elongator-Modell	101
4.9	Das Arbeitsmodell der Zymocin-Wirkung	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	108
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	109
6.1	Alignments der Totp Proteine & <i>TOT</i> Daten	109
6.1.1	Tot1p Alignment & <i>TOT1</i> Daten	109
6.1.2	Tot2p Alignment & <i>TOT2</i> Daten	111
6.1.3	Tot3p Alignment & <i>TOT3</i> Daten	113
6.1.4	Tot4p Alignment & <i>TOT4</i> Daten	115
6.1.5	Tot5p Alignment & <i>TOT5</i> Daten	117
6.1.6	<i>TOT6</i> Daten	117
6.1.7	Tot7p Alignment & <i>TOT7</i> Daten	118
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	120
7.1.	Buchstaben-Codes der Aminosäuren	123
7.2	Abkürzungen der Basen-Wobbles	123
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	124
8.1	Danksagung	138
8.2	Curriculum Vitae	139
8.3	Erklärung	140

## I Veröffentlichungen

**Frohloff F**, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD and Schaffrath R (2001): *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *EMBO J* **20**: 1993-2003.

Jablonowski D, **Frohloff F**, Fichtner L, Stark MJR and Schaffrath R (2001b): *Kluyveromyces lactis* zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator. *Mol Microbiol* **42**: 1095-1106.

Fichtner L, **Frohloff F**, Bürkner K, Larsen M, Breunig KD and Schaffrath R (2002a): Molecular analysis of *KT112/TOT4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol Microbiol* **43**:783-791

Fichtner L, **Frohloff F**, Jablonowski D, Stark MJR and Schaffrath R (2002b): Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* Elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocinicity. *Mol Microbiol* **45**: 817-826.

**Frohloff F**, Jablonowski D, Fichtner L, Schaffrath R (2003): Subunit Communications Crucial for the Functional Integrity of the Yeast RNA Polymerase II Elongator (gamma -Toxin Target (TOT)) Complex. *J Biol Chem* **10**: 278(2):956-61.

Fichtner L, Jablonowski D, **Frohloff F** and Schaffrath R: Phenotypic Analysis of the *Kluyveromyces lactis* Killer Phenomenon. Chapter 28, in Non-Conventional Yeast in Genetics, Biochemistry and Biotechnology: Practical Protocols. K Wolf, K Breunig, G Barth eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003

Jablonowski D, Fichtner L, **Frohloff F** and Schaffrath R: Chitin-Binding Capability of the Zymocin Complex from *Kluyveromyces lactis*. Chapter 30, in Non-Conventional Yeast in Genetics, Biochemistry and Biotechnology: Practical Protocols. K Wolf; K Breunig, G Barth eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003

## II Kongresse

An folgenden Kongressen wurden während dieser Studie teilgenommen:

Cell Cycle Genetics. Gesellschaft für Genetik, GfG-Workshop, Leucorea-Stiftung, Lutherstadt Wittenberg. 07. – 09. April 2000

Gene Transcription in Yeast. Euroconference on Signal Transduction, Transcriptional Regulation and Chromatin Structure. Euresco Conference of the European Science Foundation. Albufeira, Portugal, 02. – 07. June 2000.

Gene, Chromosomes, Genomes. Annual Meeting of the German Genetics Society (GfG). Martin-Luther-Universität Halle. 04. – 06. October 2001

### III Abstracts

**Frohloff F**, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig K D and Schaffrath R: The Cell Cycle Toxin from *Kluyveromyces lactis*. Gesellschaft für Genetik, GfG-Workshop Cell Cycle Genetics. Leucorea-Stiftung, Lutherstadt Wittenberg, Germany 07. – 09. April 2000

**Frohloff F**, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD and Schaffrath R: Yeast Elongator-Associated RNA Polymerase II: the *Kluyveromyces lactis* Toxin-Target? Euresco Conference of the European Science Foundation. Albufeira, Portugal, 02. – 07. June 2000.

Jablonowski D, **Frohloff F**, Fichtner L, Breunig KD and Schaffrath R: The *Kluyveromyces lactis* Zymocin Mode of Action Pathway. International Symposium on Yeast 2000, Papendal, Arnhem, Netherlands, 27. August – 01. September 2000.

Jablonowski D, Fichtner L, **Frohloff F** and Schaffrath R: *Kluyveromyces lactis* Zymocin Action is linked to RNA Polymerase II Function Via Elongator. Annual Meeting of the German Genetics Society (GfG). Martin-Luther-Universität Halle. 04. – 06. October 2001

### IV Poster

**Frohloff F**, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD and Schaffrath R: Yeast Elongator-Associated RNA Polymerase II: the *Kluyveromyces lactis* Toxin-Target?

Fichtner L, **Frohloff F**, Jablonowski D, Breunig KD, Schaffrath R: The *Kluyveromyces lactis* Zymocin Mode of Action. International Symposium on Yeast 2000, Papendal, Arnhem, Netherlands, 27. August – 01. September 2000.

Fichtner L, **Frohloff F**, Jablonowski D and Schaffrath R: *Kluyveromyces lactis* Zymocin Action is linked to RNA Polymerase II Function Via Elongator.

Jablonowski D, Fichtner L, **Frohloff F** and Schaffrath R: *Kluyveromyces lactis* Zymocin may Target RNA Polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae* Via Elongator.

# 1 Einführung

## 1.1 Einleitung

Hefen werden als einzellige Pilze definiert. Gegenwärtig gibt es weit über 4000 rezente Hefestämme die näher beschrieben sind. Die Gattungen *Saccharomyces* und *Kluyveromyces* gehören zu der Familie der Endomycetaceae, den ascosporogenen Hefen, die sogenannten perfekten Hefen. Die ascosporogenen Hefen sind zur sexuellen Reproduktion befähigt, das heißt sie durchlaufen einen geschlossenen Entwicklungszyklus mit einer haploiden und einer diploiden Phase. Dieser Phasenwechsel ist charakteristisch für die perfekten Hefen und macht sie als Modellorganismus gerade deshalb für genetische Studien interessant und zugänglich (Weber 1982; Walker 1998; Strathern et al. 1981, 1982). Ein weiterer Vorteil der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus liegt darin, daß sich deren nichtessentielle Gene im Genom *in vivo* leicht disruptieren lassen (Scherer & Davis 1979; Rothstein 1983), wodurch viele experimentelle Ansätze und Untersuchungen möglich sind. Des weiteren kommt hinzu, daß die Bäckerhefe *S. cerevisiae* der erste eukaryontische Organismus ist, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Goffeau et al. 1996 & 1997). Zwischenzeitlich konnten die Genome von allen wichtigen Modellorganismen wie *Homo sapiens* (Venter et al. 2001; Lander et al. 2001), *Drosophila melanogaster* (Adams et al. 2000), *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998), *Mus musculus* (Abril et al. 2002), *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) und von *Schizosaccharomyces pombe* (Wood et al. 2002) sequenziert werden. Dies ermöglicht weitere Analysen und Rückschlüsse auf die Konservierung der einzelnen Gene zwischen den verschiedenen Organismen.

Alle Organismen, sowohl prokaryontische als auch eukaryontische, konkurrieren in der Natur um die verschiedensten Nährstoffe und Habitate. So haben die Mikroorganismen im Laufe der Evolution die unterschiedlichsten Strategien entwickelt, das Wachstum von Nahrungskonkurrenten im gleichen Habitat zu unterbinden, um so einen selektiven Wachstumsvorteil zu erhalten. Am bekanntesten sind hier unter anderem die Antibiotika Produzenten der Prokaryonten. Antibiotika sind von Bakterien gebildete Stoffe die das Wachstum von Bakterien hemmen oder sie abtöten. Sie entfalten ihre Wirksamkeit in außerordentlich geringen Konzentrationen. Als Beispiel für Antibiotika produzierende Bakterien wäre hier die

Vertreter der Gattung *Streptomyces* zu erwähnen sowie einige *Escherichia coli* Stämme die Colicine produzieren.

Unter den Hefen konnten ebenfalls Stämme identifiziert werden, die biologisch wirksame Substanzen sekretieren, die andere Mikroorganismen abtöten oder sie im Wachstum hemmen. Dadurch verschaffen sie sich einen Vorteil im Konkurrenzkampf um die begrenzten Nahrungsressourcen. Man nennt diese Hefestämme auch Killerhefen. Diese Killerphänotypen sind in den verschiedensten Hefearten zu finden, so zum Beispiel auch in den Stämmen von *S. cerevisiae* (Wickner et al. 1996), *Pichia acaciae* (McCracken et al. 1994) und *Kluyveromyces lactis* (Stark et al. 1990). Der genetische Hintergrund und die Wirkungsweise der sekretierten Killertoxine ist ebenfalls sehr verschieden. Oft befinden sich die Gene, welche die Killertoxine kodieren, auf extrachromosomalen DNA oder RNA Elementen, die wahrscheinlich viralen Ursprungs sind (Wickner et al. 1992 & 1996). So produzieren zum Beispiel Stämme von *S. cerevisiae* Killertoxine die von doppelsträngigen RNA Plasmiden kodiert sind (Wickner et al., 1996). Im Gegensatz dazu sind die Killertoxine von *K. lactis* und *Williopsis mrakii* von linearen DNA Plasmiden kodiert (Stark et al. 1990; Schaffrath et al. 1999). In allen Fällen werden toxische Proteine sekretiert, die es dem Toxinproduzenten erlaubt sensitive Zielzellen zu töten oder deren Proliferation zu arretieren. Ein gut untersuchtes Killersystem ist der gegen *S. cerevisiae* wirksame toxische Proteinkomplex Zymotoxin (Synonym: Zymocin) der Milchhefe *K. lactis*. Es führt bei sensitiven Hefezellen zu einem Zellteilungsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Die durch das Zymotoxin arretierten Hefezellen verharren nicht-sprossend im präSTART Bereich des Zellzyklus. Interessanterweise sind die Hefezellen noch bevor sie den Zellzyklus präSTART erreichen und dort arretieren noch transient, metabolisch aktiv und erfahren eine Zellvolumenzunahme von 30% (Butler et al. 1991a). Besondere Bedeutung bei der Erforschung dieser Killersysteme kommt vor allem den biotechnologischen und für die Lebensmittelindustrie relevanten Hefen *S. cerevisiae* und *K. lactis* zu.

## **1.2 Lineare Plasmide in Hefen**

In Hefen kommen verschiedene extrachromosomale Elemente vor, die sich im Zellkern, in den Mitochondrien oder im Zytoplasma befinden. Die ersten linearen Plasmide in Hefezellen wurden im Zytoplasma von Killerstämmen der Art *K. lactis* gefunden (Gunge et al. 1981), später auch in weiteren Hefearten, wie *Pichia acaciae*

(Worsham & Bolen 1990). Lineare Plasmide existieren jedoch nicht nur in Hefen, sondern sind auch in vielen anderen pro- und eukaryontischen Organismen anzutreffen. Erstmals wurden sie in *Zea mays* 1977 gefunden (Pring et al. 1977). Seitdem wurden in vielen prokaryontischen Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces*, in den Hyphenpilzen wie z. B. *Agaricus bitorquis* (Robinson et al. 1991), in Grünalgen und in höheren Pflanzen lineare Plasmide gefunden. Oft assoziieren mit diesen linearen Plasmiden jedoch keine Phänotypen, wie es z. B. bei den Killerplasmiden der Hefen der Fall ist. Meistens liegen die Plasmide kryptisch in den Organismen vor. Die linearen Plasmide sind autonom replizierende genetische Elemente, die in ihrem Aufbau den Adenoviren und linearen Phagen (*Bacillus subtilis* Phage  $\Phi 29$ ) ähneln. Neben ihrer charakteristischen Linearität zeichnen sie sich durch den Besitz von Terminal Invertierten Sequenzwiederholungen (TIRs = Terminal Inverted Repeats) und kovalent an den 5' Enden der DNA gebundene terminale Proteine (TPs = terminal proteins) aus (Meinhardt et al. 1990; Schaffrath et al. 1999). Eine Ausnahme bilden die sogenannten Hairpin-Plasmide, deren Enden in Haarnadelstrukturen auslaufen.

Von der Hefe *S. cerevisiae* gibt es ebenfalls Killerstämme, die meistens dsRNA-Viren in hoher Kopienzahl im Zytoplasma besitzen. Diese ds-RNA-Viren verleihen den Hefezellen die Fähigkeit zur Produktion und Sekretion eines antibiotischen Killertoxins. So besteht z.B. das Killervirus ScV-M (= *S. cerevisiae* Virus-M) aus einer M-dsRNA, von der in der Hefezelle dann eine M+ssRNA transkribiert wird, die dann zu einem Präprotoxin translatiert wird. Nach Eintransport in das ER-Lumen, wird das N-terminale Sekretionssignal durch eine Signalpeptidase abgespalten. Das so entstandene Protoxin wird dann im Golgi durch die Endopeptidase Kex2p zum heterodimeren  $\alpha/\beta$ -Toxin prozessiert und anschließend in einen sekretorischen Vesikel sezerniert (Schmitt & Breinig 2002; Leis et al. 2004). Eines der bestuntersuchteten Toxine ist das K28-Toxin von *S. cerevisiae*. Bei dem K28-Toxin handelt es sich um ein heterodimeres  $\alpha/\beta$ -Toxin, daß durch eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Hefezelle aufgenommen wird und dann den Sekretionsweg retrograd in umgekehrter Richtung durchläuft (Eisfeld et al. 2000; Sandvig & van Deurs 2002). Nach der Aufnahme gelangt das  $\alpha/\beta$ -Toxin durch das  $\beta$ -C-terminale HDEL-Aminosäremotiv, eine ER-Adresse, in den Golgi und in das ER-Lumen. Der Transport des Toxindimers aus dem ER-Lumen in das Zytosol erfolgt durch den Sec61 Transportkanal-Komplex mit Hilfe der luminalen Chaperone Kar2p, Scj1p,

Jem1p und Pdi1p. Auf welche Weise das K28-Toxin *in vivo* den Sec61 Kanal passiert ist derzeit noch unbekannt. Im Zytosol wird die  $\beta$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit abgetrennt, ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Die verbleibende  $\alpha$ -Untereinheit gelangt anschließend in den Zellkern. Ähnlich wie das  $\gamma$ -Toxin von *K. lactis* verursacht das K28  $\alpha$ -Toxin einen irreversiblen Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase so daß die arretierten Hefezellen einen präreplikativen DNA-Gehalt besitzt.

Im Gegensatz zu den dsRNA kodierten Toxinen, sind auch dsDNA kodierte Toxine in Hefen verbreitet. Neben dem dsDNA Killersystem von *K. lactis* sind weitere plasmid kodierte dsDNA Killersysteme von *Pichia acaciae*, *Pichia inositovora* und *Wingea robertsiae* bekannt (Worsham & Bolen 1990; Hayman & Bolen 1991; Klassen & Meinhardt 2002). Die Killerplasmide von *P. etchellsii* (pPE1A), *P. acaciae* (pPac1-2) und *W. robertsiae* (pWR1A) besitzen jeweils einen ORF der ähnlich zu der  $\alpha$ -Untereinheit des *K. lactis* Zymocin ist (Stark & Boyd 1986; Stark et al. 1990). Wie die  $\alpha$ -Untereinheit kodieren die Killerplasmide von *P. acaciae* und *W. robertsiae* ein Protein das ein Chitin-Bindemotiv und eine Chitinase-Domäne besitzt. Durch Chitin-Affinitäts-Chromatographie konnte *in vitro* nachgewiesen werden, daß es sich dabei tatsächlich um Chitin-Bindeproteine handelt (Jablonowski et al. 2001a; Klassen & Meinhardt 2002 & 2003). Es konnte gezeigt werden, daß Verlust der Chitinsynthese-Gene wie *chs3* $\Delta$  in *S. cerevisiae* Zellen zur resistent gegen die exogenen Toxine von *P. acaciae*, *W. robertsiae* und *K. lactis* führt. Damit ist das Chitin Voraussetzung für die Toxinwirkung von *P. acaciae*, *W. robertsiae* und *K. lactis*. Die Chitinbindung ist somit ein gemeinsames Merkmal für diese Killertoxine.

Trotz der gemeinsamen Eigenschaft an Chitin zu binden, gibt es im Genom der Killerplasmide von *P. acaciae* und *W. robertsiae* keine weiteren homologe und auch keine Immunitäts homologen Proteine zu dem *K. lactis* Killersystem (Klassen et al. 2004). So sind die Killertoxine von *P. acaciae* und *W. robertsiae* weder in ihrer Sequenz noch in ihrer Funktion mit dem *K. lactis* Toxin verwandt. Die *P. acaciae* und *W. robertsiae* Toxine benötigen für ihre Wirkung keinen funktionellen RNApol-II Elongator-Komplex wie es bei dem  $\gamma$ -Toxin von *K. lactis* der Fall ist. Elongator-Mutanten *tot1-7* $\Delta$  die gegen das  $\gamma$ -Toxin von *K. lactis* resistent sind (Frohloff et al. 2001 & Jablonowski et al. 2001b), verhalten sich weiterhin Sensitiv gegen die Toxine von *P. acaciae* und *W. robertsiae* (Klassen et al. 2004). Dagegen ist das Toxin von

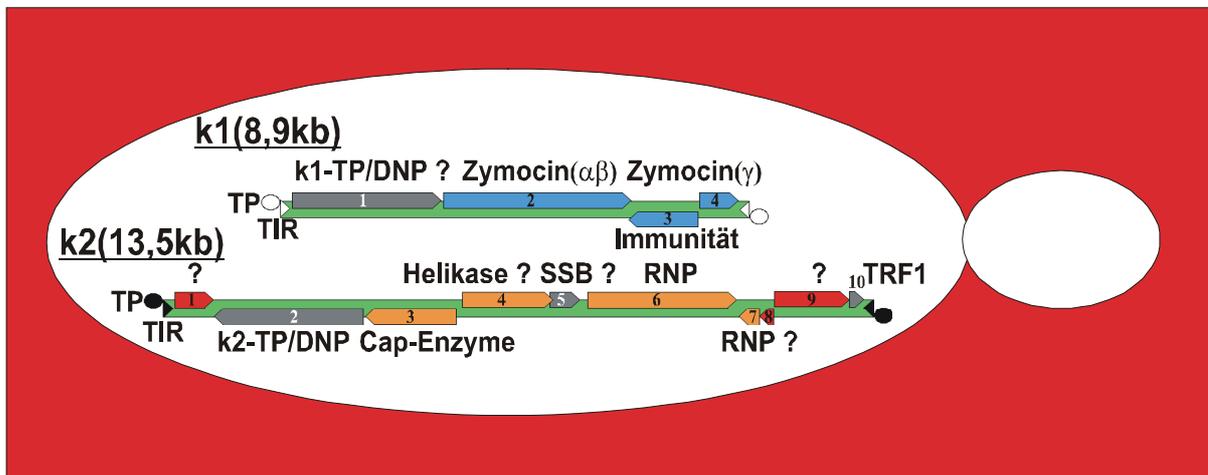
*P. inositovora* in seiner Funktion ähnlich zum *K. lactis* Zymocin und benötigt den RNA pol-II Elongator-Komplex für die Sensitivität (Klassen et al. 2003).

Der *P. acaciae* und *W. robertsiae* Toxinvermittelte Zellzyklus-Arrest unterscheidet sich ebenfalls vom G1 Arrest des *K. lactis*  $\gamma$ -Toxins. FACS-Analysen haben gezeigt, daß *P. acaciae* und *W. robertsiae* Toxin behandelte Zellen in der frühen S-Phase arretieren (Klassen et al. 2004). Interessant ist auch, daß von den bisher isolierten *kti*-Mutanten, die Resistenz gegen das *K. lactis*  $\gamma$ -Toxin vermitteln, verleiht nur die *kti1* $\Delta$  Mutante auch Resistenz gegen die *P. acaciae* und *W. robertsiae* Toxine (McCracken et al. 1994). Das deutet darauf hin, daß die *K. lactis*, *P. acaciae* und *W. robertsiae* Toxine eine mögliche überlappende Funktion besitzen in der das *KT11* Genprodukt für die Sensitivität benötigt wird.

### 1.3 Genomorganisation der *K. lactis* Killerplasmide

Die beiden Killerplasmide k1 = pGKL1 (8876 bp) und k2 = pGKL2 (13457 bp) von *K. lactis* besitzen als charakteristische Strukturkomponenten 5' kovalent gebundene TPs unterschiedlicher Größe von 28kDa (k1) und 36 kDa (k2) sowie TIRs unterschiedlicher Länge von 202 bp (k1) und 184 bp (k2) (Stam et al. 1986). Auf dem k1 Plasmid konnten vier offene Leserahmen (ORF = Open Reading Frame) identifiziert werden, wobei der ORF2 die  $\alpha$ -,  $\beta$ -Untereinheit und ORF4 die  $\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren Holo-Zymocins kodieren. Der ORF3 ist verantwortlich für die Toxin-Immunität, der der Zelle Immunität gegenüber dem eigenen Killertoxin verleiht (Stark et al. 1990 & Schaffrath et al.1999) und ORF1 kodiert eine k1 abhängige DNA-Polymerase (DNP) (Stark & Boyd 1986; Fukuhara 1987; Tokunga et al. 1987). Das k2 Plasmid kodiert insgesamt elf Gene. Der ORF2 besitzt eine Doppelfunktion, der die k2 Plasmid spezifische DNP und die k2 Plasmid ständige TPs spezifiziert (Takeda et al. 1996). ORF3 kodiert ein „Capping Enzym“, ORF4 eine DNA-Helikase, ORF6 eine k1/k2 Plasmid spezifische RNA-Polymerase (= RNP) und ORF7 eine RNP-Untereinheit (Wilson & Meacock 1988; Stark et al. 1990; Schaffrath et al. 1995a & 1997b; Larsen et al. 1998). Für die Plasmidintegrität der beiden Plasmide k1 und k2 ist der ORF5 essentiell und das Protein von ORF5 bindet *in vitro* ssDNA, was auf eine Funktion bei der DNA Synthese hindeutet (Schaffrath & Meacock 2001). Der „Terminal Recognition Factor“ der als Replikationsfaktor spezifisch an die k1/k2-TIRs bindet, wird von dem ORF10 kodiert (McNeel & Tamanoi 1991; Tommassino 1991). Der ORF1 ist für die Plasmidreplikation und

Expression des Killerphänotyps entbehrlich (Schaffrath et al. 1992). Die Funktionen von ORF8, ORF9 und ORF11 sind unbekannt (Larsen & Meinhardt 2000; Schaffrath 2002). Für den Killerphänotyp sind jedoch beide Plasmide notwendig.



**Abb. 1:** Die genetische Organisation der linearen Plasmide pGKL1 (= k1) und pGKL2 (= k2) von *K. lactis* (nach Schaffrath et al. 1999). Die offenen Leserahmen sind durch Blockpfeile dargestellt, die Leserichtung wird durch die Orientierung der Pfeile symbolisiert. Die Genfunktionen verwandter Prozesse sind farblich identisch unterlegt: grau = Transkription; orange = mRNA Modifikation; rot = putative Genfunktionen. Die schwarzen Pfeile stellen die terminalen invertierten Sequenz Wiederholungen dar (= TIRs), die schwarzen Kreise die terminalen Proteine (= TP). Weitere Abkürzungen: DNP (= DNA-Polymerase), RNP (= RNA-Polymerase), SSB (= Einzelstrang bindendes Protein), TRF (DNA-Bindeprotein), Cap-Enzym (= 5'-pppGm7pp-Kappe Guanyl-Transferase), UE (= Untereinheit), ? (= unbekannte Funktion).

#### 1.4 Replikation der *K. lactis* Killerplasmide k1 und k2

Die *K. lactis* Killerplasmide k1 und k2 erfüllen als autonome Plasmide alle Bedingungen, sie haben eine autonome Replikation, sind mitotisch stabil, haben eine hohe Kopienzahl und besitzen ein breites Wirtsspektrum. Da die Killerplasmide k1 und k2 in der Wirtszelle extranuklear vorkommen, besitzen sie ein kernunabhängiges Replikations- und Transkriptionssystem. Wegen ihrer Verwandtschaft zu dem viralen Genom des *B. subtilis* Phagen  $\Phi 29$  und gestützt durch biochemische Ergebnisse, wird eine analoge k2-kodierte Modell der DNA Replikation zu dem Phagen  $\Phi 29$  diskutiert (Schaffrath & Meinhardt 1998). Dabei wird durch ein Ori (= Origin of Replication) erkennendes dsDNA Bindeprotein im TIR Bereich die Plasmid DNA lokal entwunden. Das k2 TRF1 Protein ist an der Ori Erkennung beteiligt und bindet an die TIRs der Plasmide k1 und k2 (McNeel & Tamanoi 1991; Tommassino 1991). Durch die Interaktion zwischen den TPs und der k1-abhängigen DNP an der DNA, bildet sich ein Initiations Komplex aus (Maijer et al. 2001). Als Primer dient der DNP ein am TP kovalent gebundenes Nukleotid mit

freien 3'-OH Ende (Salas et al. 1995). Die anschließende Elongation der DNA-Synthese verläuft in 5'-3' Richtung. Der verdrängte Elternstrang wird durch Einzelstrang-DNA-Bindeproteine (SSB) stabilisiert (Salas et al. 1995). Da nachgewiesen ist, daß das Orf5 Protein *in vitro* ssDNA bindet, nimmt man an, daß es als SSB die replikativen Intermediate stabilisiert (Fujimura et al. 1988; Schaffrath & Meacock 2001; Schaffrath 2002). Die k1 ORF1 und k2 ORF2 DNA-Polymerasen sind essentiell für die Plasmidreplikation ihrer eigenen Plasmide, sie sind nicht gegeneinander austauschbar (Kitada & Gunge 1988). Für die stabile Replikation von k2 ORF2 wird ein intaktes k2 Orf2 Protein benötigt (Schaffrath et al. 1995b).

### 1.5 Genexpression der *K. lactis* Killerplasmide k1 und k2

Dadurch, daß die Killerplasmide k1 und k2 extranuklear im Zytoplasma vorliegen, benötigen sie ein vom Zellkern unabhängiges Transkriptionssystem. Die zentrale Komponente dieses autonomen und kernunabhängigen Transkriptionssystems ist die k2-kodierte RNA-Polymerase (ORF6/7). Sie trägt die DNA- $\beta$ -Bindedomäne und die RNA- $\beta$ '-Polymerisationsdomäne auf einer Polypeptidkette (Wilson & Meacock 1988; Schaffrath et al. 1995a). Da der k2 ORF7 eine RNA-Polymerase-C-Aktivitäts Domäne (rpoC) besitzt, die dem ORF6p-Produkt fehlt und k2 ORF4 eine DNA-Helikase ist, sind beide ORFs wahrscheinlich ebenfalls an der Transkription der Plasmidgene beteiligt (Stark et al. 1990; Schaffrath et al. 1995a & 1997b). Es gibt Hinweise, daß der „Capping Enzyme“ kodierende k2 ORF3 eine Guanylyl-Transferasefunktion besitzt und die mRNA mit einer 5'-pppGm7pp-Kappe versieht (Larsen et al. 1998; Tiggemann et al. 2001). Bisher ist noch nicht bekannt, ob die mRNA auch polyadenyliert wird. Durch Einzeldelation der Plasmid Gene konnte nachgewiesen werden, daß k2 ORF3/4 und k2 ORF6/7 essentiell für die Killerplasmide sind (Schaffrath et al. 1995a;1995b; 1997b; Larsen et al. 1998). Alle Gene der Plasmide k1 und k2 werden monocistronisch transkribiert. Im Gegensatz zu den UAS (Upstream Activating Sequence) kernkodierter Hefegene besitzen alle k1 und k2 Plasmid Gene 5' stromaufwärts UCS-Elemente (Upstream Conserved Sequences) (Stark et al. 1984; 1990; Romanos & Boyd 1988; Wilson & Meacock 1988). Es ist auffallend, daß auch in anderen linearen Hefepiasmiden alle Gene 5' stromaufwärts UCS-Elemente besitzen. Ebenso auffällig und interessant ist es, daß manche der anderen linearen Hefepiasmide in ihrer Genomorganisation fast identisch mit dem k2 Plasmid von *K. lactis* sind (*Saccharomyces kluyveri*: Hishinuma

& Hirai 1991; *Pichia acaciae*: Bolen et al. 1994; *Debaryomyces hansenseii*: Fukuda et al. 1997; *Pichia etchellsii*: Klassen et al. 2001 & 2002).

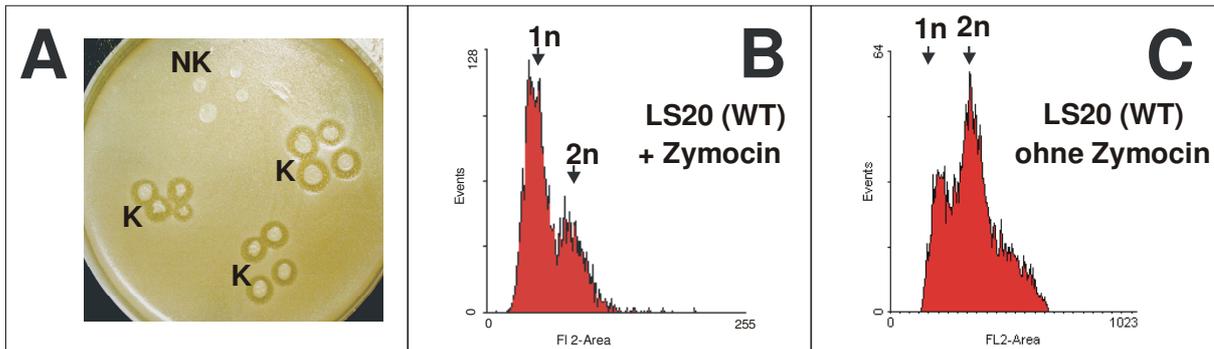
### 1.6 Das k1 Killerplasmid kodierte Zymocin

Die Holoform des *K. lactis* Zymocin ist ein Heterotrimer, das aus den Untereinheiten  $\alpha$  ( $M_r=99$  kDa),  $\beta$  ( $M_r=30$  kDa) und  $\gamma$  ( $M_r=27,5$  kDa) besteht. In dieser heterotrimeren Holoform wird das Zymocin von der *K. lactis* Hefezelle sekretiert. Das fertig prozessierte und sekretierte Zymocin liegt  $\alpha$ -N-glycosyliert vor. Die strukturelle Integrität des Heterotrimers wird durch  $\alpha$ -intramolekulare und  $\beta/\gamma$ -intermolekulare Disulfidbrücken erreicht (Stark & Boyd 1986). Während der Toxinbiogenese wird das von dem k1 ORF2 kodierte Vorläuferprotein der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit durch eine N-terminale Signalsequenz in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) kotranslational importiert. Im ER-Lumen wird das Vorläuferprotein durch eine proteolytische Spaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase prozessiert. Im Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit erfolgt eine Glykolisierung des Vorläuferproteins. Die Reifung des Vorläuferproteins zu den beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxinuntereinheiten erfolgt nach weiterer proteolytischer Modifizierung durch die Protease Kex1p (Stark & Boyd 1986) im Golgi-Apparat. Die  $\gamma$ -Untereinheit wird ebenfalls durch ihre Signalsequenz in das ER-Lumen transportiert und wahrscheinlich direkt durch die Signalpeptidase zur nativen Form prozessiert (Stark & Boyd 1986; Stark et al. 1990). Von den Zymocin-Untereinheiten wird nur die  $\alpha$ -Untereinheit glykosyliert. Obwohl die  $\gamma$ -Untereinheit ein eigenes Sekretionssignal besitzt, wird sie *in vivo* nur zusammen mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit in das Außenmedium sezerniert. Für die erfolgreiche Sezernierung *in vivo*, muß die  $\alpha$ -Untereinheit glykolisiert sein (Stark et al.1990).

### 1.7 Der Zymocin vermittelte Zellzyklusarrest

Das *K. lactis* Zymotoxin bewirkt bei sensitiven Hefen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase spezifisch vor dem START-Kontrollpunkt des Zellteilungszyklus. Dabei arretieren die Zymocin sensitiven Hefen nicht-sprossend präSTART und sind noch transient metabolisch aktiv und erfahren eine Zellvolumenzunahme von  $> 30\%$  (Butler et al.1991a). Dies wird aus FACS-Analysen ersichtlich (Abb. 2), da die arretierten Hefezellen einen präreplikativen ( $1n$ ) DNA Gehalt besitzen und nicht mehr zur G1-S Transition fähig sind (Schaffrath & Breunig 2000). Ist der Zellzykluskontrollpunkt START einmal durchlaufen, sind chemisch synchronisierte

Hefezellen nach Behandlung mit Zymocin weiterhin mitogen und arretieren erst nach Komplettierung der M-Phase im neuen Zellzyklus ohne Zellsprossung G1-spezifisch (Butler et al. 1991a). Die Zymocin arretierten Zellen können phänotypisch auch nicht durch die Überexpression des dominanten G1 Cyklins, *CLN3-1* aus der Arretierung geführt werden, sondern verbleiben weiterhin in der G1 Phase des Zellzyklus (Butler et al. 1994; Stark & Schaffrath unveröffentlicht; Schaffrath 2002).



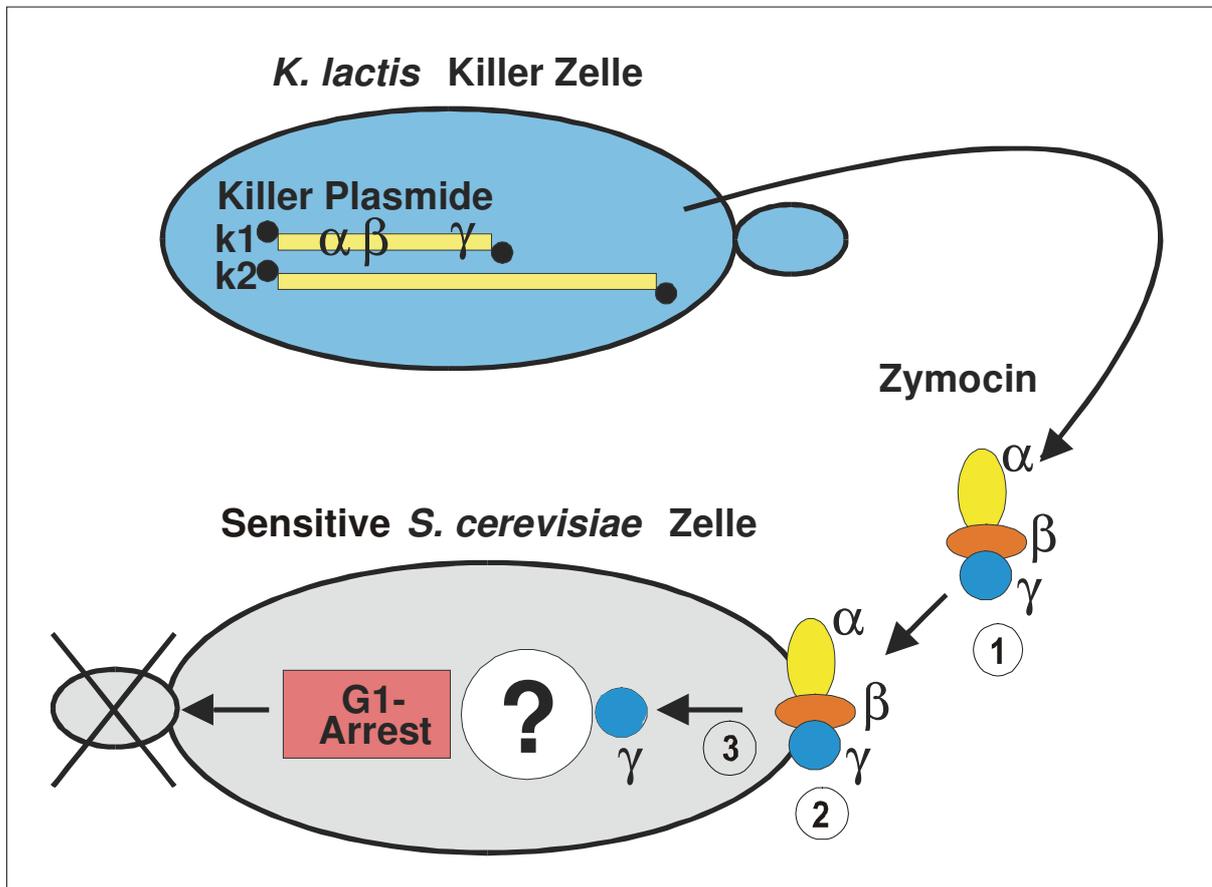
**Abb. 2:** Das Killersystem von *K. lactis*. **(A)** Killerplasmid (= K) tragende und Nicht-Killerplasmid (= NK) tragende *K. lactis* Stämme wurden gegen *S. cerevisiae* inkubiert. Die Hemmhöfe machen die Wachstumsinhibition sichtbar. **(B)** FACS-Analyse. Zymocin behandelte *S. cerevisiae* Zellen akkumulieren in der G1-Phase des Zellzyklus mit 1n DNA-Gehalt. **(C)** FACS-Analyse von unbehandelten *S. cerevisiae* Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (Schaffrath & Breunig 2000).

Die zytostatische Wirkung des heterotrimeren Zymocins ist aber allein auf die  $\gamma$ -Untereinheit beschränkt, dem sogenannten  $\gamma$ -Toxin. Dies ergab konditionale  $\gamma$ -Toxin Expressionen unter Kontrolle von *GAL*- und *MET*-Promotoren. Diese intrazelluläre Expression des  $\gamma$ -Toxins führte zu einem Galaktose- bzw. Methionin-abhängigen G1 Arrest. Die toxische Wirkung des intrazellulär exprimierten  $\gamma$ -Toxins ist reversibel im Gegensatz zu der Wirkung der Exoform des Holozymocins (Tokunaga et al. 1989; Butler et al. 1991b). Dagegen ist eine extrazelluläre Wirkung des rekombinanten  $\gamma$ -Toxins an sensiblen Hefezellen nicht möglich (Tokunaga et al. 1989). Diese Ergebnisse legen nahe, daß für die Wirkungsentfaltung des Killertoxins die native Exoform des Holozymocins mit der Zelloberfläche interagieren muß, um erstens die Toxin-Bindung an die Zellwand und zweitens die  $\gamma$ -Toxin-Aufnahme zu ermöglichen (Schaffrath 2002).

### 1.8 Zymocin-Bindung und $\gamma$ -Toxintranslokation in die Zielzelle

Vergleiche der Aminosäuresequenz mit der  $\alpha$ -Untereinheit zeigen Homologien zu Exochitinasen sowie zu den Kohlenhydrat-Bindedomänen von pflanzlichen und bakteriellen Chitinasen. Experimentell wird dieser Befund durch eine *in vitro* Exochitinase-Funktion des Holo-Zymocins bestätigt (Butler et al. 1991c). Diese Chitinase Funktion der  $\alpha$ -Untereinheit lässt sich auch durch Allosamidin, ein Chitinaseinhibitor, unterbinden, was in einen Verlust der Aktivität des Killertoxins resultiert (Butler et al. 1991c). Des Weiteren ist sie auch homolog zu einem Chitin-Bindeprotein der Hefe *Pichia etchellsii*, das ebenfalls von einem k1-ähnlichen Plasmid kodiert wird (Klassen et al. 2002). Diese Befunde sprechen dafür, daß die  $\alpha$ -Untereinheit an Chitin bindet, das Bestandteil der Hefezellwand ist und somit eine wichtige Funktion bei der Bindung des Holo-Zymocins an die Hefezelle übernimmt. Chitindefiziente Hefemutanten sind gegenüber dem exogenen Holo-Zymocin vollständig resistent, was ein weiterer Beleg dafür ist, daß Chitin als Zellwandrezeptor für das Holo-Zymocin fungieren mag (Takita & Castilho-Valavicius 1993). Daß Chitin eine wichtige Komponente für das Holoenzym darstellt, konnte auch durch Zugabe von exogenem Chitin in das Wachstumsmedium gezeigt werden. Demnach wirkt sich dieses exogene Chitin drastisch auf die Holo-Zymocin Wirkung aus. Wahrscheinlich konkurriert das zugegebene exogene Chitin mit dem Chitin der Zellwand um die Bindung des Holo-Zymocin, so daß bei genügend hoher Konzentration das Holo-Zymocin abgefangen wird und sich gegenüber sensiblen Hefezellen wirkungslos verhält (Jablonowski et al. 2001a). Disruptionen der für die Chitinbiosynthese verantwortlichen sieben Strukturgene *CHS1-7* von *S. cerevisiae* ergaben, daß *chs3 $\Delta$*  und *chs7 $\Delta$*  Mutanten resistent gegenüber dem Exotoxin sind. *chs4 $\Delta$*  mutierte Hefezellen sind vermindert sensitiv gegenüber dem Exotoxin. Jedoch sind die *chs3 $\Delta$*  und *chs7 $\Delta$*  Zellen weiterhin sensitiv gegenüber endogen exprimiertes  $\gamma$ -Toxin. Dies zeigt, daß der vollständige Verlust der Chitin-Synthase-III (*chs3 $\Delta$* ), der intrazelluläre Transportverlust der Chitin-Synthase-III (*chs7 $\Delta$* ) oder verminderte Aktivität der Chitin-Synthase-III (*chs4 $\Delta$* ) schützt gegen Holo-Zymocin bietet (Abb. 3). Im Gegensatz dazu, haben *chs1 $\Delta$*  und *chs2 $\Delta$*  Mutanten keinen Einfluß auf Zymocin Sensitivität. Diese Befunde zeigen, daß *CHS3* polymerisiertes Chitin als Rezeptormolekül beim andocken des Holo-Zymocins in Frage kommt (Jablonowski et al. 2001a). Daß Chitin eine Rezeptorfunktion haben könnte, konnte durch eine

Chitin-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, mit deren Hilfe das Holo-Zymocin aufgereinigt und konzentriert werden konnte (Jablonowski et al. 2001a). Damit konnte eine *in vitro* Bindung des Holo-Zymocins an Chitin nachgewiesen werden.



**Abb. 3:** Das hypothetische Arbeitsmodell des dreistufigen Zymocin-Signalweges (verändert nach Schaffrath): **1.** Holo-Zymocin Bindung an die Zellwand der sensiblen *S. cerevisiae* Zelle. **2.** Der  $\gamma$ -Toxin Import in die Zelle. **3.** Die intrazelluläre Kommunikation des  $\gamma$ -Toxins mit dem unbekannten Target (?), das dann zum G1 Zellzyklusarrest führt.

Durch Analyse der Aminosäuresequenz konnten in der  $\beta$ -Untereinheit des Heterotrimers vier sehr starke hydrophobe Bereiche identifiziert werden, was auf eine Membran-Assoziierung der  $\beta$ -Untereinheit schließen lassen könnte (Stark et al. 1990). Die  $\beta$ -Untereinheit ist mittels einer kovalenten Disulfid Doppelbindung im Holoenzym mit der  $\gamma$ -Toxin Untereinheit verbunden  $\beta$ -S=S- $\gamma$ . Für eine Entkopplung des  $\gamma$ -Toxins von der  $\beta$ -Untereinheit muß die Disulfid Doppelbindung -S=S- zu einer einer Sulfhydryl-Form -SH<sub>2</sub> reduziert werden. Wie diese Reduzierung abläuft, ist bisher noch nicht bekannt. Jedoch konnte das *GRX3* Gen identifiziert werden, dessen Protein eine hohe Ähnlichkeit zu Thioredoxinen und Glutaredoxinen hat

(Grant 2001). Dieses Protein wirkt der Reduzierung der Disulfiddoppelbindung -S=S- entgegen. Das  $\gamma$ -Toxin kann dann nicht mehr vom Holo-Zymocin entkoppelt werden, so daß es zu keiner Konvertierung in ein translozierbare Form mehr kommt (Jablonowski et al. 2001c). Diese Tatsache wird dadurch gestützt, daß das Grx3p Protein dosisabhängig Resistenz gegenüber dem Exotoxin verleiht, jedoch nicht gegenüber dem Endotoxin (Jablonowski et al. 2001c). Der  $\gamma$ -Toxin-Import konnte an Zymocin behandelten Zellen mit Hilfe eines polyklonalen anti- $\gamma$ -Toxin-Antikörpers in Zellfraktionierungs Experimenten durch Dichtegradienten Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Dabei erscheint das  $\gamma$ -Toxin als intrazelluläre Proteinbande (Jablonowski & Schaffrath, persönliche Mitteilung; Schaffrath 2002). Über den Mechanismus der  $\gamma$ -Toxin-Aufnahme gibt es bisher noch kaum Befunde. Jedoch konnte festgestellt werden, daß zur Membranpassage und Translokation des  $\gamma$ -Toxins in das Zytosol der Hefezelle weder rezeptorvermittelte Endozytose noch Flüssigphase-Endozytose benötigt werden (Jablonowski et al. 2001a).

### 1.9 Immunität & Resistenz gegen das *K. lactis* Zymocin

Die k1 und k2 Killerplasmid tragenden *K. lactis* Stämme sind gegen ihr eigenes Toxin immun. Obwohl der genaue Resistenz-Mechanismus der Immunität bisher noch nicht bekannt ist, konnte gezeigt werden, daß sie mit den k1 ORF3 assoziiert ist. Hefestämme ohne das Killerplasmid k1 sind nicht mehr immun (Niwa et al. 1981). Wird jedoch der ORF3 auf einen Vektor in die pGKL1-freie Zelle wieder zurückgebracht, wird die Immunität teilweise wieder hergestellt (Tokunaga et al. 1987). Es wird vermutet, daß das ORF3 kodierte Genprodukt direkt mit der  $\gamma$ -Untereinheit oder mit dem intrazellulärem Zielprotein der  $\gamma$ -Untereinheit interagiert und auf diese Weise die Immunität verursacht (Tokunaga et al. 1989; Stark et al. 1990).

Das hypothetische Arbeitsmodell geht nach bisherigen Erkenntnissen von einem komplexen dreistufigen Zymocin-Signalweg aus: (1.) die Holo-Zymocin Bindung an die Zellwandoberfläche, (2.) der  $\gamma$ -Toxin Import in die Hefezelle und (3.) die intrazelluläre Kommunikation des  $\gamma$ -Toxins mit dem potentiellen Target (Abb. 3). Es erscheint daher als logisch, daß der Verlust der Hefegene, die an dem Zymocin-Signalweg eingebunden sind, zur Resistenz der Hefezelle gegenüber dem Holo-Zymocin führt. Durch mehrere experimentell unterschiedliche Versuchsansätze konnte eine Reihe von Zymocin resistenten Mutanten (*skt* = sensitive to K. *lactis*

toxin; *kti* = killer toxin insensitive; *iki* = insensitive to killer toxin) gefunden und vorläufig charakterisiert werden (Kawamoto et al. 1990; Kawamoto et al. 1993; Takita & Castilho-Valavicius 1993; Butler et al. 1994; Kishida et al. 1996; Yajima et al. 1997; Schaffrath et al. 1997b). Die Mutationen, die zur Resistenz gegen das Zymocin führen, können in zwei Klassen eingeteilt werden (Tab. 1 & Tab. 8). In der Klasse-I werden die Mutationen zusammengefaßt, welche Zymocin-Bindung und Toxinaufnahme in die Hefezelle nicht mehr erlauben und dadurch gegenüber dem Holo-Zymocin schützen. Das bedeutet, daß diese Mutanten nur gegen das Holo-Zymocin (= Exotoxin) resistent sind. Gegenüber der intrazellulären Expression der  $\gamma$ -Untereinheit (= Endotoxin) sind diese Mutanten weiterhin sensitiv. Die zu den Zymocin-resistenten Klasse-I gehörenden Genen *skt5 $\Delta$* , *chs3 $\Delta$* , *ipt1 $\Delta$*  und *kti10 $\Delta$*  sind vermutlich alle in die Toxinaufnahme involviert (Tab. 1). Mutationen und Deletionen in diesen Genen führt daher zur einer Zymocin Resistenz, weil das Zymocin nicht mehr in die Zelle *S. cerevisiae* eintransportiert werden kann (Takita & Castilho-Valavicius 1993; Butler et al. 1994; Bulawa 1992; Kawamoto et al. 1993; Jablonowski et al. 2001a).

**Tab. 1:** Die Klasse-I Gene deren Mutationen *S. cerevisiae* Resistenz nur gegen das Exotoxin von *K. lactis* vermitteln.

Mutante	ORF, Gen (Synonyme)	Funktion	Referenz
<i>skt5<math>\Delta</math></i>	YBL061c, <i>SKT5</i> ( <i>CHS4, CAL2, CSD4</i> )	Aktivator der Chitinsynthese III	Trilla et al. 1997; Kawamoto et al. 1993, Jablonowski et al. 2001
<i>kti2<math>\Delta</math></i>	YBR023c, <i>CHS3</i> ( <i>CAL1, CSD2, KTI2, DIT101, CAL5</i> )	Chitinsynthese III	Takita et al. 1993; Bulawa 1992, Jablonowski et al. 2001
<i>chs7<math>\Delta</math></i>	YHR142w, <i>CHS7</i>	Chitinsynthese III	Trilla et al. 1997, Jablonowski et al. 2001
<i>kti6<math>\Delta</math></i>	YDR072c, <i>IPT1</i> ( <i>SYR4, KTI6</i> )	Inositolphosphotransferase 1	Butler et al. 1994, persönliche Mitteilung von Schaffrath 2004
<i>kti10<math>\Delta</math></i>	YGL008C, <i>PMA1</i>	H(+)-ATPase, eine Plasma Membran H(+) Pumpe	Butler et al. 1994, Mehlgarten et al. 2004
<i>grx3<math>\Delta</math></i>	YDR098C, <i>GRX3</i>	Glutaredoxin	Grant 2001, Jablonowski et al. 2001c

In der Klasse-II werden die Mutationen zusammengefaßt, welche das intrazelluläre Zielprotein des  $\gamma$ -Toxins bzw. mit dessen Wirkung verknüpfte Proteine betreffen. Infolgedessen sollten die Stämme mit diesen Mutationen sowohl gegen das Holo-Zymocin (= Exotoxin) als auch gegen das intrazellulär exprimierte  $\gamma$ -Toxin (= Endotoxin) resistent sein. Insgesamt stellt die Klasse-II Gruppe die größte Anzahl an uncharakterisierten Genen. Insgesamt impliziert diese Vielzahl an Genen die

Existenz eines sehr komplexen Signalweges vom Medium über Zelloberflächenbindung des Holo-Zymocins und der Import des  $\gamma$ -Toxins bis hin zum Targetprozeß, das dann den G1 Zellzyklusarrest verursacht.

### 1.10 Zielstellung der Promotionsarbeit

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, inwieweit die Molekularbiologie der Killerplasmide der Milchhefe von *K. lactis* bisher untersucht wurde und das es eine Vielzahl von Mutanten Hefestämme gibt die resistent gegen das Zymocin sind. Die meisten der bisher noch unbekanntes Klasse-II Gene gehören wahrscheinlich zum postulierten intrazellulären Signalkette. Es ist daher davon auszugehen, daß das  $\gamma$ -Toxin in irgendeiner Weise auf diesen postulierten Signalweg der Klasse-II Gene wirkt. Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die große Anzahl der unbekanntes Klasse-II Genen mittels einer mTn3-Minitransposon mutagenisierten Genbank Suche zu identifizieren und zu charakterisieren und deren Funktion im Zellgeschehen zu analysieren. Aufgrund dieser Analyse soll nach Möglichkeit neue Erkenntnisse auf die Kontrolle der Zellproliferation und des Zellzyklus gewonnen werden. Es ist daher von großem Interesse die Wirkung des  $\gamma$ -Toxins auf die Zellproliferation und den G1 Zellzyklusarrest aufzuklären. Let's go!

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bezugsquellen

##### 2.1.1.1 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	ROTH, Karlsruhe
Adenin	ROTH, Karlsruhe
Agar-Agar	ROTH, Karlsruhe
Agarose ultra pure	GIBCO-BRL, Eggenstein
Albumin	ROCHE, Basel
Ammoniumperoxodisulfat	MERCK, Darmstadt
Ampicillin	SIGMA, München
Arginin	FLUKA, Buchs
Asparaginsäure	FLUKA, Buchs
6-Aza-Urazil	SIGMA, München
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	SERVA, Heidelberg
Blocking Reagent	ROCHE, Basel
Borsäure	MERCK, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
Caffein	SIGMA, München
Calcofluor White	SIGMA, München
Calciumchlorid	MERCK, Darmstadt
Chloroform	MERCK, Darmstadt
Citronensäure	MERCK, Darmstadt
Complete	ROCHE, Basel
CSPD	ROCHE, Basel
4',6-Diamidino-2-phenylindole	SIGMA, München
Diaminobenzidin	SERVA, Heidelberg
Desoxyribonukleosidtriphosphate	PHARMACIA, Freiburg
Dimethylformamid	MERCK, Darmstadt
Dimethylpimelimidat	SIGMA, München
Dimethylsulfoxid	SIGMA, München
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Dithiothreitol	ROTH, Karlsruhe
Ethanol	ROTH, Karlsruhe
Ethanolamin	SIGMA, München
Ethidiumbromid	SIGMA, München
Ethylendinitrilotetraessigsäure	MERCK, Darmstadt
Ficoll 400	PHARMACIA, Freiburg
Galaktose	ROTH, Karlsruhe
Glucose	ROTH, Karlsruhe
Glutaminsäure	REANAL, Budapest
Glycerin	MERCK, Darmstadt
Glycerophosphat	SIGMA, München
Glycin	ICN, Cleveland, USA
Harnstoff	MERCK, Darmstadt
Hefe Extrakt	DIFCO, Michigan USA
Hefe Nitrogen Basis	DIFCO, Michigan USA
N-2-Hydroxyethylpiperazin	MERCK, Darmstadt

Histidin	REANAL, Budapest
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid	ROTH, Karlsruhe
Isoleucin	FLUKA, Buchs
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Kaliumacetat	MERCK, Darmstadt
Leucin	REANAL, Budapest
Lithiumacetat	SIGMA, München
Lysin	ROTH, Karlsruhe
Magnesiumacetat	MERCK, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MERCK, Darmstadt
Maleinsäure	SIGMA, München
Mercaptoethanol	ROTH, Karlsruhe
Methanol	ROTH, Karlsruhe
Methionin	REANAL, Budapest
Milchpulver	ROTH, Karlsruhe
Mineralöl, leicht	SIGMA, München
Mycophenolsäure	SIGMA, München
Natriumacetat	MERCK, Darmstadt
Natriumazid	SIGMA, München
Natriumborat	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg
Natriumflorid	MERCK, Darmstadt
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
Natriumcitrat	MERCK, Darmstadt
Nickelchlorid	SIGMA, München
Nitroblue-Tetrazoliumsalz	SIGMA, München
N-Laurosylsarcosin, Natriumsalz	SIGMA, München
Peptone	DIFCO, Michigan USA
Phenol	ROTH, Karlsruhe
Phenylalanin	ROTH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	SIGMA, München
Polyethylenglycol 6000	SERVA, Heidelberg
Polylysin	SIGMA, München
Protein A-Sepharose	PHARMACIA, Freiburg
Salzsäure	MERCK, Darmstadt
Serin	REANAL, Budapest
Sorbit	ROTH, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin	SERVA, Heidelberg
Threonin	FLUKA, Buchs
Tris	ICN, Cleveland, USA
Triton® X-100	ROTH, Karlsruhe
Triton® X-20	ROTH, Karlsruhe
Trypton	GIBCO-BRL, Eggenstein
Tryptophan	ROTH, Karlsruhe
Tyrosin	REANAL, Budapest
Uracil	SERVA, Heidelberg
Valin	REANAL, Budapest
Wasserstoffperoxid	ROTH, Karlsruhe
X-Gal	ROTH, Karlsruhe

X-Phosphat  
Xylencyanol  
Yeast Extrakt

SIGMA, Deisenhofen  
SERVA, Heidelberg  
GIBCO-BRL, Eggenstein

### **2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Dauerkultur-Röhrchen  
Dialyseschläuche  
Einmal-Küvetten  
Einmal-Spritzen, steril  
Einmal-Skalpelle, steril  
Elektroporationsküvetten  
Faltenfilter  
Glasperlen  
Haushaltsfolie  
Injektionskanülen, steril  
Membranfilter (0,45µm)  
Nylon-Membran, positiv geladen  
Parafilm™  
Pasteurpipetten  
Petrischalen  
Pipettenspitzen  
PVDF-Membran  
Polypropylen-Röhrchen  
Polystyrol-Röhrchen  
Reaktionsgefäße  
Sterilfilter  
Whatmann 3MM-Papier  
Zellstoff

SEROLAB, Aidenbach  
MEDICELL, London  
BRAND, Wertheim/Main  
BECTON, Braunschweig  
BRAUN, Melsungen  
BIORAD, München  
SCHLEICHER, Dassel  
BRAUN AG, Melsungen  
MELITTA, Minden  
ROSE, Trier  
SCHLEICHER, Dassel  
ROCHE, Basel  
NATIONAL CAN(TM), USA  
KÄSTNER, Rottenburg  
GREINER, Frickenhausen  
ROTH, Karlsruhe  
MILLIPORE, Eschborn  
SARSTEDT, Ulm  
ROTH, Karlsruhe  
EPPENDORF, Hamburg  
SCHLEICHER, Dassel  
VETTER, Wiesloch  
HARTMANN, Heidenheim

### **2.1.1.3 Geräte**

Autoklav  
Brutschrank  
Sterilbank  
Digitalwaage  
Elektroporator  
Eppendorf-Tischzentrifugen  
Feinwaage  
Filmkassette  
Folienschweißgerät  
Geldokumentation  
Gel-Elektrophoreseapparatur  
Heizblock  
Glaswaren  
Inkubationsschüttler  
Kühlschrank  
Kühlzentrifuge (5810R)  
Kühlzentrifuge (Avanti30)  
Magnetrührer  
Mikroskop  
Mikrowellen-Herd  
Millipore Wasserfilter

VARIOKLAV, Oberschleißheim  
HERAEUS, Stuttgart  
HERAEUS, Stuttgart  
SARTORIUS, Göttingen  
BIORAD, München  
EPPENDORF, Hamburg  
SARTORIUS, Göttingen  
SIEMENS, Berlin  
RISCHE, Hamburg  
MWG, München  
PHARMACIA, Freiburg  
GEBR.LIEBISCH, Bielefeld  
SCHOTT, Mainz  
INFORS, Bottmingen  
LIEBHERR, Biberach  
EPPENDORF, Hamburg  
BECKMANN, München  
SCHÜTT, Göttingen  
ZEISS, Oberkochen  
TOSHIBA, Tokyo  
MILLIPORE, Eschborn

Mini Trans Blot Apperatur	BIORAD, München
Netzgerät	BIORAD, München
pH-Meter	SCHÜTT, Göttingen
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
Protein Minigel Apperatur	BIORAD, München
Quarzglas-Küvetten	HELLMA, Mühlheim
Rührplatte	JANKE/KUNKEL, Staufen
Schüttel-Wasserbad	SCHÜTT, Göttingen
Schüttelinkubator	INFORS, Bottmingen
Sequenzierer	PERKIN-ELMER, Warrington
Speed-Vac-Concentrator	EQUIP, Martinsried
Spektralphotometer	PHARMACIA, Freiburg
Sterilschrank	BINDER, Tuttlingen
Thermocycler	EPPENDORF, Hamburg
Tischzentrifuge	EPPENDORF, Hamburg
Trockenschrank	HERAEUS, Stuttgart
UV-Transiluminator	MWG, München
Vakuum-Geltrockner	BIO-RAD, München
Vibrax Schüttler	SCHÜTT, Göttingen
Vortex	BENDER/HOBEIN AG, Zürich
Wasserbad	JULABO, Seelbad

#### **2.1.1.4 Puffer**

10x TBE-Puffer:	Tris	1M
	Borsäure	0,83M
	EDTA	0,01M
5x Probenpuffer:	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol	0,25%
	Ficoll 400	15%
10x Ladepuffer:	Tris	54g
	Borsäure	27,5g
	EDTA 0,5M pH 8	20ml
	Glycerin	50%
	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol	0,25%
Na-P-Puffer:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5M
	NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5M
	pH = 7,2	
DIG P3-Puffer:	Tris/HCl	100mM
	NaCl	100mM
	MgCl <sub>2</sub>	50mM
	pH = 9,5 mit HCl	



## 2.1.3 Nukleinsäuren

### 2.1.3.1 Genbank:

*S. cerevisiae* mTn3-Minitransposon mTn3::*lacZ*::*LEU2* mutagenisierte Genbank (Ross-MacDonald et al. 1997 & 1998).

### 2.1.3.2 DNA-Marker

Lambda-DNA-EcoRI/HindIII  
 Lambda-DNA-HindIII  
 Gen Ruler DNA- Ladder Mix  
 Lachs-Spermien-DNA

MBI FERMENTAS, Vilnius  
 MBI FERMENTAS, Vilnius  
 MBI FERMENTAS, Vilnius  
 SIGMA, München

### 2.1.3.3 Vektoren & Plasmide

**Tabelle 2:** In dieser Studie verwendete Plasmide.

Plasmid	kb	Beschreibung	Referenz/Quelle
pCR-2.1-TOPO	3,9	Amp <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> f1ori <i>plac lacZα</i> pMB1ori	Invitrogen
YCplac22	4,85	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 TRP1</i> , pMB1ori	Gietz & Sugino 1988
YCplac33	5,6	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 URA3</i> , pMB1ori	Gietz & Sugino 1988
YCplac111	6,11	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 LEU2</i> , pMB1ori	Gietz & Sugino 1988
YEplac181	5,74	Amp <sup>R</sup> <i>2μ LEU2</i> , pMB1ori	Gietz & Sugino 1988
YEplac195	5,24	Amp <sup>R</sup> <i>2μ URA3</i> , pMB1ori	Gietz & Sugino 1988
pRSQ	5	Amp <sup>R</sup> <i>lacZα URA3</i> , pMB1ori	ATCC #U34887
pHMS14	6,6	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 HIS3 UAS<sub>GAL1</sub>-Y-Toxin(k1ORF4)</i> , pMB1ori	Schaffrath 1997b
pHMS22	5,9	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 HIS3 UAS<sub>GAL1</sub></i> pMB1ori	Schaffrath 1997b
pHAL1	5,5	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4/URA3/UAS<sub>MET25</sub></i> pMB1ori	Schaffrath 1997b
pHAL9	6,2	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4/URA3/UAS<sub>MET25</sub>-Y-Toxin(k1ORF4)</i>	Schaffrath 1997b
pJHW27		YEplac181 Derivat plus Hind/EcoRI <i>KT112 Wildtyp ORF</i>	Butler et al 1994
YDpW	3,5	Amp <sup>R</sup> , pUC9Ω Derivat, <i>TRP1</i> , pMB1ori	Berben et al. 1991
YDpKI-Leu	5,1	Amp <sup>R</sup> pUC9Ω Derivat, <i>K. Lactis LEU2</i>	Jablonowski 2000
YDpSp-His	4,1	Amp <sup>R</sup> pUC9Ω Derivat, <i>S. pombe HIS3</i>	Jablonowski 2000
YDpKI-Ura	3,9	Amp <sup>R</sup> pUC9Ω Derivat, <i>K. Lactis URA3</i>	Jablonowski 2000
pYM3	3,7	Amp <sup>R</sup> pFA6a-HIS5MX6 Derivat, <i>K. Lactis TRP1</i> , 6 HA Epitop	Knop et al. 1998
pYM5	4,1	Amp <sup>R</sup> pYM4 Derivat <i>HIS3MX6</i> , 3 Myc Epitop	Knop et al. 1998
pGCN5	7,2	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 URA3</i> , pMB1ori, <i>GCN5</i> Wilty ORF	Kleff et al 1995
pRS316	4,8	Amp <sup>R</sup> <i>ARS1 CEN4 URA3</i> , pMB1ori	Sikorski et al. 1989
pWt	6,4	pRS316 Derivat plus BamHI/KpnI <i>ELP3</i> Wildtyp-ORF	Wittschieben 2000
pY540A	6,4	pRS316 Derivat plus BamHI/Sall <i>ELP3</i> Y540A Mutation	Wittschieben 2000
pY541A	6,4	pRS316 Derivat plus BamHI/Sall <i>ELP3</i> Y541A Mutation	Wittschieben 2000
pFF1	6,7	pCR-2.1-TOPO Derivat plus blunt end PCR ORF <i>TOT2 cw</i>	Diese Studie
pFF2	6,7	pCR-2.1-TOPO Derivat plus blunt end PCR ORF <i>TOT2 ccw</i>	Diese Studie
pFF3	8,4	YCplac33 Derivat plus ORF <i>TOT2</i> BamHI/XhoI aus pFF1 in BamHI/Sall YCplac33	Diese Studie
pFF7	6,6	pCR-2.1-TOPO Derivat plus blunt end PCR ORF von <i>TOT3</i>	Diese Studie
pFF8	8,3	YCplac33 Derivat plus ORF <i>TOT3</i> HindIII/XhoI aus pFF7 in HindIII/Sall YCplac33	Diese Studie
pFF9	7,9	YEplac195 Derivat plus ORF <i>TOT3</i> HindIII/XhoI aus pFF7 in HindIII/Sall YEplac195	Diese Studie
pFF10	8,4	YEplac181 Derivat plus ORF <i>TOT2</i> BamHI/PstI aus pFF1 in PstI/BamHI YEplac181	Diese Studie
pFF11	8,9	pUC18 Derivat plus blunt end PCR ORF <i>TOT1</i>	Diese Studie

pFF12	10,6	TOT1 SacI/Sall aus pFF11 in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pFF13	10,7	YEplac181 Derivat plus ORF TOT1 SacI/Sall aus pFF11 in YEplac181 SacI/Sall	Diese Studie
pFF14	10,2	YEplac195 Derivat plus ORF TOT1 SacI/Sall aus pFF11 in YEplac195 SacI/Sall	Diese Studie
pFF15	5,78	pCR-2.1-TOPO Derivat plus blunt end PCR ORF von TOT7	Diese Studie
pFF16	5,16	pCR-2.1-TOPO Derivat plus blunt end PCR ORF von TOT6	Diese Studie
pFF17	6,9	YEplac181 Derivat plus ORF TOT7 HindIII/XhoI aus pFF15 in YEplac181 HindIII/Sall	Diese Studie
pFF18	7,5	YEplac181 Derivat plus ORF TOT6 HindIII/XhoI aus pFF16 in YEplac181 HindIII/Sall	Diese Studie
pFF19	7,8	YEplac181 Derivat plus ORF TOT5 KpnI/SacI aus pHMS56 in YEplac181 KpnI/SacI	Diese Studie
pDel1C1	9,8	YCplac33 Derivat plus ORF TOT1 C-Terminal deletiert-1 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pDel1C2	9,5	YCplac33 Derivat plus ORF TOT1 C-Terminal deletiert-2 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pDel1C3	9,2	YCplac33 Derivat plus ORF TOT1 C-Terminal deletiert-3 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pDel1C4	8,9	YCplac33 Derivat plus ORF TOT1 C-Terminal deletiert-4 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pTOT2Δ1	8,1	YCplac33 Derivat plus ORF TOT2 C-Terminal deletiert-1 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pTOT2Δ2	7,8	YCplac33 Derivat plus ORF TOT2 C-Terminal deletiert-2 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pTOT2Δ3	7,5	YCplac33 Derivat plus ORF TOT2 C-Terminal deletiert-3 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie
pTOT2Δ4	7,2	YCplac33 Derivat plus ORF TOT2 C-Terminal deletiert-4 SacI/Sall aus pCR-2.1-TOPO in YCplac33 SacI/Sall	Diese Studie

### 2.1.3.4 Oligonukleotide

Bei den in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide handelt es sich ausschließlich um PCR Primer.

### 2.1.3.5 Primer

**Tabelle 3** In dieser Studie verwendete Oligonukleotid-Primer.

Name	Beschreibung	Sequenz
<b>ABP-FW</b>	Anchor Bubble primer FW	5'GAAGGAGAGGGACGCTGTCTGTGCGAAGGTAAGGAACGGACGAGA GAAGGGAGAG 3'
<b>ABP-RV</b>	Anchor Bubble Primer RV	5'GACTCTCCCTTCTCGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTC CTCTCCTTC-3'
<b>M13 (-47)</b>	Vectorette-Primer FW	5'CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC- 3'
<b>UV</b>	Vectorette-Primer RV	5'CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCT- 3'
<b>2120</b>	URA3 ORF Primer FW	5'GGGTCCATAAAGCTTTTCAATTCATCT 3'
<b>2121</b>	URA3 ORF Primer RV	5'GGCCATGAAGCTTTTCTTTCCAA- 3'
<b>M13 FW</b>	Universal Primer FW	5'GTAAAACGACGGCCAGT-3'
<b>M13 RV</b>	Universal Primer RV	5'CAGGAAACAGCTATGAC-3'
<b>2190</b>	TOT1 ORF Primer-FW	5'CGAGCATCGCGAAACGCGATTTAAGACAAACAA 3'

<b>2191</b>	<i>TOT1</i> ORF Primer-RV	5'AGCCGATGCGGTCAAGGATTACGTTGGACGA 3'
<b>FF19</b>	<i>TOT2</i> ORF Primer FW	5' GGATCCATAATTTATAGCCTGGGTTCGGTCC- 3'
<b>FF20</b>	<i>TOT2</i> ORF Primer RV	5'GTCGACGCGGAATACTTACCTTTGCAGTGG- 3'
<b>FF21</b>	<i>TOT3</i> ORF Primer FW	5' CGATAAGACAGTGAGAGAAGG- 3'
<b>FF22</b>	<i>TOT3</i> ORF Primer RV	5' AACACATGCAGCAGTTACTCC- 3'
<b>FF23</b>	<i>TOT4</i> ORF Primer FW	5' TTCCTTTTCGCACACCCGATATGC- 3'
<b>FF24</b>	<i>TOT4</i> ORF Primer RV	5' GATACCCAGTTGAGAAGACGAGC- 3'
<b>2188</b>	<i>TOT5</i> ORF Primer FW	5' GGGTCTACCCATGCTTCAACTCTGGCACAGGGA- 3'
<b>2189</b>	<i>TOT5</i> ORF Primer RV	5' ACCTGGCCACTTGGAGTTCACGATGTTAATTCCA- 3'
<b>FF25</b>	<i>TOT6</i> ORF Primer FW	5' GCTGTTGGAAAATTCCTGCTG- 3'
<b>FF26</b>	<i>TOT6</i> ORF Primer RV	5' ATAAGAGCAAGACGGAGTAGG- 3'
<b>FF27</b>	<i>TOT7</i> ORF Primer FW	5' TGCACAAGCATTGCTGGGC- 3'
<b>FF28</b>	<i>TOT7</i> ORF Primer RV	5' AATTCTTCTGCAGCTCACGC- 3'
<b>FF29</b>	<i>DST1</i> ORF Primer FW	5' TGAGATACTTCACTAGCCAC- 3'
<b>FF30</b>	<i>DST1</i> ORF Primer RV	5' TTTCTTTTCTGGATTCCGGC- 3'
<b>FF1</b>	FW KO-Primer <i>TOT1</i>	5' AGAAACAGTACAAATGCCTAATGGCTTATGGTTGAACATGACAA GAGTGGCGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>FF2</b>	RV KO-Primer <i>TOT1</i>	5' CAATATGACTCTTAGGGAAATCATGAATCTCTGGAACAGGTATT TCTGGGAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>FF3</b>	FW KO-Primer <i>TOT2</i>	5' ATGGTGGAAATGTATCACTCCCGAAGCCATTTTATAGGTGCTAA CAAGCACGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>FF4</b>	RV KO-Primer <i>TOT2</i>	5' CCTCAATCTTGTAAATTTGTCTGCTGGTGTATATCCTCGTTTA GCTGCGAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>FF5</b>	FW KO-Primer <i>TOT3</i>	5' AGATGGCTCGTCATGGAAAAGGCCCAAAAATAACAAAAAAA GCTAGCACGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>FF6</b>	RV KO-Primer <i>TOT3</i>	5' CAGAAATAACAGAAATTTTCTCTGAACCATGCTCTTCTTGGCG ATTCTAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>LF13</b>	FW KO-Primer <i>TOT4</i>	5' AAATAAACAGGCAATTTAGTAAGAAGATGCCACTGGTGCTTTT TACGGGCGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>LF14</b>	RV KO-Primer <i>TOT4</i>	5' ATCTCAATTCAAGTTTTTGTAAAGATAATCAGCGAAAAGCGGAC CGATCCAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>FF7</b>	FW KO-Primer <i>TOT5</i>	5' CTATTGCTACAGGTAGAACAAGATATAATGGCCAGTTCGTCACA TAACCCCGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>FF8</b>	RV KO-Primer <i>TOT5</i>	5' AAAAGGATCCTCATATGGATCCTTTCATCATAATCGTCATCC TTTTCGAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>FF9</b>	FW KO-Primer <i>DST1</i>	5' GTAGTCAGTCCGCATAAGAGCATTTCATCATGGATAGTAAGGAAG TACTGGCGACGGCCAGTGAATTCCCGG 3'
<b>FF10</b>	RV KO-Primer <i>DST1</i>	5' TCTGTTACCACATGCTTCACATGTACAGAAAGTGGTCAATGGTT CATCCGAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG 3'
<b>FF11</b>	FW KO-Primer <i>TOT6</i>	5'ATACACATTTATGGGTAGTGTTCAACGACAAGATTTGGTCCTATTC AGCGCGACGGCCAGTGAATTCCCGG - 3'
<b>FF12</b>	RV KO-Primer <i>TOT6</i>	5'GACTCCTTCTCATTTCAGATATAGGTATTCAATTTCAACGACGTGTAG GCTAGCTTGGCTGCAGGTCGACGG- 3'
<b>FF13</b>	FW KO-Primer <i>TOT7</i>	5'ATGTCATTTTCGTAAGAGAGGTGAAATACTGAACGATAGAGGTAGCG GGCTCGACGGCCAGTGAATTCCCGG- 3

<b>FF14</b>	RV KO-Primer <i>TOT7</i>	5'GTCTTCTTTGCAGGTATATTATGTGAGATTTTCATCCGAGTGCGAGTGTGAAGCTTGGCTGCAGGTTCGACGG- 3'
<b>S3-TOT1</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT1</i>	5' TACCTGTTCCAGAGATTCATGATTTCCCTAAGAGTCATATTGTTGATTTTCGTACGCTGCAGGTTCGAC 3'
<b>S2-TOT1</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT1</i>	5' CTTTACGAGCACTATAGACAGTAATTTATATAACTAAGAAAATGGTATGCATCGATGAATTCGAGCTCG 3'
<b>S3-TOT2</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5' GTGTAGGAAGTAGTGATTTGTCCACCCGTATATACTCATTAGCATATGAACGTACGCTGCAGGTTCGAC 3'
<b>S2-TOT2</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5' ATTAACTTATTATCCTCTTTTCCACATGAGAAATGATATAGATATTGCATCGATGAATTCGAGCTCG 3'
<b>S3-TOT3</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT3</i>	5' ATGGTAACTAGGATATGAACTAGACGGTCCATACATGTTCGAAAAGAATTCGTACGCTGCAGGTTCGAC 3'
<b>S2-TOT3</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT3</i>	5' TGCTTGAAAACCGGCCATGTCCGGCGGCACATAAAAGTTCTATTACCTATCGATGAATTCGAGCTCG 3'
<b>S3-TOT4</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT4</i>	5' AGGATCGGTCCGCTTTTCGCTGATTATCTTAACAAAACTTGAATTCGTACGCTGCAGGTTCGAC 3'
<b>S2-TOT4</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT4</i>	5' ATTTTCGTCTTGCCATTTACCTTCTGATATTAATCACATGTATATCATCGATGAATTCGAGCTCG 3'
<b>S3-TOT5</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT5</i>	5' ACGAAAAGGATGACGATTATGATGAAGAGGATCCATATGAGGATCCCTTTCGTACGCTGCAGGTTCGAC 3'
<b>S2-TOT5</b>	one step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT5</i>	5' TAGTTTACATAATCTGGAAGCACTCACTATTTACCATCAGTTTC TACTTTATCGATGAATTCGAGCTCG 3'
<b>S2-TOT6</b>	One step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT6</i>	5'TGTTAAAAAGCATGCCGTATATTTCCATAAATTGAACCATATTCATCGATGAATTCGAGCTCG- 3'
<b>S3-TOT6</b>	One step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT6</i>	5'TCACATAATATACCTGCAAAGAAGACCAAGATATCTTTAGACTATCGTACGCTGCAGGTTCGAC- 3'
<b>S2-TOT7</b>	One step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT7</i>	5'AATAATACGAGAATCAATGTGCCTCGTATATAATCTTATCATTATATCGATGAATTCGAGCTCG- 3'
<b>S3-TOT7</b>	One step <i>in vivo</i> tagging <i>TOT7</i>	5'TACCTATATCTGAATGAGAAGGAGTCAACAAAATTTTTATCGCGTACGCTGCAGGTTCGAC- 3'
<b>S3-TOT2Δ1</b>	Teildeletion und <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5'CGTCCAGGGATAAACTGTCAAAGTATGGAGGCACCAAAGGAGCCAGCTCGTACGCTGCAGGTTCGAC-3'
<b>S3-TOT2Δ2</b>	Teildeletion und <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5'GTGTTTGTAGAGACAGAAAATGGGCGCTTTGGGAAAGAAATATGGAAGATCGTACGCTGCAGGTTCGAC-3'
<b>S3-TOT2Δ3</b>	Teildeletion und <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5'CAAATAATGTTTCAAGATGCAGTTATTAGAATATTCAGCACAGAAAATGGCGTACGCTGCAGGTTCGAC- 3'
<b>S3-TOT2Δ4</b>	Teildeletion und <i>in vivo</i> tagging <i>TOT2</i>	5'GTATTCAATTTGAGGAAAAAAGTGAAATGCCAGACTCTGCTACCGTTCCTCGTACGCTGCAGGTTCGAC- 3'

## 2.1.4 Kulturmedien & Kulturplatten

### 2.1.4.1 *E. coli* – Wachstumsmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

NaCl	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
Bacto-Trypton	10g/l
pH = 7,0	

LB-Agar-Platten: +15g Agar/Liter LB-Medium

TB-Medium (Terific-Broth):

Bacto Tryptone	2g/l
Bacto Yeast Extract	4g/l
Glycerol 100%	4ml/l

Für die Selektion Plasmid tragender Bakterien wurde 100µg/ml Ampicillin, gelöst in Tris-HCl (pH=7,9), nach dem Autoklavieren des LB-Mediums bzw. LB-Agar nach Abkühlen auf 60°C steril zugeben.

IPTG: 0,1M IPTG in H<sub>2</sub>O; sterilfiltriert  
 Für den Nachweis der Insert tragenden Plasmide wurden 10µg/ml Medium zugegeben.  
 1M IPTG davon 500µl auf ½ Liter LB-Medium

X-Gal: 0,5M X-Gal in Dimethylformamid  
 Für den Nachweis Insert tragender Plasmide wurden 80µg/ml Medium zugegeben  
 40 mg/ml Stock davon 500µl auf ½ Liter LB-Medium

### 2.1.4.2 Hefe-Wachstumsmedien: (Nach Sherman 1991)

YPD-Medium (Vollmedium):

2% Peptone	20g/l
1% Yeast Extract	10g/l
2% Glucose	20g/l

YPD-Platten (Vollmedium): +2% Agarose 20g/l

SD-Medium (Minimalmedium):

2% Glucose	20g/l
10x YNB	100ml/l
100x AS-Mix	10ml/l

SD-Platten (Minimalmedium): +2% Agarose 20g/l

(folgende Aminosäuren sind optional je nach Marker)

100x Leucin	10ml/l
100x Uracil	10ml/l
500x Histidin	5ml/l
500x Methionin	5ml/l

10x YNB-Medium: 6,7g YNB/100ml

100x AS-Mix:	L-Adenin sulphat	0,2g/100ml
	L-Arginin/Hcl	0,2g/100ml
	L-Aspartatsäure	1g/100ml
	L-Glutaminsäure	1g/100ml
	L-Histidin/HCl	1g/100ml
	L-Leucin	1g/100ml
	L-Isoleucin	0,3g/100ml
	L-Lysin/HCL	0,3g/100ml
	L-Methionin	1g/100ml
	L-Phenylalanin	0,5g/100ml
	L-Serin	4g/100ml
	L-Threonin	2g/100ml
	L-Tyrosin	0,3g/100ml
	L-Uracil	0,2g/100ml
	L-Valin	1,5g/100ml
	L-Tryptophan	0,2g/100ml

Der AS-Mix enthielt alle Aminosäuren bis auf die Marker-Aminosäuren, die für die Selektion der jeweiligen Hefe-Stämme benötigt wurden.

## 2.1.5 Mikroorganismen

### 2.1.5.1 Bakterienstämme

Für die Plasmidamplifikationen und für die Transformationen von Plasmid Ligationen wurden *Escherichia coli* Stämme als Wirtsbakterium verwendet. Der XL-1 Blue Stamm liefert eine sehr hohe DNA Qualität, die sich sehr gut zum Sequenzieren eignet.

**Tabelle 4:** Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan 1983
XL1Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup> lac<sup>q</sup>lacZΔM15 Tn10(tetr)]</i>	Bullock et al. 1987
TOP10F'	<i>F'[LacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen

## 2.1.5.2 Hefestämme

### 2.1.5.3 *Kluyveromyces lactis* Stämme

**Tabelle 5:** Verwendete *K. lactis* Stämme in dieser Studie.

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
NK40	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ade1</i> , <i>ade2</i> , <i>leu2</i> , [ <i>k1</i> <sup>0</sup> <i>k2</i> <sup>+</sup> ]	Gunge et al. 1981
AWJ137	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , [ <i>k1</i> <sup>+</sup> <i>k2</i> <sup>+</sup> ]	Kämper et al. 1991

### 2.1.5.4 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Hauptorganismus dieser Studie ist *S. cerevisiae* (Guthrie & Fink (eds.) 1991).

**Tabelle 6:** Verwendete *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
FY1679-08A	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>63</i> , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>GAL</i>	Euroscarf
FY1679-06A	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>63</i> , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>GAL</i>	Euroscarf
LL20	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>leu2-3</i> , -112, <i>his3-11</i> , -15, <i>GAL</i>	NCYC 1445
LS20	Wie LL20, aber <i>ura3</i>	Schaffrath 1997b
LF20	Wie LL20, aber <i>MAT<math>\alpha</math></i>	Frohloff 2001
LS20-1	Wie LS20 plus <i>pHAL1</i>	Diese Studie
LS20-2	Wie LS20 plus <i>pHAL9</i>	Diese Studie
LS20-3	Wie LS20 plus <i>pHMS22</i>	Diese Studie
LS20-4	Wie LS20 plus <i>pHMS22</i> , <i>YCplac111</i>	Diese Studie
LS20-5	Wie LS20 plus <i>pHMS22</i> , <i>YCplac111</i> , <i>YCplac33</i>	Diese Studie
LS20-6	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i>	Diese Studie
LS20-7	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>YCplac111</i>	Diese Studie
LS20-8	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>YEplac195</i>	Diese Studie
LS20-9	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>pFF9</i>	Diese Studie
LS20-10	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>pFF10</i>	Diese Studie
LS20-11	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>YCplac111</i> , <i>YCplac33</i>	Diese Studie
LS20-12	Wie LS20 plus <i>pHMS14</i> , <i>YCplac111</i> , <i>YEplac181</i>	Diese Studie
KO11	Wie LS20-6, aber <i>tot1::mTn3::lacZ::LEU2</i>	Diese Studie
KO19	Wie LS20-6, aber <i>tot2::mTn3::lacZ::LEU2</i>	Diese Studie
KO19-1	Wie LS20-6, aber <i>tot2::mTn3::lacZ::LEU2</i> , <i>pFF3</i>	Diese Studie
KO19-2	Wie LS20-6, aber <i>tot2::mTn3::lacZ::LEU2</i> , <i>YCplac33</i>	Diese Studie
KO218	Wie LS20-6, aber <i>tot3::mTn3::lacZ::LEU2</i>	Diese Studie
FFY1	Wie LS20-6, aber <i>tot1<math>\Delta</math>::KILEU2</i> ,	Diese Studie
FFY2	Wie LS20-6, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> ,	Diese Studie
FFY2-1	Wie LS20-6, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>pFF3</i>	Diese Studie
FFY2-2	Wie LS20-6, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>YCplac33</i>	Diese Studie
FFY3	Wie LS20-6, aber <i>tot3<math>\Delta</math>::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY3-1	Wie LS20-6, aber <i>tot3<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>YEplac195</i>	Diese Studie
FFY3-2	Wie LS20-6, aber <i>tot3<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>pFF8</i>	Diese Studie
FFY3-3	Wie LS20-6, aber <i>tot3<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>YCplac33</i>	Diese Studie
FFY3-4	Wie LS20-6, aber <i>tot3<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>pFF9</i>	Diese Studie
FFY4	Wie LS20-6, aber <i>tot4<math>\Delta</math>::KILEU2 GAL</i>	Diese Studie
FFY5	Wie LS20-6, aber <i>tot5<math>\Delta</math>::KILEU2 GAL</i>	Diese Studie
FFY6	Wie LS20-6, aber <i>dst1<math>\Delta</math>::KILEU2 GAL</i>	Diese Studie
FFY8	Wie LS20-6, aber <i>tot6<math>\Delta</math>::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY7	Wie LS20-6, aber <i>tot7<math>\Delta</math>::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY2/1d	Wie LS20, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>tot1<math>\Delta</math>::HIS3</i>	Diese Studie
FFY2/3d	Wie LS20, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>tot3<math>\Delta</math>::HIS3</i>	Diese Studie
FFY2/4d	Wie LS20, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>tot4<math>\Delta</math>::HIS3</i>	Diese Studie
FFY25d	Wie LS20, aber <i>tot2<math>\Delta</math>::KILEU2</i> , <i>tot5<math>\Delta</math>::HIS3</i>	Diese Studie

FFY2/dst-d	Wie LS20, aber <i>tot2Δ::KILEU2, dst1Δ::HIS3</i>	Diese Studie
FFYdst/ppr-d	Wie LS20, aber <i>dst1Δ/ppr2Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY2-4tHA	Wie LS20-6, aber <i>tot2Δ::KILEU2, TOT4-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2-4tMyc	Wie LS20-6, aber <i>tot2Δ::KILEU2, TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY08-1	Wie FY1679-08A, aber pHMS14	Diese Studie
FFY08-2	Wie FY1679-08A, aber pHMS14, YCplac22	Diese Studie
FFY08-3	Wie FY1679-08A, aber pHMS22	Diese Studie
FFY08-4	Wie FY1679-08A, aber pHMS22, YCplac22	Diese Studie
FFY08-5	Wie FY1679-08A, aber <i>tot2Δ::KITRP1</i> , pHMS14	Diese Studie
FFY08-5	Wie FY1679-08A, aber <i>tot2Δ::KITRP1</i> , pHMS14, pFF3	Diese Studie
FFY08-5	Wie FY1679-08A, aber <i>tot2Δ::KITRP1</i> , pHMS14, YCplac33	Diese Studie
FFY08-6	Wie FY1679-08A, aber <i>scs3Δ::KITRP1</i> , pHMS14	Diese Studie
FFY08-7	Wie FY1679-08A, aber <i>hos2Δ::KITRP1</i> , pHMS14	Diese Studie
FFY08-8	Wie FY1679-08A, aber <i>hda1Δ::KITRP1</i> , pHMS14	Diese Studie
FFY06-1	Wie FY1679-06A, aber pHMS14	Diese Studie
FFY06-2	Wie FY1679-06A, aber pHMS22	Diese Studie
FFY1t-a	Wie LS20, aber <i>TOT1-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY2t-a	Wie LS20, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY4t-a	Wie LS20, aber <i>TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY1t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT1-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY2t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY3t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY4t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY5t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT5-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY6t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT6-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY7t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY8t	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2/1dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT1-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2/3dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT3-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2/4-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT4-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2/5-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT5-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY3/1-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT1-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY3/2-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT2-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY3/4-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT4-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY3/5-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT5-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY4/5-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT5-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY4/6-dt	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5, TOT6-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2/1-dt-3d	Wie FFY2/1-dt, aber <i>tot3Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY2/3-dt-1d	Wie FFY2/3-dt, aber <i>tot1Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY2/4-dt-1d	Wie FFY2/4-dt, aber <i>tot1Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY2/4-dt-3d	Wie FFY2/4-dt, aber <i>tot3Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY2/5-dt-1d	Wie FFY2/5-dt, aber <i>tot1Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY2/5-dt-3d	Wie FFY2/5-dt, aber <i>tot3Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY2/5-dt-6d	Wie FFY2/5-dt, aber <i>tot6Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY2/5-dt-7d	Wie FFY2/5-dt, aber <i>tot7Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY3/1-dt-2d	Wie FFY3/1-dt, aber <i>tot2Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY3/1-dt-4d	Wie FFY3/1-dt, aber <i>tot4Δ::LEU2</i>	Diese Studie
FFY3/2-dt-4d	Wie FFY3/2-dt, aber <i>tot4Δ::LEU2</i>	Diese Studie
FFY3/4-dt-1d	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot1Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY3/4-dt-2d	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY3/4-dt-5d	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot5Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY3/5-dt-2d	Wie FFY3/5-dt, aber <i>tot2Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY3/5-dt-4d	Wie FFY3/5-dt, aber <i>tot4Δ::LEU2</i>	Diese Studie
FFY4/5-dt-1d	Wie FFY4/5-dt, aber <i>tot1Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY4/5-dt-2d	Wie FFY4/5-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2</i>	Diese Studie
FFY3/5-dt-6d	Wie FFY3/5-dt, aber <i>tot6Δ::KIURA3</i>	Diese Studie
FFY4/5-dt-6d	Wie FFY4/5-dt, aber <i>tot6Δ::KILEU2</i>	Diese Studie

FFY2t-D1	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2Δ1-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2t-D2	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2Δ2-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2t-D3	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2Δ3-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY2t-D4	Wie FY1679-08A, aber <i>TOT2Δ4-(HA)<sub>6</sub>::KITRP1</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-33	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus YCplac33</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-p2	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus pTOT2</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-2/1	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus pTOT2Δ1</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-2/2	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus pTOT2Δ2</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-2/3	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus pTOT2Δ3</i>	Diese Studie
FFY3/4-2-2/4	Wie FFY3/4-dt, aber <i>tot2Δ::KILEU2 plus pTOT2Δ4</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1a	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus Ycplac33</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1b	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus pTOT1</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1c	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus pDel1C1</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1d	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus pDel1C2</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1e	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus pDel1C3</i>	Diese Studie
FFY2/4dt-1f	Wie FFY2/4dt, aber <i>tot1Δ:: KILEU2 plus pDel1C4</i>	Diese Studie
FFY3/2t-2D1	Wie FFY2t-D1, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY3/2t-2D2	Wie FFY2t-D2, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY3/2t-2D3	Wie FFY2t-D3, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie
FFY3/2t-2D4	Wie FFY2t-D4, aber <i>TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>::SpHIS5</i>	Diese Studie

## 2.2.1 Methoden

Die grundlegende Durchführung der Methoden erfolgten verändert nach Berger & Kimmel (ed.) 1987; Glover (ed) 1987; Ausubel et al. 1989; Maniatis et al. 1989.

### 2.2.1.1 Wachstum der Bakterien

Das Wachstum der *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C in/auf LB-Medium oder Terific-Broth (TB). Die Nährmedien wurden nach Maniatis et al. (1989) hergestellt. Für die Selektion Ampicillin-Resistenz-Marker tragende Plasmide wurde dem Nährmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/100ml zugegeben. Um *E. coli* Zellen auf α-Komplementation zu testen, wurde dem Medium X-Gal und IPTG in einer Endkonzentration von je 40µg/ml zugegeben.

### 2.2.1.2 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen

700µl einer Übernachtskultur wurde mit 300µl sterilem Glycerin (30%v/v Endkonzentration) durch gutes Vortexen vermischt. Anschließend wurden die Röhrchen bei -70°C eingefroren.

### 2.2.1.3 Bakterien-Transformation durch Elektroporation

Eine *E. coli* Kultur wurde bei einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 0,6 geerntet und 2x mit 10% Glycerin ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 1ml 10% Glycerin ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Das konzentrierte Zellgemisch wurde anschließend zu je 40µl in vorgekühlte Eppis aliquotiert, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung im -70°C Tiefkühlschrank gelagert. Zu den aufgetauten 40µl Zell Aliquots wurde 5pg bis 0,5µg DNA zugegeben, in die Elektroporations-Küvette pipettiert und mit dem BIO-Rad Gene Pulser bei 2,5KV, 25µF, 200Ω elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde die Küvette mit 1ml LB-Medium gefüllt und die Zellen mit einer sterilen Pasteur-Pipette in ein steriles Eppi transferiert. Zur Erholung der Zellen wurden sie 30min. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, kurz abzentrifugiert und ausplattiert. Die Transformationsrate beträgt ca. 10<sup>9</sup> Transformanten/µg DNA.

#### 2.2.1.4 Wachstum der Hefezellen (*S. cerevisiae*)

Während der log-Phase teilen sich Wildtyphefen in flüssigem Vollmedium bei 30°C und guter Durchlüftung alle 90 min. In definierten Medien (SD) haben sie eine Verdopplungsrate von 2,5–3 Stunden. Jedoch wachsen auch verschiedene Stämme mit unterschiedlichen Raten, besonders solche, die eine Deletionsmutation im Genom tragen. Hefezellen wachsen am besten mit fermentierbaren C-Quellen wie Glucose, Fructose und weniger gut mit Galaktose, Raffinose, Glycerin, Pyruvat und Ethanol. Die Selektion von Hefestämmen auf bestimmte Aminosäure-Prototrophien erfolgte in definierten synthetischen Minimalmedien (SD) ohne die entsprechende/n Marker-Aminosäure/n. Die log-Phase wird in 3 Stadien eingeteilt. Sie ist eine Funktion der Zelldichte der Kultur.

Start-Phase:  $3 \times 10^6$  Zellen/ml ( $\sim OD_{600} = 0,1$ )

Frühe log-Phase:  $1 \times 10^7$  Zellen/ml ( $\sim OD_{600} = 0,3$  bis  $0,5$ ).

Mittlere log-Phase:  $3 \times 10^7$  Zellen/ml ( $OD_{600}=1$ ) bis  $1 \times 10^8$  Zellen/ml ( $OD_{600}=1,3$  bis  $1,5$ )

Frühe stationäre Phase:  $2 \times 10^8$  Zellen/ml = Zellkultur ist gesättigt und geht in die stationäre- oder in die  $G_0$ -Phase.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hefekulturen in der mittleren log-Phase mit einer  $OD_{600} = 1,5$  geerntet.

#### 2.2.1.5 Anlegen von Hefe-Dauerkulturen

Eine 5ml Übernachtkultur wurde gewaschen, 0,5ml steriles ddH<sub>2</sub>O und 0,4ml steriles 50%iges Glycerol zugegeben. Die Endkonzentration des Glycerols beträgt 20% v/v. Die Röhren wurden bei -70°C eingefroren.

#### 2.2.1.6 Hefe-Transformation durch Lithium-Acetat

Die Lithium-Acetat-Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Gietz et al. 1992 & 1998. Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß alkalische Kationen Hefezellen kompetent zur DNA-Aufnahme machen. Polyethylenglycol (PEG) und der Hitzeschock unterstützen zusätzlich die DNA-Aufnahme. Eine mittlere log-Phasekultur wurde in 10ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Hefezellen wurden dann in 5ml 0,1M Lithium-Acetat Puffer resuspendiert und 1h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren zentrifugieren wurden das Hefepellet in 5ml Lithium-Acetat-Glycerol Puffer (LAG) resuspendiert und zu 300µl aliquotiert. Zu den 300µl kompetenten Zellen wurde die zu transformierende DNA 0,1-10µg DNA in  $\leq 10\mu\text{l}$ , 700µl Polyethylenglycol 4000 zugeben und 1h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden 15 min. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann auf eine entsprechende SD-Platte ausplattiert.

Lithium-Acetat (LA):                      0,1M Lithium-Acetat pH=7,5  
pH-Wert mit verdünnter Essigsäure eingestellt.

Lithium-Acetat-Glycerol (LAG):    0,1M Lithium-Acetat  
18%(v/v) Glycerol

50% Polyethylenglykol 4000:        50%(w/v) Polyethylenglykol 4000 in ddH<sub>2</sub>O

### **2.2.1.7 Hefe-Transformation durch Elektroporation**

Die Elektroporation der Hefezellen erfolgte nach dem Protokoll von Meilhoc et al. 1990 und Becker & Guarente 1991. Eine mittlere log-Phasekultur wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in 5ml 0,1M Lithium Acetat resuspendiert und 45min. bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 1,25ml 1M DTT zugegeben und weitere 15min. bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen wurde die Hefesuspension dann auf ein Volumen von 0,25ml eiskalter 1M Sorbitol Lösung konzentriert. Die Zellen wurden dann zu 40µl Aliquots aufgeteilt. Zu den 40µl aliquotierten Zellen wurde die zu transformierende DNA, ≤ 100ng DNA in ≤ 5µl gegeben. Das DNA-Zellgemisch wurde dann in eine sterile eiskalte 0,2cm Elektroporations-Küvette transferiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem BIO-Rad Gene Pulser bei 1,5KV, 25µF, 200Ω elektroporiert. Danach wurde 1ml 1M Sorbitol in die Küvette gegeben und mit einer sterilen Pasteur-Pipette das Sorbitol-Zellgemisch in ein Eppi transferiert. Nach kurzem zentrifugieren und resuspendieren des Hefepellets wurden die Zellen auf SD Platten ausplattiert.

#### Transformationsraten:

Transformationsrate = Zahl der Transformanten/µg DNA

Plasmid DNA z.B. YCplac33: >10<sup>5</sup> Transf./µg DNA

Lineare DNA, die *in vivo* in das Hefegenom integrieren soll: ~10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> Transf./µg DNA.

### **2.2.2 Phänotypische Analysen**

#### **2.2.2.1 Killertoxin-Eklipse-Assay**

Wie von Kishida et al. 1996 beschrieben, wurden die *S. cerevisiae* Stämme gegen die Wirkung des exogenen Killertoxin getestet. Dazu wurde eine einzelne *S. cerevisiae* Kolonie in 100µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und davon 5µl auf eine YPD Platte aufgetropft. Anschließend wurde etwas Zellmaterial eines Killertoxin produzierenden *K. lactis* Stammes (AWJ137) und eines Nicht-Killer Stammes (NK40) an den Rand des *S. cerevisiae* Tropfens inokuliert. Die Platte wurde 24h bei 30°C inkubiert. Wachstum zeigt Resistenz, kein Wachstum zeigt Sensitivität an.

#### **2.2.2.2 Endotoxin-Assay**

Die zu testenden *S. cerevisiae* Stämme wurden mit dem Plasmid pHMS14 transformiert, welches das γ-Toxin Gen unter der Kontrolle des UAS-*Gal1* Promotors trägt. Durch Galaktose im Medium wird die Expression des γ-Toxin Gens induziert bzw. durch Glukose reprimiert. Für den Endotoxin-Test wurde eine einzelne *S. cerevisiae* Kolonien in 100µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5µl replika auf eine induzierende SD-Galaktoseplatte und eine reprimierende SD-Glukoseplatte aufgetropft. Die Platten wurden 1-2 Tage bei 30°C inkubiert.

#### **2.2.2.3 Weitere phänotypische Analysen**

Für weitere phänotypische Analysen der *tot*-Mutanten wurden folgende Zusätze in die YPD/SD-Platten gegeben (nach Hampsey 1997 & Wolf et al. 2002):

SD + 6-Aza-Urazil (6-AU):	25µg/ml; 50µg/ml; 100µg/ml
YPD + Caffein:	1mM; 5mM; 10mM; 20mM
YPD + Calcofluor White:	25µg/ml; 50µg/ml; 100µg/ml
YPD + Sorbitol:	1M
2x YPD + Zymocin	30% - 55% v/v zymocinhaltiges Kulturfiltrat

#### 2.2.2.4 $\beta$ -Galactosidase exprimierende Hefen = LacZ-Assay

Der LacZ-Assay wurde nach Durfee et al. 1993 & Staudinger et al. 1993 durchgeführt. Die Aktivierung des auf dem mTn3 befindlichen LacZ-Reporter-Gens wurde durch den LacZ-Assay überprüft. Dazu wurde eine Nitrozellulose-Membran luftblasenfrei auf die Oberfläche des gewünschten Selektivmediums gelegt. 5 $\mu$ l einer Hefesuspension wurde direkt auf die Nitrozellulose aufgetropft und in die Membran einziehen lassen. Die Filterplatte wurde auf 30°C inkubiert, bis eine Hefekolonie auf dem Filter gewachsen war. Die Nitrozellulosemembran wurde dann vorsichtig von der Platte abgehoben und in eine Petrischale mit flüssigen Stickstoff gelegt. Eine andere Petrischale wurde mit Whatmann Papier ausgelegt und mit 3-5ml Z-Puffer und 1mg/ml X-Gal getränkt. Die Membran wurde dann aus dem flüssigen Stickstoff auf den mit Z-Puffer und dem X-Gal getränktes Whatmann Papier gelegt und bei 30°C 1h bis Übernacht inkubiert. Die  $\beta$ -Galactosidase exprimierenden Hefekolonien färbten sich blau.

Z-Puffer:	16,1 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 60mM
	5,5 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 40mM
	0,75 g/l	KCl 10mM
	0,246 g/l	MgSO <sub>4</sub> 1mM
	2,7 ml	2-Mercaptoethanol 50mM
	pH = 7	

#### 2.2.2.5 Kreuzen der Hefezellen

Die LS20 pHMS14 KO-Stämme (Mat- $\alpha$  His3+, Leu2+, Ura3-) wurden mit LF20 (MAT-a, His3-, Leu2-, Ura3+) gekreuzt. Die diploiden Stämme sind somit MAT-a/ $\alpha$  und His3+, Leu2+, Ura3+ prototroph. Für die Kreuzung wurde eine Hefekolonie der KO-Stämme und des LF20 Stammes in 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurden 5 $\mu$ l Hefesuspension der jeweiligen KO-Stämme mit 5 $\mu$ l Hefesuspension des LF20 Stammes vereinigt. Von dieser Suspension wurden 10 $\mu$ l zur Selektion der diploiden Zellen auf auf SD Glu, His-, Leu-, Ura- Medium getropft auf dem nur die diploiden Zellen wachsen können.

### 2.2.3 DNA-Methoden

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

Die Plasmid-Isolierung beruht auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979) und der Absorption von DNA an Silikatpartikel in Gegenwart hoher chaotroper Salze (Vogelstein & Gillespie 1979). Eine Übernachtskultur mit dem entsprechendem Antibiotikum wurde abzentrifugiert und das Bakterienpellet in der Lösung-I resuspendiert. Danach wurden die Bakterien durch Zugabe von der Lösung-II lysiert. Durch Zugabe von Lösung-III wurde das Lysat neutralisiert, denaturiert und auf eine hohe Salzkonzentration eingestellt. Durch 10min. zentrifugieren bei 12000x g wurden die denaturierten Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer pelletiert und dadurch von den sich noch in Lösung befindlichen Plasmiden getrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde abgenommen und in eine QIAprep spin Säule überführt. Diese Säule besitzt eine Silikatmembran, an der die Plasmid-DNA durch die hohe Salzkonzentration des Puffers bindet. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Ausbeute an high copy Plasmid-DNA beträgt laut Herstellerangabe je nach verwendetem Plasmid und Wirtsbakterium 3-10 $\mu$ g.

Alkalische Lyse-Lösung I:	TrisHCl, pH=8,0	25mM
	EDTA, pH=8,0	10mM
Alkalische Lyse-Lösung II:	NaOH	2N
	SDS	1%
Alkalische Lyse-Lösung III:	5M Kac	60ml
	Eisessig	11,5ml
	ddH <sub>2</sub> O	28,5ml

### 2.2.3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefezellen

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefezellen erfolgte nach Ausubel et al. 1998 & Davis et al. 1980. Dieses Protokoll liefert keine intakte chromosomale DNA. Eine üN-Kultur wurde gewaschen und in 0,5ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, in ein Eppi überführt und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl Breaking Puffer resuspendiert, 0,3g Glas-Beads (~200µl Volumen), 200µl PCA zugegeben und 5min. sehr stark gevortext, um die Hefezellen aufzubrechen. Durch Zugabe von 400µl TE-Puffer wurden DNA-abbauende Reaktionen verhindert. Die wässrige DNA enthaltende Phase wurde durch Zentrifugieren von der Phenolphase abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der RNA-Abbau erfolgte durch Zugabe von 15µl RNaseA 1mg/ml (10mM/ml) und Inkubation für 15min. bei 37°C. Durch Zugabe von 1/10v/v 4M Ammonium-Acetat und anschließender Ethanol-fällung wurde die chromosomale DNA gereinigt und in 50µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA-Ausbeute beträgt ~20µg. Die DNA ist geeignet für PCR-Reaktionen, Restriktionsverdau und Southern Blot-Analysen. Für PCR-Analysen sind 2µl der DNA in einer 50µl Reaktion ausreichend.

Breaking-Puffer:	<u>für 200ml</u>	
	2% Triton X100	4ml
	1% SDS	2g
	100mM NaCl	1,16g
	10mM Tris, pH=8	2ml 1M Tris
	1mM EDTA, pH=8	0,4ml 0,5M EDTA

### 2.2.3.3 Reinigung & Konzentrierung von Nukleinsäuren

Oft ist es nötig, DNA-Lösungen von Proteinen oder gelösten Molekülen für weitere enzymatische Reaktionen und analytische Studien aufzureinigen und/oder zu konzentrieren. Dies ist wichtig, wenn DNA-modifizierende Enzyme entfernt werden müssen, um eine Modifizierung mit einem zweiten Enzym durchführen zu können, da dieses oft einen anderen Reaktionspuffer benötigt.

### 2.2.3.4 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCA)-Extraktion

Phenol denaturiert Proteine und löst die denaturierten Proteine sehr gut. Chloroform denaturiert ebenfalls die Proteine und erleichtert die Trennung der wässrigen von der organischen Phase. Isoamylalkohol verringert die Schaumbildung während der Extraktion. Zu der zu reinigenden DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches 25:24:1(v/v/v) zugegeben, stark gevortext und zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige DNA-enthaltende Phase vorsichtig abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefällt. Bei Bedarf kann die Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholt werden.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCA) 25:24:1 (v/v/v)

Phenol	10,0ml
Chloroform	9,6ml
Isoamylalkohol	0,4ml

Lagerung unter 0,1M Tris pH = 8, bei 4 °C lichtgeschützt.

### **2.2.3.5 Ethanol-Präzipitierung**

Die Ethanol-Fällung wird angewandt, um DNA-Lösungen zu reinigen und zu konzentrieren. In der Gegenwart relativ hoher Konzentrationen von monovalenten Kationen (0,1-0,5M) induziert Ethanol eine strukturelle Veränderung der DNA, die dazu führt, daß sie aggregiert und aus der wässrigen Lösung ausfällt. Die meisten Salze und kleineren organischen Moleküle sind in 70% Ethanol gut löslich, so kann die DNA gefällt, pelletiert und gleichzeitig effektiv gereinigt und entsalzt werden. Der wässrigen DNA-Lösung wurden 3M Natriumacetat pH=5,2 zugegeben, so daß deren Endkonzentration in der wässrigen DNA-Lösung 0,3M betrug. Anschließend wurden 2-2,5 Volumen an eiskaltem 100% Ethanol zugegeben und 10min. bei -70 °C inkubiert, um die DNA auszufällen. Danach wurde die DNA 10min. 13000rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Die pelletierte DNA mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals 15min. bei 13000rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen der salzhaltigen Ethanolphase, wurde die pelletierte DNA getrocknet und in dem gewünschten Puffer oder ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA mit dem Spektralphotometer**

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt je nach Basenzusammensetzung um 260nm. Bei einer Wellenlänge von 260nm (= A<sub>260</sub> oder OD<sub>260</sub>) entspricht ein gemessener Absorptionswert von = 1 bei 1cm Schichtdicke einer Konzentration von 50µg/ml Doppelstrang-DNA, 40µg/ml RNA und 30-35µg/ml bei Oligonukleotiden. Der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> gibt Aufschluß über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Sehr reine DNA-Lösungen haben einen Quotient zwischen 1,8 und 1,95. Niedrigere Quotienten geben Hinweis auf Protein- oder Phenol-Verunreinigungen. Höhere Quotienten als 2,0 sind ein Hinweis auf noch vorhandene RNA oder denaturierte DNA, denn beim Übergang von Doppelstrang (dsDNA) in Einzelstrang (ssDNA) nimmt die Extinktion um ca. 40% zu (= hyperchromer Effekt).

### **2.2.3.7 Analytische & präparative Gelelektrophorese von DNA**

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Mini- und Midi-Agarosegelen. Die Agarosegele enthielten je nach der aufzutrennenden DNA-Größe 0,8%-1,5% Agarose. Die Agarose wurde im TBE-Puffer gekocht bis die Agarose sich gelöst hat und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in die Gelkammer gegossen. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 5x Probenpuffer gemischt. Die Elektrophoresen wurden mit einer Spannung von U= 100V durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Agarosegele in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5µg/ml ddH<sub>2</sub>O) gefärbt. Danach konnte die DNA im Gel unter UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht werden und nach Bedarf aus dem Gel ausgeschnitten werden.

## 2.2.4 Enzymatische Reaktionen an der DNA

### 2.2.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Behandlung der DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen erfolgte nach dem Enzymhersteller angegebenen Bedingungen. Um noch vorhandene RNA zu verdauen wurde 1/20vol. RnaseA-Lösung (10mg/ml) zugegeben. Die Restriktionsansätze zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde dann durch 10min. erhitzen bei 65°C bzw. 80°C gestoppt und mit ein Agarosegel überprüft.

### 2.2.4.2 Klonierung von DNA

Unter klonieren versteht man den Einbau eines Gens oder DNA-Abschnittes in einen Klonierungsvektor und dessen anschließende Einbringung und Vermehrung in geeignete Wirtszellen. Der Vektor mit dem Gen bzw. DNA-Fragment wird durch die Wirtszelle repliziert und durch die Zellteilung der Wirtszelle an beide Tochterzellen stabil weitergegeben (= Klone).

### 2.2.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Damit sich bei Ligationen von DNA in Vektoren der Vektor nicht mit sich selbst religiert, muß der Vektor selbst an den 5'-Enden dephosphoryliert werden. Die 5'-Dephosphorylierung erfolgte nach Ausubel et al. 1989 & Maniatis et al. 1989 mit alkalischer Phosphatase. Die linearisierte Vektor DNA wurde mit der alkalischen Phosphatase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 30min. bei 37°C inkubiert. Danach mußte die alkalische Phosphatase durch Inkubation 15min. bei 85°C inaktiviert werden.

### 2.2.4.4 Ligation von DNA

Die Ligationen erfolgten nach Ausubel et al. 1989 & Maniatis et al 1989, mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Nach Zugabe des Ligationspuffers und 1unit T4- DNA-Ligase wurde der Ligationansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. Alternativ kann der Ligationansatz für 2-4h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Mengenverhältnis von Vektor und Insert-DNA wurde mit folgender Gleichung berechnet.

MW = N x 333, wobei N = Anzahl der Basen ist.

$$\text{Insert (ng/}\mu\text{l)} = \frac{(\text{MW-Insert})}{(\text{MW-Vektor})} \times \text{Vektor (ng/}\mu\text{l)}$$

Das Vektor-DNA/DNA-Fragment Verhältniß kann auch über die pmol-Enden bestimmt werden. Berechnung der pmol-Enden:

$$\text{Anzahl der pmol-Enden} = \frac{2 \times \text{Betrag (in ng)} \times 10^3}{\text{Länge der DNA (in bp)} \times 649 \text{ Dalton}}$$

### 2.2.4.5 TOPO™ TA Cloning®:

Diese Klonierungsmethode eignet sich besonders um PCR-Fragmente direkt und schnell zu klonieren. Dabei wird der Umstand genutzt, daß die Taq-Polymerase eine nicht-template-abhängige terminale Transferase aktivität hat. Diese fügt ein einzelnes Desoxyadenosin (Adenin) an das 3'-Ende des PCR-Produktes. Der linearisierte pCR-2.1-TOPO Vektor hat einen einzelnen 3'-Desoxythymidin (T) Basen Überhang, an den eine DNA-Topoisomerase-I gebunden ist, welche die Ligierung katalysiert. Die Klonierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.4.6 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit dieser Methode kann die DNA aus einem bestimmten Genomabschnitt mittels spezifischer Primer und einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase vervielfältigt werden (Mullis et al. 1986). Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion läuft in drei Schritten ab. In der ersten Reaktion (= Denaturierung), wird die Ziel DNA durch Hitze in Einzelstränge geschmolzen. In der zweiten Reaktion werden die beiden Primer an beide DNA-Einzelstränge hybridisiert. In der dritten Reaktion wird durch die DNA-Polymerase und dNTPs die Einzelstränge zu Doppelstränge synthetisiert. Es ist eine semikonservative DNA-Vermehrung. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase können alle Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt werden. Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler.

Die PCR-Reaktion:	100-250 ng	genomische DNA
	100pmol	Primer FW
	100pmol	Primer RV
	5µl	10x PCR-Puffer
	200µmol	dNTPs
	<u>0,5µl(0,5 u)</u>	<u>Taq-Polymerase</u>
	ad 50µl	ddH <sub>2</sub> O

Die PCR-Bedingungen:	Denaturieren:	1min. 94 °C
	Annealing:	1min. 55 °C
	<u>Extension:</u>	<u>3min. 72 °C</u>
	Zyklen:	Σ = 35

Zur Sicherung der vollständigen Amplifikation bei wachsender DNA-Menge wurde der letzte Zyklus um 10min. verlängert.

10x PCR-Puffer:	100mM	Tris-HCl
	15mM	MgCl <sub>2</sub>
	500mM	KCl, pH=8,3

dNTP-Gemisch (2mM):	20µl	100mM dATP
	20µl	100mM dCTP
	20µl	100mM dGTP
	<u>20µl</u>	<u>100mM dTTP</u>
	ad 1ml	ddH <sub>2</sub> O

In der PCR Reaktion wird das dNTP Gemisch 1:50 verdünnt so daß es in einer Endkonzentration von 0,2mM vorliegt.

### 2.2.4.7 Primer

Die lyophilisierten Primer wurden in 100µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit dem UV-Spektrophotometer bei A<sub>260</sub> die Konzentration bestimmt. Anschließend wurde mit Hilfe des Molekulargewichtes der Primer die Molarität dieser Lösung bestimmt (nMol = ng/MW). Aus dieser Primer-Lösung wurde dann eine Lösung mit einer Konzentration von 10pmol/µl hergestellt. Der mittlere Schmelzpunkt, der T<sub>m</sub>-Wert der Primer mit mehr als 14 Basen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 650/\text{Primer Länge}$$

oder

$$T_m = 81,5 - 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\%GC) - 600/N$$

Die Annealing Temperatur der Primer wurde mit der folgende Formel ermittelt:

$$T_a = T_m + 3^\circ\text{C}$$

#### **2.2.4.8 PCR zur Amplifizierung eines ORFs aus dem Hefe Genom**

Die Primer sind 100% homolog zur Zielsequenz im Hefegenom. Dies erlaubt eine hohe Annealing Temperatur. Die ORFs wurden mit der Pfu-Polymerase amplifiziert da die Pfu-Polymerase eine Kontrolllese-Funktion besitzt. Mit der Pfu-Polymerase erfolgte die Elongation bei 75°C.

<u>PCR-Reaktion (100µl):</u>	+ 2µl	Template (genomische DNA 1:10 verd.)
	+ 5µl	Primer FW (10pmol/µl)
	+ 5µl	Primer RV (10pmol/µl)
	+10µl	2,5mM dNTPs
	+10µl	10x PCR-Puffer
	+ 6µl	MgCl <sub>2</sub>
	+ 1µl	Pfu-Polymerase 1u/µl
	<u>ad 100µl ddH<sub>2</sub>O</u>	

<u>PCR-Bedingungen:</u>	<u>2min 92°C hot start</u>
	1min. 92°C
	1min. 65°C
	<u>3min. 75°C</u>
	Σ = 35 Zyklen
	Letzter Schritt: 10min. 75°C

#### **2.2.4.9 Anfügen von Adenin am 3'Ende eines linearen DNA-Stranges**

Um das Pfu Amplifikationsprodukt mit dem TOPO Kloning Kit klonieren zu können, war es nötig einen 3'-Adenin-Überhang zu erzeugen, da die Pfu-Polymerase keine terminale Transferase-Aktivität aufweist, die einen 3'-Adenin-Überhang erzeugt. Dieser 3'-Adenin-Überhang ist notwendig um das PCR Produkt mittels TOPO-Kloning-Kit effizient zu klonieren. Nach der PCR mit der Pfu-Polymerase wurde dem PCR-Ansatz 1U Taq-Polymerase zugegeben und 10min. bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und das PCR Produkt mit Ethanol gereinigt und präzipitiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt für die TOPO-Klonierung verwendet.

#### **2.2.4.10 PCR-vermittelte Gendisruption in Hefezellen**

Diese Methode wurde erstmals von Baudin et al. 1993 beschrieben. Eine Plasmid klonierte Markerkassette wurde für die spätere Selektionierung der Klone mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dabei wurden die Primer so gewählt, daß sie am 5'-Ende noch zusätzlich homologe Sequenzen zu der gewünschten Zielsequenz im Hefegenom besitzen. Die amplifizierten Markerkassetten mit den endständigen homologen Hefe Sequenzen wurden nach der PCR Reaktion gefällt, aufkonzentriert und in die

kompetenten Hefezellen transformiert. Die Transformationen in die Hefezellen wurden mit der oben beschriebenen LiAc-Methode durchgeführt. Durch die homologe Rekombination an den entsprechenden Abschnitten wurden die Zielgene durch das PCR-Produkt mit der Markerkassette ausgetauscht und so vollständig deletiert.

PCR-Reaktion (100µl):

+ 2µl	Template (YDpW 1:10 verd.)
+ 5µl	20µM Primer FW(10pmol/µl)
+ 5µl	20µM Primer RV (10pmol/µl)
+10µl	2,5mM dNTPs
+10µl	10x PCR-Puffer
+ 6µl	MgCl <sub>2</sub>
+ 2,5µl	Taq-Polymerase 1u/µl
<u>ad 100µl ddH<sub>2</sub>O</u>	

PCR-Bedingungen:

2min.	94 °C hot start
30sec.	94 °C
1min.	55 °C
3min.	72 °C
<u>Σ = 35 Zyklen</u>	
10min.	72 °C

### **2.2.5 Lokalisation der mTn3 Insertion im Hefegenom**

Die Identifikation der mTn3-Insertion im Hefegenom erfolgte in mehreren Schritten (Burns et al. 1994 & 1996; Ross et al. 1997 & 1998). Da das mTn3 eine DraI Restriktions-Schnittstelle enthält, wurde die genomische DNA mit dem blunt-end-schneidenden Restriktionsenzym DraI verdaut. Auf diese Weise erhielt man mTn3 DNA Fragmente mit flankierender genomischer Hefe DNA. An diese mTn3/Hefe DNA-Fragmente wurden Anchor-Bubble Primer ligiert. Durch eine darauffolgende Vektorette-PCR konnte das mTn3/Hefe DNA-Fragment amplifiziert, kloniert und Sequenziert werden.

#### **2.2.5.1 Ligierung der Anchor-Bubble Primer**

2-4µM der einzelsträngigen Anchor-Bubble Primer wurden in wässriger Lösung mit MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 1-2mM 5min. auf 65 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Divalente Kationen wie Mg<sup>+2</sup> und Mn<sup>+2</sup> stabilisieren die Doppelstrang Bildung der DNA. Die Anchor-Bubble Primer wurden 24h bei 16 °C an die DraI blunt-end-verdaute genomische DNA ligiert.

Ligation:

+ 3µl	Restriktion vom vorhergehenden genomischen DraI Verdau
+ 1µl	annealed Anchor Bubble 2-4mM
+ 1µl	(6u) Ligase
+0,5µl	5mM ATP (Endkonz. 50µM ATP)
<u>ad. 50µl ddH<sub>2</sub>O</u>	

### 2.2.5.2 Die Vectorette PCR an der Hefe DNA

An der Dral verdauten genomischen Hefe DNA mit den daran ligierten Anchor Bubble Primern, konnte die Vectorette PCR durchgeführt werden. Das Vectorette PCR-Produkt wurde dann Topo Kloniert und Sequenziert.

<u>PCR-Reaktion (100µl):</u>	+ 5µl	des Anchor Bubble Ligationansatz
	+ 2,5µl	M13 (-47) Primer
	+ 2,5µl	UV-Primer
	+ 8µl	2,5mM dNTPs
	+ 10µl	10x PCR-Puffer
	+ 1µl	Taq-Polymerase 5u/µl
	<u>ad 100µl ddH<sub>2</sub>O</u>	

<u>PCR-Bedingungen:</u>	<u>2min.</u>	<u>92 °C hot start</u>
	20sec.	92 °C
	30sec.	67 °C
	<u>45sec.</u>	<u>72 °C</u>
	Σ = 35 Zyklen	
	10min.	72 °C

### 2.2.5.3 Sequenzierung mit dem ABI 377

Die Template-DNA wurde über Qiagen-Säulen aufgereinigt. Für die Sequenzierreaktion wurde mindestens 1µg, für 10kb Plasmid 1,5µg Plasmid DNA eingesetzt. Als Primer wurde die M13-Universalprimer eingesetzt.

Reaktionsansatz:	1,2µl	M13-Primer (10pmol/µl)
	<u>8,0µl</u>	<u>Terminator Reaktion Mix (ABI)</u>
	ad 20µl	ddH <sub>2</sub> O

Sequenzierprogramm:	30sec.	95 °C
	15sec.	50 °C
	<u>4min.</u>	<u>60 °C</u>
	Σ = 30 Zyklen	

Die DNA wurde bei RT mit 70% Ethanol gefällt und das Pellet in 4µl Gelpuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 2min. bei 90 °C wurden 2µl auf das Sequenziergel aufgetragen.

### 2.2.5.4 Analyse & Vergleich der Sequenzdaten

Die *S. cerevisiae* Sequenzen wurden mit folgenden Genbanken analysiert:

*S. cerevisiae* Genome Database [www.stanford.edu/Saccharomyces/](http://www.stanford.edu/Saccharomyces/)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Munich information center for protein sequences (mips) [www.mips.biochem.mpg.de](http://www.mips.biochem.mpg.de)

EMBL Nucleotide Sequence Database [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

Die Alignment-Analysen wurden mit dem Programm „ClustalX“ (Thompson et al. 1994) durchgeführt. Für die Sequenz-Identitäts-Tabellen wurden mit dem BioEdit-Programm (Hall 2001) erstellt.

## 2.2.6 Protein-Methoden

### 2.2.6.1 Protein-Extraktion aus Hefezellen

Die Herstellung der Proteinextrakte aus Hefezellen erfolgte nach Ausubel et al. 1998 & Zachariae et al. 1996. Dazu wurde eine 50ml Hefekultur in logarithmischer Wachstumsphase verwendet. Nach Zellernte und Waschen wurden die Zellen in 500µl B60 Puffer + Proteinaseinhibitor resuspendiert, in ein Eppi überführt und 500µl Glasperlen (Ø= 0,45-0,5mm) zugegeben (Klekamp & Weil 1982). Der Zellaufschluß erfolgte durch sehr starkes vortexen. Die Zelltrümmer wurden durch 10min. Zentrifugieren bei 14000rpm präzipitiert. Der Überstand enthielt 5-15mg/ml Protein Rohextrakt. 50-100µl des Rohextraktes wurden im Laemmli-Puffer aufgenommen und 10min. bei 95°C erhitzt, auf ein SDS-PAGE aufgetragen und durch einen Western-Blot analysiert.

B-60-Puffer:	Hepes-KOH pH= 7,3	50mM
	K-Acetat	60mM
	Mg-Acetat	5mM
	Triton X100	0,1%
	Glycerol	10%
	NaF	1mM
	Glycerophosphat	20mM
	DTT	1mM
+1Tablette Proteinase-Inhibitoren-Complete/50ml B-60-Puffer		

6x Lämmli-Puffer:	Tris/HCL pH= 6,8	0,375M
	SDS	12%
	β-Mercaptoethanol	30%
	Glycerin	60%
	Bromphenolblau	0,012%

### 2.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration für die Westernanalysen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Protein-Assay-Dye-Reagent von der Firma Bio-Rad. Hierzu wurde 1µl Protein Rohextrakt auf 800µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 200µl des Färbereagens zugegeben. Das Protein-Farbgemisch wurde 10min. bei RT inkubiert und mit dem Spektralphotometer bei 595nm gegen eine Standardreihe von 1-20µg/ml gemessen.

### 2.2.6.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli 1970). Durch ein 5%-iges Sammelgel erfolgte eine Konzentration der Protein-SDS-Komplexe. Die Auftrennung der Protein-SDS-Komplexe erfolgte in einem 10%-igen Trenngel. Es wurden 50-100µg Gesamtprotein pro Geltasche aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung U = 200V.

4x Sammelgelpuffer:	Tris/HCl pH 6,8	0,5M
	SDS	0,4%

Sammelgel:	4x Sammelgelpuffer	15ml
	30% Acrylamid	10ml
	ddH <sub>2</sub> O	35ml
	10% APS	250µl
	TEMED	35µl
4x Trenngelpuffer:	Tris/HCL pH 8,8	1,5M
	SDS	0,4%
Trenngel:	4x Trenngelpuffer	15ml
	30% Acrylamid	20ml
	ddH <sub>2</sub> O	25ml
	10% APS	250µl
	TEMED	50µl

#### **2.2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)**

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) erfolgte durch einen Elektrotransfer bei 4°C unter konstanter Spannung von U=100V für 1h. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran 1h in PBSTB blockiert. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis der Epitop-markierten Proteine. Dazu wurde die Membran für 2h mit dem in PBSTB 1:5000 verdünnten primären Antikörper inkubiert. Nach 3x 10min. waschen mit PBST wurde die Membran für 2h mit dem 1:5000 verdünnten sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10min. mit PBST gewaschen. Um die Membran für die anschließende Entwicklung vorzubereiten wurde sie 10min. in 0,1M Tris-Puffer inkubiert. Zum Schluß wurde die Membran mit der NBT-Färbelösung für den mit der alkalischen Phosphatase konjugierten Antikörper oder mit der DAB-Färbelösung für den mit der Peroxidase konjugierten Antikörper entwickelt.

10x Laufpuffer:	Tris	30g/l
	Glycin	144g/l
1x Transferpuffer:	1x Laufpuffer	
	Methanol	20%(v/v)
10x PBS-Puffer:	Na-P-Puffer pH = 7,2	100mM
	NaCl	1,5M
PBST-Puffer:	1x PBS Puffer	
	Tween-20	0,3%
PBSTB-Puffer:	1x PBST Puffer	
	BSA	3%
	Na-Azid	0,02%
DAB-Lösung:	DAB	40mg/ml H <sub>2</sub> O
	NiCl <sub>2</sub>	20mg/ml H <sub>2</sub> O

DAB-Färbelösung:	Tris/HCl	100mM
	DAB-Lösung	100µl
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	15µl
NBT-Lösung:	NBT	50mg/ml in DMF
BCIP-Lösung:	BCIP	10mg/ml in DMF
BCIP/NBT-Färbelösung:	BCIP- Lösung	200µl/50ml DIG P3 Puffer
	NBT-Lösung	400µl/50ml DIG P3 Puffer

### 2.2.6.5 In vivo Epitop-Tagging der Hefezellen

Das *in vivo* Epitop-Tagging (Knop et al. 1999) der Hefezellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die „PCR-vermittelte Gendisruption“. Das gewünschte Epitop, das auf einem Plamid kloniert vorliegt, wurde zusammen mit der Markerkassette durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Die 5'-Primerenden wurden so gewählt, daß sie homolog zu dem Ende des gewünschten Zielgens waren, jedoch ohne das betreffende Stoppkodon. Dies ist notwendig, damit bei der späteren homologen Rekombination das Stoppkodon aus dem Gen heraus rekombiniert wird und so das Epitop bei der späteren Translation mit gelesen und mit synthetisiert wird. Die PCR-Produkte wurden in die Hefezellen transformiert und in die gewünschten Zielgene rekombiniert. Die PCR-Bedingungen sind wie oben bei der PCR-vermittelten Gendisruption. Die Transformation erfolgte mit der oben beschriebenen LiAc-Methode. Mit Hilfe dieser Epitop-Tags war es möglich, die Strukturproteine der Gene zu identifizieren und die Co-Immünpräzipitation durchzuführen.

### 2.2.6.6 Co-Immünpräzipitation

Die Co-Immünpräzipitation erfolgte verändert nach Zachariae et al. 1996; Lane & Harlow 1982.

### 2.2.6.7 Kopplung der Antikörper an die Protein A-Sepharose (PAS)

Für die Kopplung der Antikörper an die Protein A-Sepharose (PAS) wurden 200µl PAS in 2ml Glycin-OH-Puffer in einem 12ml Zentrifugen Röhrchen 1h bei RT gequollen. Anschließend wurden 100µl c-Myc-Antikörper zugegeben und eine Stunde bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Antikörper gekoppelte PAS mit 10ml Na-Borat-Puffer 2x gewaschen. Die Antikörper-gekoppelte PAS-AK wurde dann 30min. mit 10ml Na-Borat und 20mM Dimethylpimelidat bei RT auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach 2x waschen mit 10ml EtOH-Amin-Puffer, wurde die PAS-AK 2h mit 10ml EtOH-Amin-Puffer bei RT inkubiert. Durch zentrifugieren wurde das EtOH-Amin entfernt und die PAS-AK dann mit 2ml PBS-BSA 30min. bei RT blockiert. Anschließend wurde das Verhältnis PAS-AK zu PBS-BSA Puffer auf 50% eingestellt. Die PAS-AK kann bei 4°C aufbewahrt werden.

Glycin-OH-Puffer:	Glycin	1,45M
	NaCl	3M
	pH = 8,9 mit NaOH	
Na-Borat-Puffer:	Borsäure	0,2M
	pH = 9,0 mit NaOH	

EtOH-Amin-Puffer:            EtOH-Amin            0,2M  
    PH = 8,0 mit HCl

**2.2.6.8 Co-Immunpräzipitation der Proteinextrakte**

Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte wie oben beschrieben. Die Protein-Rohextrakte wurden mittels Bradford, wie oben beschrieben für die Co-Immunpräzipitation angepaßt. Für die Co-Immunpräzipitation wurden 100µl PAS-AK zu 400µl Protein-Rohextrakt zugegeben und 2h auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die an den PAS-AK gebundenen Proteine durch vorsichtiges Zentrifugieren co-immunpräzipitiert und durch mehrmaliges Waschen mit dem B-60-Puffer von den übrigen Proteinen gereinigt. Um die PAS-AK von den co-immunpräzipitierten Proteinen zu trennen, wurde dem PAS-AK-Proteinpellet 50µl 20% SDS-Puffer zugegeben und 10min. bei RT inkubiert. Das PAS-AK Proteingemisch wurde dann durch PCR-Filterpipettenspitzen zentrifugiert, um die co-immunpräzipitierten Proteine von den PAS-AK mechanisch abzutrennen. Die abgetrennten Proteine wurden dann in 1/6 Volumen 6x Laemli-Puffer aufgenommen und 10min. bei 100°C erhitzt. Die co-immunpräzipitierten Proteine wurden dann auf ein SDS-Page aufgetrennt und durch Western-Blot, wie oben beschrieben, analysiert werden.

**2.2.6.9 Immunlokalisation von Proteinen in der Hefezelle**

10ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurden mit Formaldehyd in einer Endkonzentration von 5%, 2-3h fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1M Sorbitol-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 1ml 1M Sorbitol-Puffer resuspendiert. Um die Zellwand und die Zellmembran der Hefezellen permeabel für die Antikörper zu machen, wurden die fixierten Zellen mit 10µl Zymolase, 30µl Glusulase und 10µl 1M DTT behandelt und 30min. bei 37°C inkubiert. Die Hefezellen wurden mit dem Sorbitol-Puffer gewaschen und wieder in 1ml Sorbitol-Puffer aufgenommen. Von diesem Schritt an sind die Zellen fertig für die Antikörperbehandlung. Die Objektträger wurden mit einer 0,1% Polylysin-Lösung behandelt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O wieder gespült. 20µl Hefezellen wurden für ca. 1min. auf dem Objektträger aufgetragen, wieder entfernt und den Objektträger 3x mit PBS gespült. Ab hier dürfen die Hefezellen nicht mehr trocknen. Die Hefezellen wurden dann mit PBS-BSA-IgG 10min. blockiert und mit dem primären Antikörper (1:100 verdünnt in PBS+BSA) 90min. inkubiert. Danach wurden die Hefezellen 4x mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:300 verdünnt mit PBS+BSA) für 90min. inkubiert. Nach 4x waschen mit PBS wurde die DNA in den Zellkernen der Hefezellen mit 20µl DAPI (1µg/ml) für 5min. gefärbt. Das DAPI wurde durch 3x waschen mit PBS wieder entfernt. Zum Schutz der Fluoreszenz-Reaktion des FITC konjugierten Antikörpers wurden die Zellen mit Mount-Lösung inkubiert und mit dem Deckglas und farblosem Nagellack versiegelt.

Sorbitol-Puffer:            HEPES            50mM  
    Sorbitol            1M  
    pH=7-7,5

Zymolase-Stocklösung:    10mg/ml H<sub>2</sub>O

DAPI-Stocklösung:        2mg DAPI-2-HCL/10ml H<sub>2</sub>O

Mcllvain-Puffer:            Lösung-1: 0,1mol/L Zitronensäure in H<sub>2</sub>O  
                                 Lösung-2: 0,2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O  
                                 Für pH=7,0: 1,82µl Lösung-1 und 18µl Lösung-2

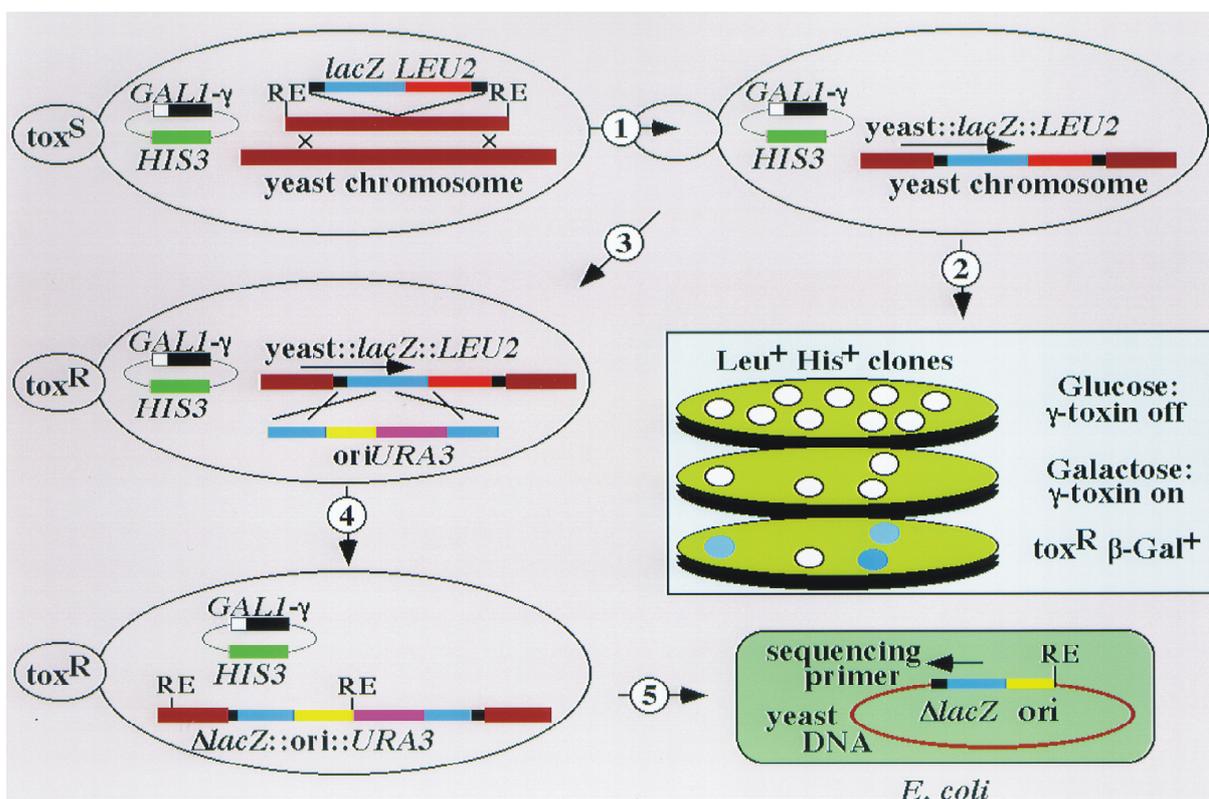
Mount-Lösung:            600µl            Mcllvain-Puffer  
                                 300µl            Glycerol

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung der *TOT* Gene durch mTn3-Mutagenese

Um  $\gamma$ -Toxin resistente Mutanten zu finden und die dafür verantwortlichen Gene zu identifizieren und isolieren zu können, wurde eine mTn3-Minitransposon mutagenisierte Genbank durchsucht (Burns et al. 1994 & 1996; Ross-MacDonald et al. 1997 & 1998). Dazu wurde der Ausgangshefestamm LS20', der das  $\gamma$ -Toxin auf einen GAL1 Promotor induzierbaren Plasmid trägt (pHMS14), mit einer mTn3-Minitransposon mutagenisierte Genbank transformiert (Abb. 4). Rein statistisch sind mindestens 30.000 Transformanten nötig um einmal das gesamte Hefegenom mit der mTn3-Minitransposon mutagenisierten Genbank abzudecken. Um genomweit mTn3-Minitransposon Insertionen einzufügen die sich im Leserahmen befindet abzudecken, sind 180000 Transformanten nötig. Insgesamt wurden 100.000 mTn3 Hefetransformanten untersucht. Für die  $\gamma$ -Toxin Expression, die unter der Kontrolle des *UAS<sub>GAL1</sub>* Promotors steht, wurden die Minitransposon Transformanten von den Glukose Transformationsplatten auf Galaktose Platten replikaplatziert. Auf den  $\gamma$ -Toxin exprimierenden Galaktose Platten war es 312 Hefekclone möglich zu wachsen. Sie schienen demnach resistent gegen das endogen exprimierte  $\gamma$ -Toxin zu sein. Ungefähr 1/6 davon, nämlich 58 Hefekclone, zeigten  $\beta$ -Galaktosidase Expression auf einen LacZ-Filter Test (Abb. 4). Was darauf hindeutete, daß es sich bei diesen Hefeklonen um eine mTn3 *LacZ* Integration handelt die sich im Leserahmen des betreffenden Gens befindet. Um sicher zu stellen, ob in den resistenten Hefeklonen das  $\gamma$ -Toxin exprimiert wird, wurden die pHMS14 Plasmide aus den resistenten Hefeklonen isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Anschließend wurden die untersuchten pHMS14 Plasmide in den sensitiven, Ausgangsstamm LS20 zurück transformiert und auf Toxizität überprüft. Nach dieser Analyse reduzierte sich die Anzahl der resistenten mTn3 Hefekclone auf 41. Um spezifische defekte pHMS14 *UAS<sub>GAL1</sub>* Promotor Hefekclone, die das  $\gamma$ -Toxin nicht mehr exprimieren, zu eliminieren, wurden die verbleibenden resistenten Hefekclone mit einem  $\gamma$ -Toxin Plasmid (pHAL9) das unter der Kontrolle eines Methionin getriebenen *UAS<sub>MET25</sub>* Promotors steht, transformiert. Nur 15 Hefekclone konnten in Abwesenheit von Methionin mit dem exprimierenden  $\gamma$ -Toxin wachsen. Mit diesen verbleibenden resistenten Hefeklonen wurde dann ein Killer Eklipse Test durchgeführt, der die Klone auf Resistenz gegenüber dem Exotoxin testet (Kishida et al. 1997). Nur drei resistente **Knock Out**

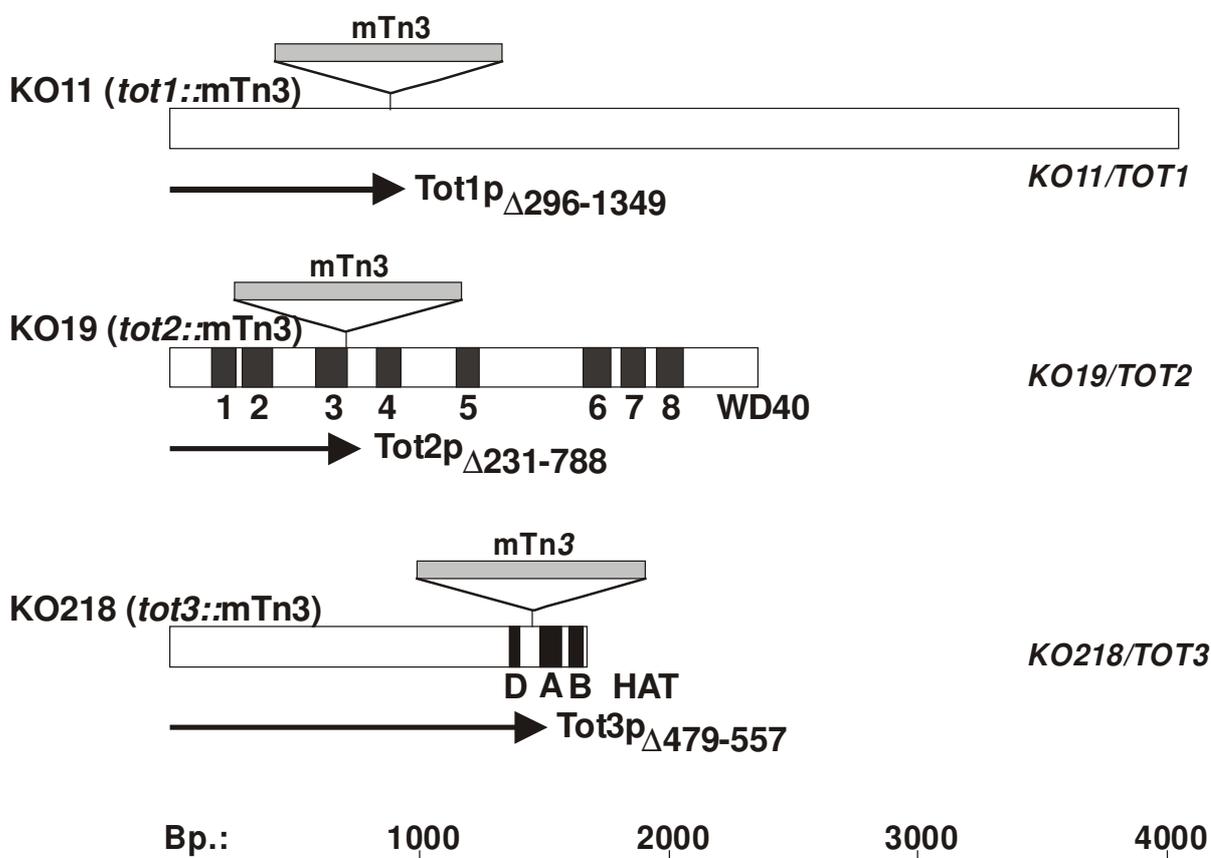
Hefeklonen, KO-11, KO-19 und KO-218 zeigten Resistenz gegenüber dem Killertoxin. Der Hefeklon KO-19 ist der einzige verbleibende Klon der eine  $\beta$ -Galaktosidase Expression auf einen Filter Test zeigt und somit eine im Leserahmen befindliche mTn3 Transposon Insertion besitzt. Schließlich wurden an diesen drei verbleibenden resistenten Hefeklonen die genomische mTn3 Insertion mittels einer Vectorette PCR lokalisiert und durch Sequenzierung der PCR Produkte die disruptierten Gene identifiziert. Die Sequenzen KO-11, KO-19 und KO-218 konnten mit Hilfe der „Saccharomyces Genome Database“ (= SGD) den offenen Leserahmen YLR384c (KO-11), YGR200c (KO-19) und YPL086c (KO-218) zugeordnet werden (Frohloff et al. 2001). Weil diese Gene die möglichen Ziele für das  $\gamma$ -Toxin darstellen, wurden diese Gene als **Toxin Target** = *TOT1-3* Gene benannt.



**Abb. 4:** Schema der mTn3-Minitransposonmutagenese um  $\gamma$ -Toxin resistente Mutanten zu identifizieren (nach Schaffrath). 1. Der Hefestamm LS20, der das  $\gamma$ -Toxin auf einen GAL1 Promotor getriebenen Plasmid trägt (pHMS14), wurde mit der mTn3-Minitransposon mutagenisierte Genbank transformiert. 2. Die  $\gamma$ -Toxin resistenten Mutanten konnten durch Wachstum auf Galaktose identifiziert werden. 3. und 4. Transformation und Integration eines Rescue Vektors in das LacZ Gen der mTn3 Insertion. Restriktionsverdau des Hefegenoms und Religierung des Rescue-Vektors. 5. Transformation des religierten Rescue-Vektors in *E. coli* und anschließende Sequenzierung. Alternativ zu den Schritten 3 - 5, wurden die mTn3 Integrationen durch Klonierung und Sequenzierung von Vectorette PCR Produkte identifiziert. (Ross-Macdonald et al. 1997)

### 3.1.1 Lokalisierung der mTn3 Insertion im Hefegenom

Die mTn3 Minitransposon Insertion konnte unter Zuhilfenahme der Vektorette PCR lokalisiert genau im Genom werden. Mit dieser Technik war es möglich, ein PCR Fragment zu amplifizieren, das die Sequenz des mTn3 mit der angrenzenden genomischen Hefe-DNA enthielt. Nach anschließender Klonierung und Sequenzierung der PCR-Fragmente konnten die betroffenen Gene identifiziert und die genaue mTn3 Insertion innerhalb des betroffenen Gens bestimmt werden (Fichtner et al. 2002b).

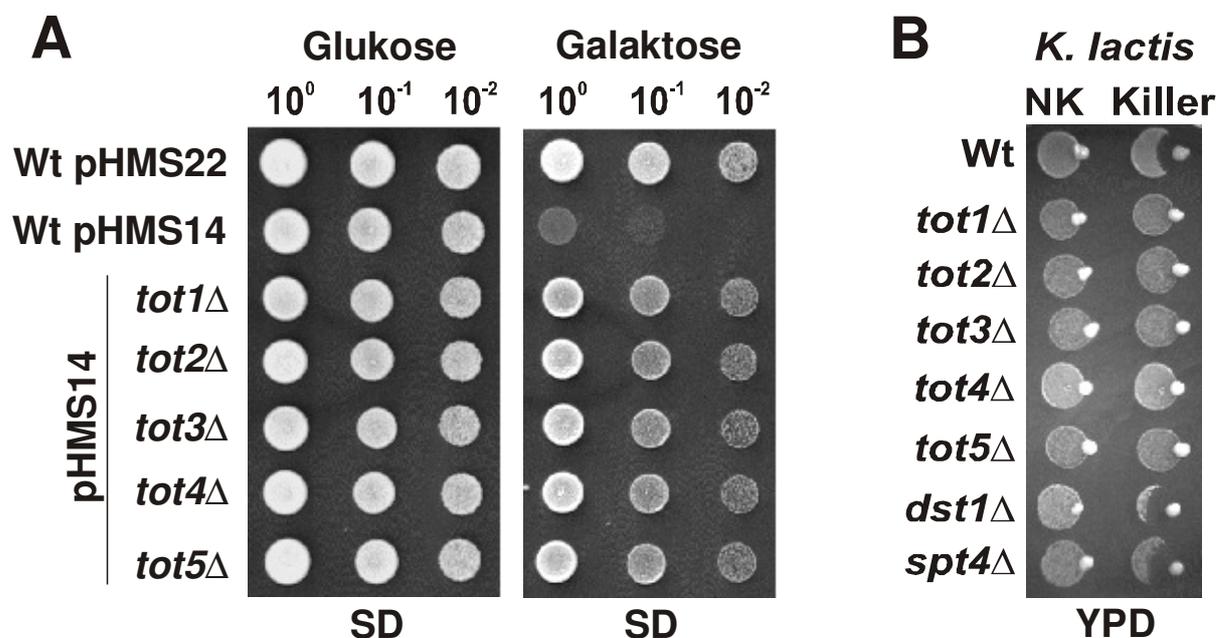


**Abb. 5:** Die mTn3 Insertionen *tot1-3::mTn3* wie sie in den Stämmen KO11, KO19 und in KO218 vorliegen. Die erwartete Länge der exprimierten C-terminal verkürzten Tot-Proteine sind durch Pfeile unterhalb der Gene dargestellt. Die deletierten (Δ) Aminosäurereste sind angegeben. Die WD40 Wiederholungen (*TOT2/ELP2*: Fellows et al. 2000) und die HAT Domänen D, A und B (*TOT3/ELP3*: Wittschieben et al. 2000) sind als schwarze Balken hervorgehoben (Fichtner et al. 2002b).

Wie in Abbildung 5 zu sehen, liegt die mTn3 Insertion in KO11 (*tot1::mTn3*) im C-terminalen Bereich von Tot1p, so daß die Aminosäurereste 296-1349 fehlen. Das KO11p Protein ist also um rund 80% deletiert. Im Stamm KO19 (*tot2::mTn3*) wurden die Aminosäurereste 231-788 in Tot2p durch das mTn3 deletiert. Von den insgesamt acht WD40 Protein-Protein Bindedomänen (Fellows et al. 2000) gehen fünf durch die

mTn3 Insertion verloren. Es ist anzunehmen, daß die vollständige Funktion von Tot2p nicht mehr gewährleistet ist. Die mTn3 Insertion in KO218 (*tot3::mTn3*) verursacht eine C-terminale Verkürzung der konservierten Histon Acetyltransferase (HAT) Domänen A und B von Tot3p, so daß die HAT-Aktivität (Wittschieben et al. 2000) vermutlich gestört ist. Die katalytischen HAT-Domänen A und B sind eingebunden in der Bindung von Acetyl-CoA und somit essenziell für die Enzym-Aktivität (Wittschieben et al. 2000). Alle mTn3 Insertionen ähneln unvollständige Deletionsmutationen, die zum Funktionsverlust der jeweiligen Proteine führen sollten (Fichtner et al. 2002b). Um zu überprüfen, ob die von den mTn3 Insertionen verursachte Zymocin Resistenz auf den funktionellen Verlust der identifizierten Gene zurückzuführen ist, war es nötig, sie einzeln mTn3-unabhängig zu inaktivieren. Dazu wurden die Gene, PCR vermittelt, individuell deletiert (Baudin et al. 1993). Zur Unterscheidung dieser Null-Allele von den mTn3 Insertions-Mutanten KO11, KO19 und KO218, wurden die disruptierten Gene mit *tot1-3Δ* bezeichnet (**T**oxin **T**arget). Zusätzlich wurden zwei weitere Gene (*KTI12* und *IKI1*) mit tot Phänotyp (Butler et al. 1994; Yajima et al. 1997), individuell disruptiert: *KTI12* (*TOT4*) und *IKI1* (*TOT5*) (Frohloff et al. 2001). Um diese *tot1-5Δ* Hefestämme auf Resistenz gegen endogenes  $\gamma$ -Toxin zu prüfen, wurden sie mit dem Vektor pHMS14 transformiert, der das  $\gamma$ -Toxin unter Kontrolle des UAS<sub>GAL1</sub> Promotors trägt. Die Fähigkeit von *tot1-5Δ* Zellen auf Galaktosemedium zu wachsen, während Wildtyp LS20 im Wachstum arretiert wird, zeigt  $\gamma$ -Toxin Resistenz an. Für den Exotoxin-Test wurden Wildtyp, *tot1-5Δ*, *dst1Δ* und *spt4Δ* Zellen zusammen mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 auf YPD-Platten aufgetragen. Als Kontrolle diente ein *K. lactis* **N**icht-**K**illerstamm NK40. Die Wachstumshemmhöfe in der Nähe des Killerstamms zeigen Zymocin-Sensitivität an. Kein Hemmhof bedeutet Resistenz gegenüber dem Holo-Zymocin. Die *tot1-5Δ* Zellen zeigen Resistenz, sowohl gegen endogenes  $\gamma$ -Toxin als auch gegen extrazellulärem Holo-Zymocin (Abb. 6) (Frohloff et al. 2001). Die oben im Screen gefundenen *TOT1*, *TOT2* und *TOT3* Gene wurden parallel zu dieser Studie als Strukturgene *ELP1*, *ELP2* und als *ELP3* identifiziert, die Untereinheiten des RNA Polymerase-II Elongator-Komplexes kodieren und vermutlich von Relevanz für die Transkriptionselongation sind (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000). Die Transkriptions Faktoren TFIIS (*dst1Δ*) und Spt4 (*spt4Δ*) sind Elongator-Komplex unabhängige RNA-Pol-II Elongations-Faktoren (Archambault et al. 1992; Hartzog et al. 1998; Wada et al. 1998). Aus diesem Grund wurden *dst1Δ* und *spt4Δ*,

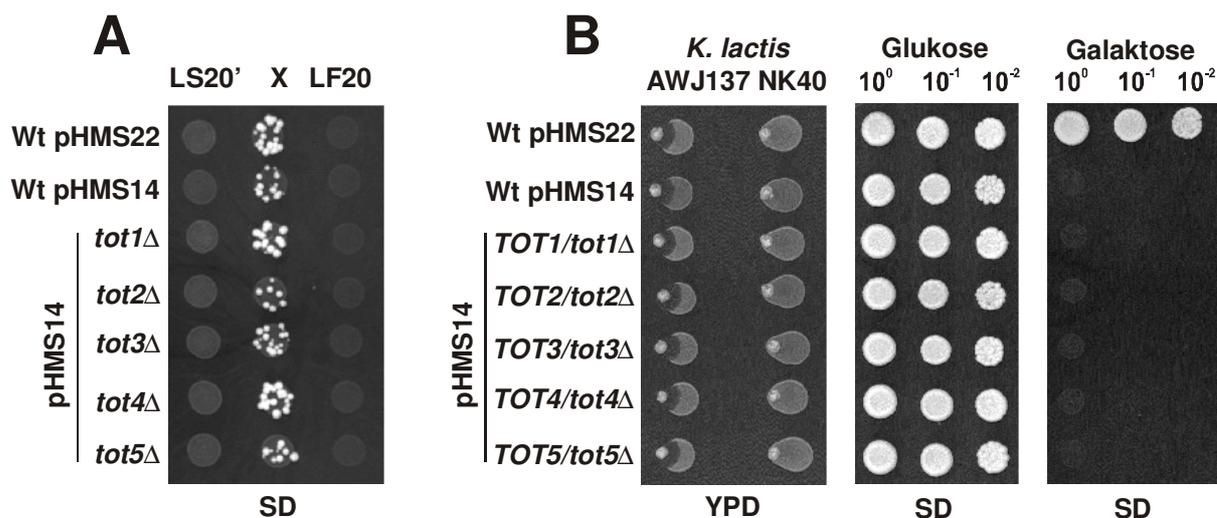
ebenfalls gegen das Exotoxin getestet. (Abb. 6B). Sowohl *dst1Δ* als auch *spt4Δ* Zellen sind gegenüber dem Exotoxin wie der Wildtypstamm sensitiv. Das zeigt, daß die Zymocin Resistenz nicht allgemein mit den Elongationsmutanten assoziiert ist, sondern spezifisch an Funktionsverlust der *TOT* Gene gebunden ist (Frohloff et al. 2001).



**Abb. 6:** Die *tot1-5Δ* Mutanten sind resistent gegen  $\gamma$ -Toxin und exogenem Zymocin. **(A)**  $\gamma$ -Toxin Test. Serielle Verdünnungen des Wildtyp LS20 (Wt), die *tot1-5Δ* Stämme wurden auf eine reprimierende Glukoseplatte und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. Kein Wachstum zeigt  $\gamma$ -Toxin-Sensitivität an. **(B)** Exotoxin Test. Der Wildtyp LS20 (Wt), die *tot1-5Δ* Stämme und die Kontrollstämme *dst1Δ* und *spt4Δ* wurden mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Hemmhöfe zeigen Zymocin-Sensitivität an, keine Hemmhöfe zeigen Zymocin-Resistenz an.

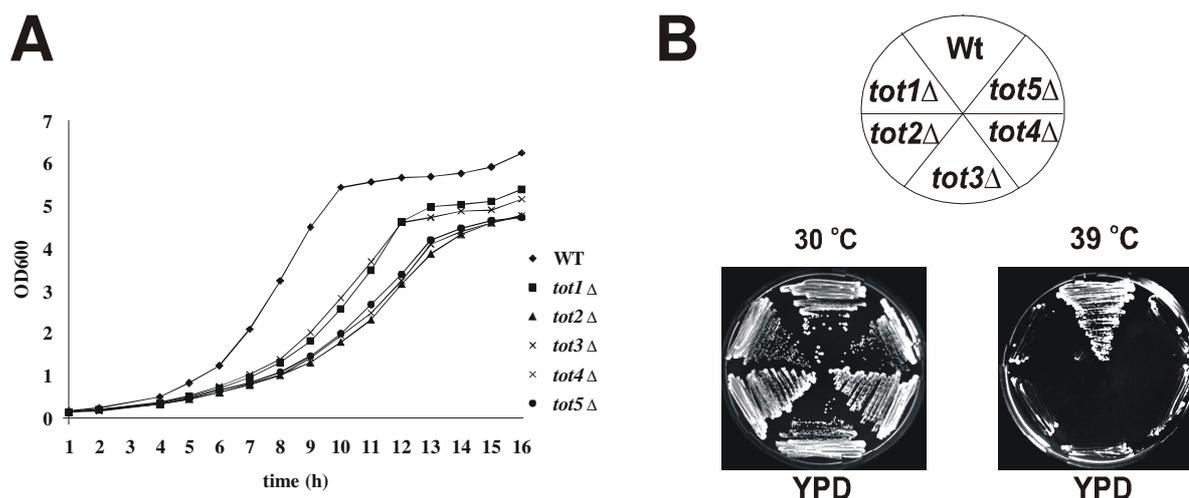
### 3.2 Analyse der *tot1-5Δ* Phänotypen

Um nachzuweisen, ob die *totΔ* Mutationen dominant oder rezessiv sind, wurden die pHMS14 tragenden *tot1-5Δ* Stämme mit dem LF20 Hefestamm gekreuzt. Als Kontrolle wurde das Plasmid pHMS22 verwendet, das kein Insert trägt. Der LF20 Stamm ist wie LS20 haploid und Zymocin sensitiv, besitzt aber den Paarungstyp a und ist *URA3*. Damit konnte dieser Stamm zur Erzeugung und Selektion diploider Hefestämme verwendet werden. Die erhaltenen heterozygoten *TOT1-5/tot1-5Δ* Diploiden Zellen waren alle sensitiv gegenüber Exo-Zymocin und dem intrazellulär exprimierten  $\gamma$ -Toxin. Damit konnte gezeigt werden, daß sich die heterozygoten *tot1-5Δ* Nullmutationen sich rezessiv verhalten und die Toxinwirkung sich dominant verhält. Dies unterstützt den Befund, daß es sich bei den *tot1-5Δ* Nullmutationen um den Verlust von Funktionsmutanten handelt. (Abb. 7).



**Abb. 7:** Die diploiden Hefestämme **(A)** Hefekreuzung. Auf einer Glukoseplatte (Ura<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>) wurden links die haploiden LS20 *tot1-5*Δ Null-Mutanten, in der Mitte die gekreuzten *tot1-5*Δ x *TOT1-5* Wt Zellen und rechts die haploiden LF20 *TOT1-5* Wt Zellen aufgetragen. Kein Wachstum zeigt haploide Zellen an, Wachstum zeigt diploide *TOT1-5/tot1-5*Δ Zellen an. **(B)** Exotoxin und  $\gamma$ -Toxin Test. Die diploiden Wt und *TOT1-5/tot1-5*Δ Zellen wurden auf eine YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Hemmhöfe zeigen Zymocin Sensitivität, keine Hemmhöfe zeigen Zymocin Resistenz an.  $\gamma$ -Toxin Test: Serielle Verdünnungen der diploiden *TOT1-5/tot1-5*Δ Stämme wurden replika auf eine reprimierende Glukoseplatte und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. Kein Wachstum zeigt  $\gamma$ -Toxin-Sensitivität an.

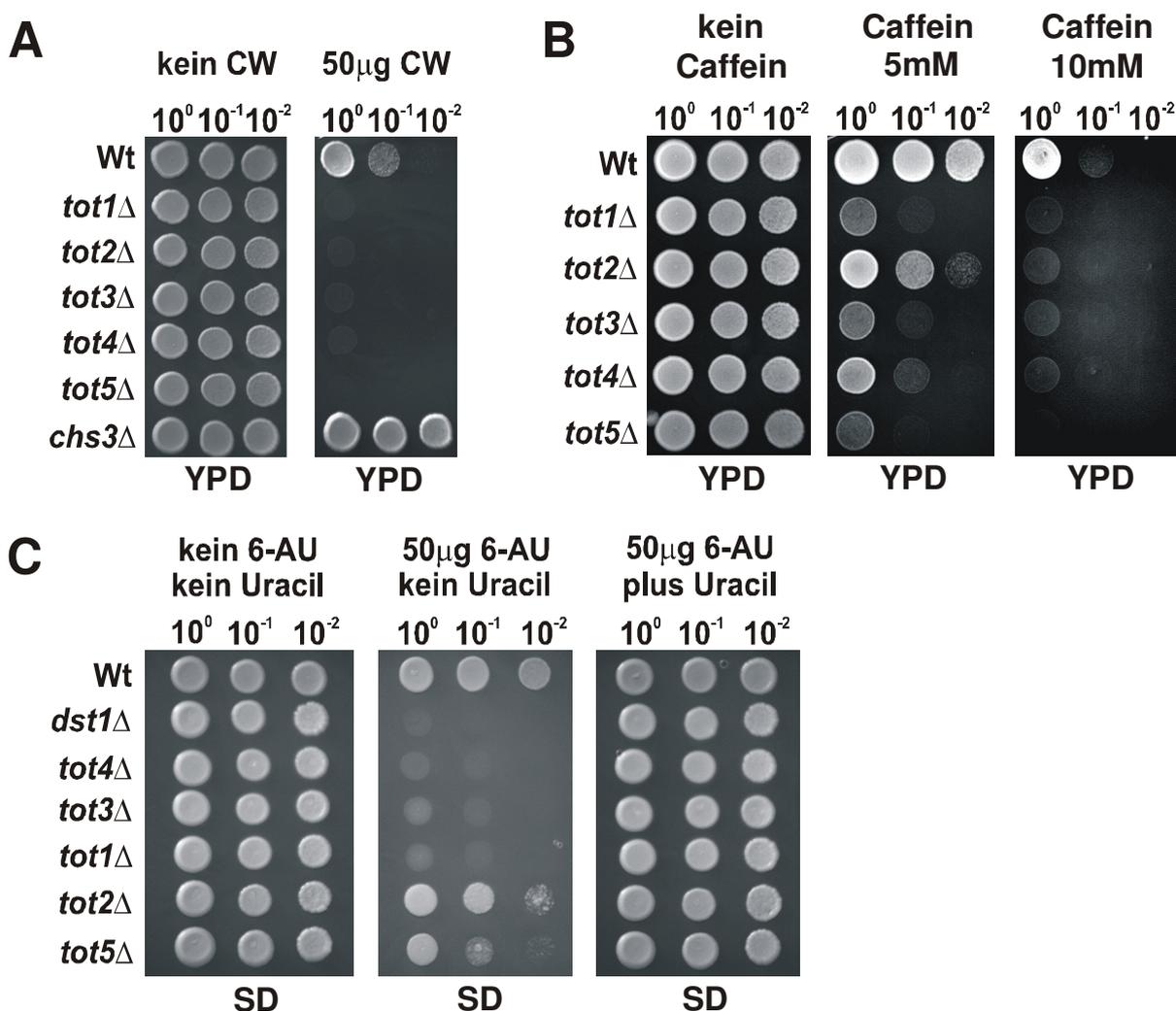
Als nächstes wurden die *tot1-5*Δ Hefezellen auf ihr Wachstumsverhalten im Flüssigmedium untersucht. Dazu wurden die YPD Flüssigvollmedien mit einer über Nachtkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und das Wachstum über 16 Stunden lang bei 30°C verfolgt. Das Ergebnis zeigt, daß die *tot1-5*Δ Hefezellen im Vergleich zu dem Wildtyp einen langsamen Wachstumsphänotyp (slg<sup>+</sup> = **s**low **g**rowth phenotype) besitzen (Abb. 8A) (Frohloff et al. 2001). Ihre Verdopplungszeit ist um den Faktor 1,5 – 2,0 verlängert. Während der Wildtyp eine Verdopplungszeit von 2h Stunden hat, besitzen die *tot1-5*Δ Hefezellen eine Verdopplungszeit von ca. 3h Stunden. Die Wachstumsrate  $\mu$  ist gegenüber dem Wildtyp  $\mu=0,5$ , bei den *tot1-5*Δ Mutanten um  $\mu=0,25-0,3$  signifikant reduziert. Außerdem erreichen die *tot1-5*Δ Zellen in der stationären Phase nicht die Wildtyp Biomasse (Abb. 8) (Frohloff et al. 2001). Weitere Wachstums-Untersuchungen wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Aus diesen Experiment geht hervor, daß die *tot1-5*Δ Zellen bei einer Temperatur über 38°C thermosensitiv (TS) sind (Abb. 8B) (Frohloff et al. 2001). Bei einer Temperatur über 38°C wird also jedes *tot1-5*Δ Gen essentiell für die Hefezelle (Frohloff et al. 2001).



**Abb. 8:** Die Deletion der *TOT1-5* Gene führt zu verlangsamtetem Wachstum und Thermosensitivität. **(A)** Wachstumskurve der *tot1-5*Δ Hefestämme im Vergleich zum Wildtypstamm LS20. Das Wachstum der *tot1-5*Δ Stämme wurde in YPD Vollmedium (2% Glukose) durchgeführt. Das Wachstum wurde bei einer OD<sub>600</sub> über eine Periode von 16h Stunden gemessen. **(B)** Thermosensitivität (TS). Die *tot1-5*Δ Stämme wurden auf YPD Platten ausgestrichen und bei 30°C und 39°C inkubiert. Kein Wachstum zeigt TS an.

Um zu untersuchen ob die *tot1-5*Δ Deletionen die äußere Zellwand beeinflussen, wurde das Wachstum der *tot1-5*Δ Hefezellen in Gegenwart von Calcofluor White getestet. Calcofluor White ist ein fluoreszierender Farbstoff der spezifisch in Hefe an Zellwandchitin bindet (Molano et al. 1980; Roncero & Duran 1985). Es konnte gezeigt werden, daß Calcofluor White an die im Aufbau befindliche  $\beta$ -verknüpfte Polysaccharide wie Chitin und Cellulose durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipolinteraktionen bindet. Durch diese Bindung wird der weitere Aufbau von Mikrofibrillen unterbrochen und dadurch der korrekte Zellwandaufbau behindert (Elorza et al. 1983; Murgui et al. 1985; Kopec & Gabriel 1992; Hampsey 1997). Daraufhin konnten verschiedene Arbeitsgruppen Calcofluor White resistente Mutanten isolieren, die einen verringerten Chitingehalt in der Zellwand aufweisen (Roncero et al. 1988; Bulawa & Osmond 1990). Für diesen Calcofluor White Wachstumstest wurden die *tot1-5*Δ Zellen auf Vollmediumplatten mit 50 $\mu$ g/ml Calcofluor White aufgetragen. Als Kontrolle diente die *chs3*Δ chitindefiziente Mutante, die Calcofluor White resistent ist (Abb. 9A) (Jablonowski 2000). Verglichen mit dem Wildtyp, welcher ebenfalls bei der gezeigten Calcofluor White Konzentration im Wachstum geschwächt wird, sind die *tot1-5*Δ Hefestämme deutlich inhibiert. Die positive *chs3*Δ Referenz ist dagegen resistent (Abb. 9A) (Frohloff et al. 2001). Dieser hypersensitive Calcofluor White Phänotyp zeigt, daß bei den *tot1-5*Δ Mutanten die Integrität der Zellwand beeinflusst ist (Frohloff et al. 2001). Caffein ist ein Purin analog, der für die Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten mit fehlerhaftem

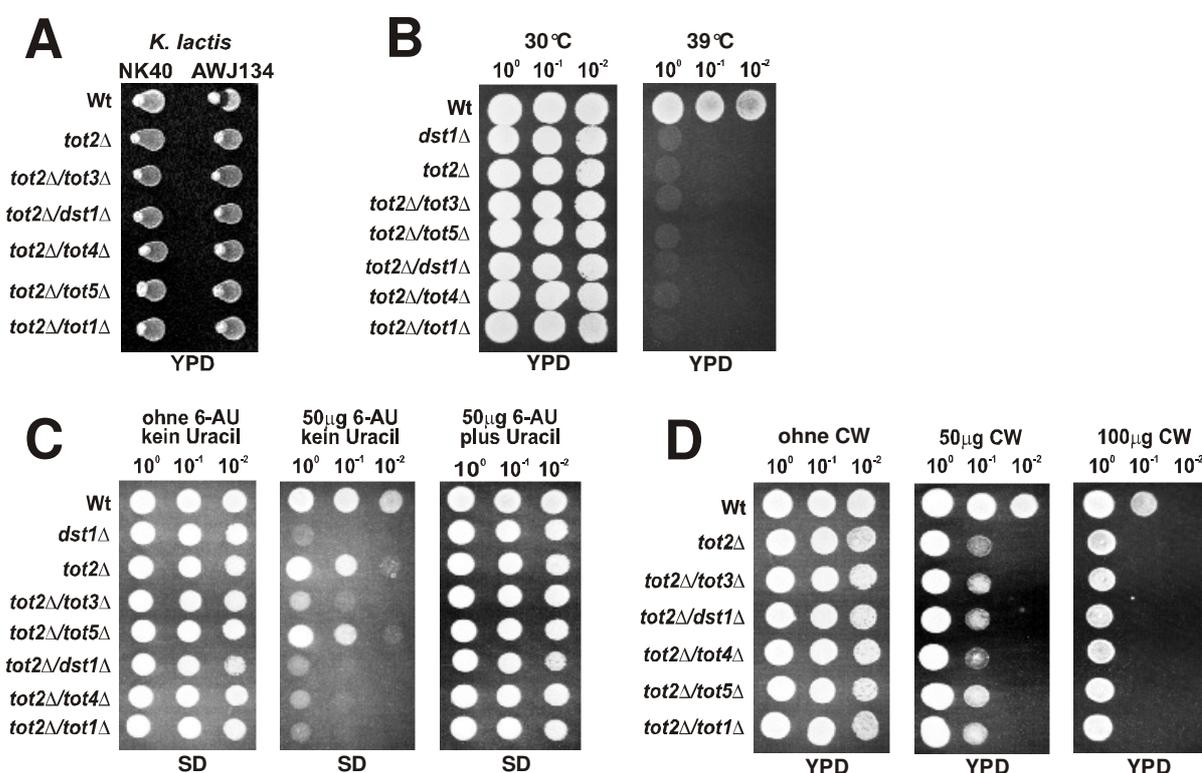
Zellwandaufbau eingesetzt wurde (Ram et al. 1994). Die Wirkung von Caffein auf die Zelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man weiß jedoch, daß Caffein ein Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase ist und wahrscheinlich in den MAP Kinase Signalweg eingreift (Ram et al. 1994 & Hampsey 1997). Hierzu wurden *tot1-5Δ* Hefesuspensionen auf Vollmediumplatten die 5mM, 10mM und kein Caffein enthielten aufgetragen. Auch hier verhalten sich alle *tot1-5Δ* Hefestämme gegenüber dem Caffein sensitiv, jedoch sind die *tot1-5Δ* Hefestämme nicht alle gleich sensitiv. Die Hefestämme *tot2Δ* und *tot5Δ* sind deutlich weniger sensitiv als die Stämme *tot1Δ*, *tot3Δ* und *tot4Δ* (Abb. 9B) (Frohloff et al. 2001).



**Abb. 9:** Weitere *tot* Phänotypen. **(A)** Calcofluor White (CW) Sensitivität. Serielle Verdünnungen der *tot1-5Δ* Stämme, des LS20 Wt Stamms und der CW resistente *chs3Δ* Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen, die 50µg/ml CW und kein CW enthielten. Kein Wachstum zeigt CW Hypersensitivität an. **(B)** Caffein Sensitivität. Die *tot1-5Δ* Stämme und der LS20 Wt Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen, die 5mM und 10mM Caffein enthielten. Kein Wachstum zeigt Caffein-Sensitivität an. **(C)** 6-Azauracil (6-AU) Sensitivität. Die *tot1-5Δ* Stämme, der LS20 Wt Stamm und der *dst1Δ* Stamm wurden replika auf SD Platten aufgetragen, die kein 6-AU, 50µg/ml 6-AU und 50µg/ml 6-AU+ Uracil enthielten. Die *dst1Δ* Mutante diente als 6-AU hypersensitive Kontrolle.

Angeregt durch die gleichzeitige Identifikation der *TOT1-3* Gene als transkriptionsrelevante Elongatorgene, *ELP1-3*, der RNA Polymerase-II (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000), wurde die Auswirkung der *tot1-5Δ* Deletionen auf die Transkription mit Hilfe der Indikatorchemikalie 6-Azaurazil (6-AU) überprüft. 6-Azaurazil (6-AU) ist ein Inhibitor des Orotidylsäure-Decarboxylase und der Inositol-Monophosphat-Dehydrogenase, die beide Komponenten der UTP und GTP Biosynthese sind. Auf diese Weise vermindert das 6-AU die intrazelluläre UTP und GTP Menge, so daß die mRNA Synthese durch die RNA Polymerase-II erschwert wird (Exinger & Lacroute 1992). Durch Zugabe von Uracil kann der 6-AU sensitive Phänotyp wieder aufgehoben werden, da die Hefezelle das fehlende Uracil dann von außen aufnehmen kann. Sensitivität gegenüber 6-AU korreliert sehr oft mit Defekten in der Elongationsphase der RNA Polymerase-II Transkription. Die *tot1-5Δ* Mutanten wurden auf Medien die kein 6-AU, 50µg/ml 6-AU und 50µg/ml 6-AU + Uracil enthielten, getestet. Als Kontrolle diente die 6-AU hypersensitive *dst1Δ* Mutante, welche der Transkriptions-Elongations-Faktor TFIIIS fehlt (Archambault et al. 1992). Wie in der Abb. 9C zu sehen ist, sind die *tot1-5Δ* Stämme verschieden sensitiv gegen 6-AU. Die Stämme *tot1Δ*, *tot3Δ* und *tot4Δ* verhalten sich ähnlich sensitiv wie die *dst1Δ* Kontrolle. Geringere 6-AU Sensitivität zeigen die *tot2Δ* und *tot5Δ* Zellen (Frohloff et al. 2001). Alle *tot1-5Δ* Stämme erholten sich wie die *dst1Δ* Kontrolle, nachdem Uracil in das Medium gegeben wurde. Dieser 6-AU sensitive Phänotyp deutet darauf hin, daß die *TOT1-5* Gene die Transkriptions-Elongation *in vivo* in Anwesenheit von 6-AU beeinflussen. Zusammenfassend führt die *TOT1-5* Gen Inaktivierung zu pleiotropen Effekten in Hefezellen. Es kommt zur Ausprägung der komplexen *tot*-Phänotypen wie der Zymocin- und  $\gamma$ -Toxin-Resistenz, verlangsamtes Wachstum, Thermosensitivität und die Sensitivität gegen Chemikalien wie Calcofluor White, Caffein und 6-Azaurazil beinhaltet (Frohloff et al. 2001). Das Ergebnis, daß die *tot1-5Δ* Stämme die gleiche Phänotypen aufweisen, ist ein möglicher Hinweis, daß die *TOT* Genprodukte gleiche oder ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben. Um zu untersuchen ob sich die bisher festgestellten Phänotypen verändern oder sich verstärken, wenn im gleichen genetischen Hintergrund jeweils zwei *TOT* Gene disruptiert sind, wurden Doppeldeletionen *tot1Δ/tot2Δ*, *tot2Δ/tot3Δ*, *tot2Δ/tot4Δ*, *tot2Δ/tot5Δ*, und *dst1Δ/tot2Δ* konstruiert. Sollten die *TOT* Genprodukte gleichen oder ähnliche Funktionen haben, sollten Doppeldeletionen keine weitere Auswirkung auf die *tot* Phänotypen haben. Die phänotypischen Untersuchungen

wurden wie oben bereits beschrieben durchgeführt. Keiner der bisher festgestellten Phänotypen konnte durch Kombination von zwei *TOT* Disruptionen (*tot1Δ/tot2Δ*, *tot2Δ/tot3Δ*, *tot2Δ/tot4Δ*, *tot2Δ/tot5Δ*, *dst1Δ/tot2Δ*) verstärkt oder verändert werden (Abb. 10). Hier wird das oben erwähnte Ergebnis noch einmal bestätigt, daß die *tot2Δ*, *tot5Δ* und *tot2Δ+tot5Δ* Stämme weniger sensitiv gegenüber dem 6-AU sind (Abb. 9C & 10C). Diese Ergebnisse deutet darauf hin, daß die *TOT1-5* Genprodukte funktionell miteinander verwandt sind und somit ähnliche oder gleiche Funktionen haben.

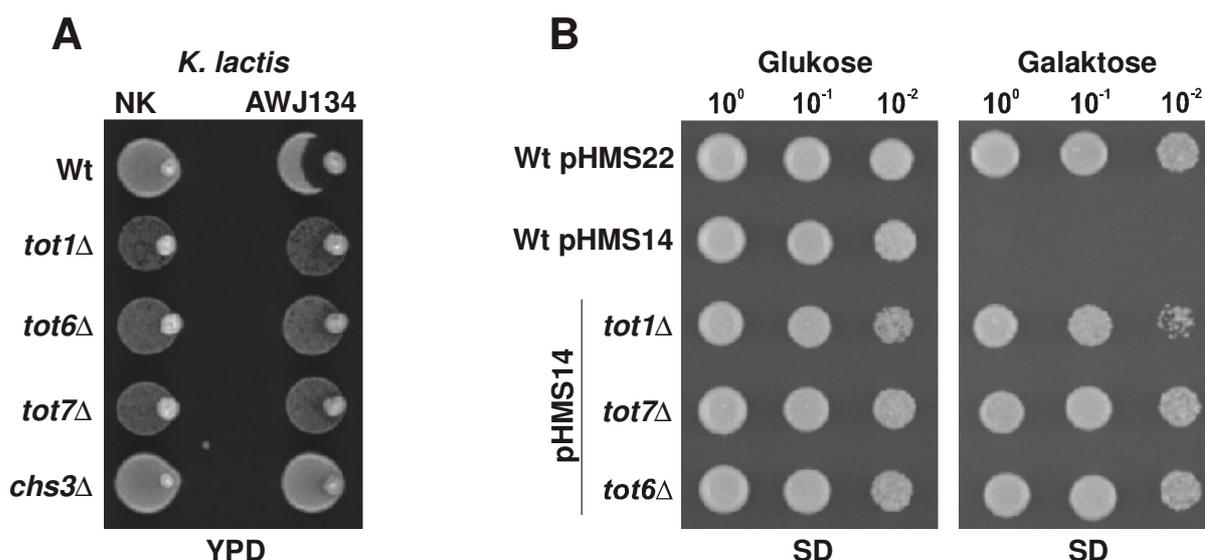


**Abb. 10:** Die Phänotypen der doppel *totΔ* Mutanten. **(A)** Exotoxin Test. Die doppel *totΔ* Mutanten, der LS20 Wt Stamm und der *tot2Δ* Stamm wurden auf eine YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. **(B)** Thermosensitivität (TS). Die doppel *totΔ* Mutanten, der LS20 Wt Stamm und der *tot2Δ* Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen und bei 30°C bzw. 39°C inkubiert. **(C)** 6-Azaurazil (6-AU) Sensitivität. Die doppel *totΔ* Mutanten, der LS20 Wt Stamm und der *tot2Δ* Stamm wurden replika auf SD Platten aufgetragen, die kein 6-AU, 50 μg/ml 6-AU und 50 μg/ml 6-AU+ Uracil enthielten. Die *dst1Δ* Mutante diente als 6-AU hypersensitive Kontrolle. **(D)** Calcofluor White (CW) Sensitivität. Die doppel *totΔ* Mutanten, der LS20 Wt Stamm und der *tot2Δ* Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen, die 50 μg/ml, 100 μg/ml CW und kein CW enthielten. Kein Wachstum zeigt CW Hypersensitivität an.

### 3.3 Disruption der *TOT6/ELP6* und *TOT7/ELP4* Gene

Während an dieser Studie gearbeitet wurde, konnte von zwei weiteren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gezeigt werden, daß der Elongator Komplex aus zwei weiteren Untereinheiten *ELP4/HAP1* und *ELP6/HAP3* besteht (Winkler et al. 2001 & Li et al. 2001). Um zu zeigen, ob die Null-Mutationen dieser

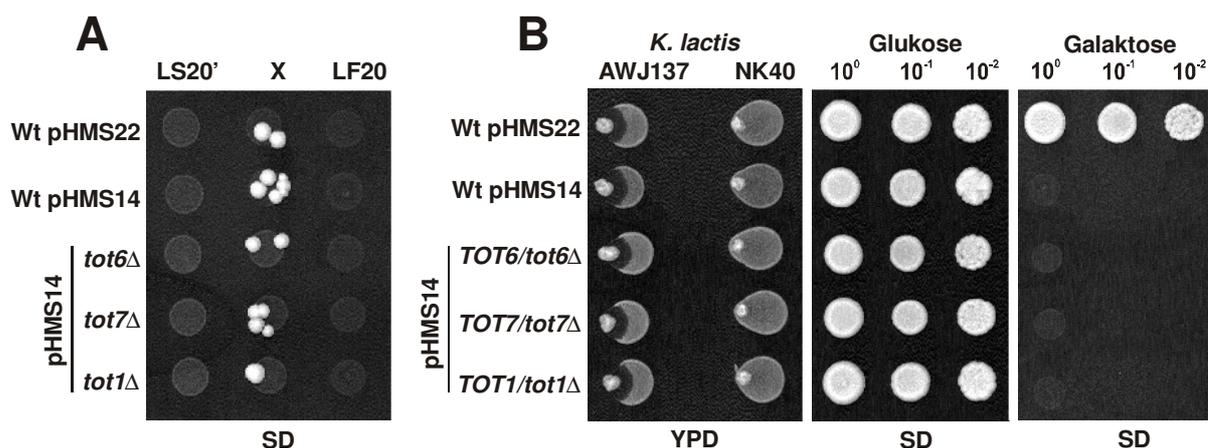
weiteren Elongator Komponenten auch resistent gegen Exotoxin und  $\gamma$ -Toxin sind, wurden diese Gene im LS20' Stamm Hintergrund disruptiert und wie oben beschrieben getestet. Wie die Ergebnisse zeigen, sind die *tot6* $\Delta$  und *tot7* $\Delta$  Mutanten ebenfalls resistent gegen  $\gamma$ -Toxin und Zymocin (Abb. 11) (Jablonowski et al. 2001b). In Anlehnung an die Bezeichnung der *TOT1-5* Gene wurden die Toxin resistenten *ELP4/HAP1* und *ELP6/HAP3* Null-Mutationen zur Unterscheidung von den übrigen *TOT* Genen als *TOT6* und *TOT7* Gene benannt.



**Abb. 11:** Die *tot6* $\Delta$ +*7* $\Delta$  Mutanten sind resistent gegen  $\gamma$ -Toxin und Zymocin. **(A)** Exotoxin Test. Der Wildtyp-LS20 (Wt), die *tot6* $\Delta$ +*7* $\Delta$  Stämme und die Kontrollstämme *tot1* $\Delta$  und *chs3* $\Delta$  wurden auf einer YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Hemmhöfe zeigen Zymocin-Sensitivität, keine Hemmhöfe zeigen Zymocin-Resistenz an. **(B)**  $\gamma$ -Toxin Test. Serielle Verdünnungen des Wildtyp LS20 (Wt), der *tot6* $\Delta$ +*7* $\Delta$  Stämme, und der Kontrollstamm *tot1* $\Delta$  wurden replika auf eine reprimierende Glukoseplatte und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. Kein Wachstum zeigt  $\gamma$ -Toxin Sensitivität an.

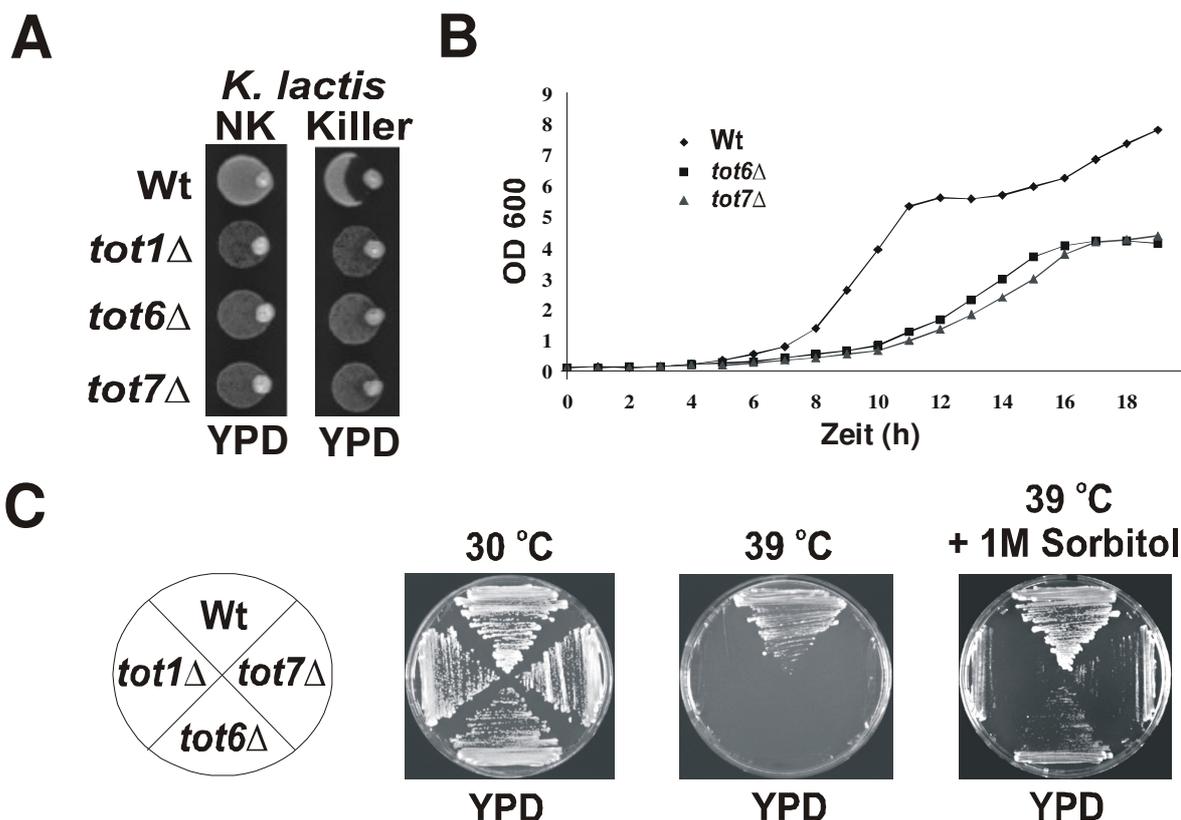
### 3.3.1 Analyse der *tot6* $\Delta$ /*elp6* $\Delta$ und *tot7* $\Delta$ /*elp4* $\Delta$ Phänotypen

Um zu zeigen, ob die Toxin Resistenz der *tot6* $\Delta$  und *tot7* $\Delta$  Null Mutationen ebenfalls dominant oder rezessiv ist, wurden die *tot6* $\Delta$  und *tot7* $\Delta$  Null Mutanten, wie oben beschriebenen mit dem haploiden LF20 Stamm gekreuzt (Abb. 12A) und die diploiden Zellen gegen Exo-Zymocin und  $\gamma$ -Toxin getestet (Abb. 12B). Wie das Ergebnis zeigt, sind die heterozygoten *TOT6/tot6* $\Delta$ +*TOT7/tot7* $\Delta$  diploiden Zellen sensitiv gegenüber dem Exo-Zymocin und dem  $\gamma$ -Toxin (Abb. 12B). Das zeigt, daß sich die heterozygoten *tot6* $\Delta$  und *tot7* $\Delta$  Gene sich in der diploiden Hefezelle rezessiv verhalten.



**Abb. 12:** Hefekreuzung. **(A)** Auf einer Glukoseplatte (Ura<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>) wurden links die haploiden *tot6-7*Δ Null-Mutanten, in der Mitte die gekreuzten *tot6-7*Δ x LF20 *TOT* Wt Zellen und rechts die haploiden LF20 *TOT6-7* Wt Zellen aufgetragen. Kein Wachstum zeigt haploide Zellen an, Wachstum zeigt diploide *TOT6-7/tot6-7*Δ Zellen an. **(B)** Exotoxin und  $\gamma$ -Toxin Test. Die diploiden Wt und *TOT6+7/tot6+7*Δ Zellen wurden auf eine YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Hemmhöfe zeigen Zymocin-Sensitivität, keine Hemmhöfe zeigen Zymocin-Resistenz an.  $\gamma$ -Toxin Test: Serielle Verdünnungen der diploiden *TOT6+7/tot6+7*Δ Stämme wurden replika auf eine reprimerende Glukose- und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. Kein Wachstum zeigt  $\gamma$ -Toxin-Sensitivität an.

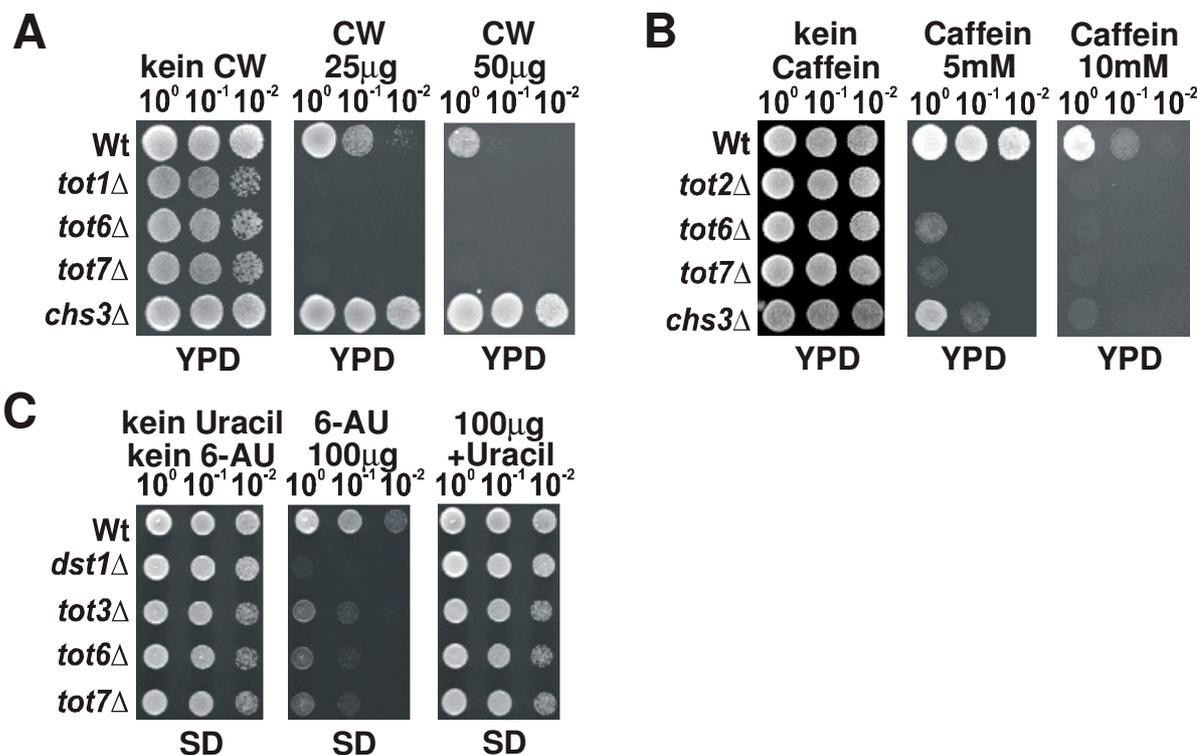
Vergleichbar mit den Beobachtungen an den *tot1-5*Δ Stämmen führt die Deletion der *TOT6* und *TOT7* Gene ebenfalls zu einem verlangsamten Wachstums Phänotyp bei 30°C (Abb. 13B) (Jablonowski et al. 2001b). Die Verdopplungszeit der *tot6*Δ und *tot7*Δ Zellen verlängert sich um den Faktor 1,7 was zu einer reduzierten Wachstumsrate von  $\mu=0,5$  (Wildtyp) nach  $\mu = 0.3$  (*tot6*Δ & *tot7*Δ) führt (Abb. 13B) (Jablonowski et al. 2001b). Des weiteren führt die Deletion der *TOT6* und *TOT7* Gene ebenfalls zur Termosensitivität über 38°C. Dieser thermosensitive Phänotyp kann teilweise wieder durch die Zugabe von 1M Sorbitol im Wachstumsmedium aufgehoben werden (Abb. 13C) (Jablonowski et al. 2001b). Das zeigt, daß auch die *TOT6* und *7* Gene bei einer Temperatur über 38°C essentiell für die Hefezelle sind. Um zu untersuchen, ob die *tot6*Δ und *tot7*Δ Deletionen auch einen Einfluß auf die Zellwand Zusammensetzung haben, wurde das Wachstum der *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämme in Gegenwart von Calcofluor White und Caffein wie oben beschrieben getestet. Im Gegensatz zu dem Wildtyp LS20 und der Calcofluor White resistenten Kontrolle *chs3*Δ, sind die *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämme wie die *tot1*Δ Kontrolle hypersensitiv gegenüber Calcofluor White (Abb. 14A) (Jablonowski et al. 2001b). Dies läßt auf einen Defekt in der Zellwand schließen, der mit einer *TOT6* und *TOT7* Deletion verbunden ist. Ähnlich wie *tot2*Δ Zellen sind die *tot6*Δ und *tot7*Δ Mutanten hypersensitiv gegen Caffein (Abb. 14B) (Jablonowski et al. 2001b).



**Abb. 13:** Die Deletion der *TOT6* und *TOT7* Gene führt zu einem verlangsamten Wachstum und zur Thermosensitivität. **(A)** Exotoxin Test. Wildtyp-LS20 (Wt) und die *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämme wurden auf einer YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Kein Hemmhof zeigt Zymocin-Resistenz an. **(B)** Wachstumskurve der *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm LS20. Das Wachstum der Stämme wurde in YPD Vollmedium (2% Glukose) durchgeführt. Das Wachstum wurde bei einer OD<sub>600</sub> und über eine Periode von 16h Stunden gemessen. **(C)** Thermosensitivität (TS). Die *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämme wurden auf YPD Platten ausgestrichen und bei 30 °C und 39 °C inkubiert. Kein Wachstum zeigt TS an.

Dieser hypersensitive Phänotyp deutet wie schon für die *tot1-5*Δ Zellen an, daß die Zellwand-Integrität auch bei den *tot6*Δ und *tot7*Δ Stämmen betroffen ist. Wie bei den *tot1-5*Δ Zellen, wurden auch die Auswirkung der *tot6*Δ und *tot7*Δ Mutanten auf den Transkriptionsprozeß mit Hilfe der Indikatorchemikalie 6-Azaurazil (6-AU) überprüft. Die *tot6*Δ und *tot7*Δ Mutanten zeigen die gleiche Sensitivität gegen 6-AU wie die *tot3*Δ Kontrolle, und nicht so ausgeprägt wie die *dst1*Δ Mutante die keinen TFIIIS Transkriptions-Elongations-Faktor besitzt (Archambault et al. 1992). (Abb. 14C) (Jablonowski et al. 2001b). Dieser Phänotyp deutet darauf hin, daß die *TOT6* und *TOT7* Genprodukte *in vivo* eine Funktion in der Transkriptions-Elongation haben. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den 6-AU Ergebnissen der *tot1-5*Δ Zellen überein. Die Elongator-Aufreinigung mit der elongierenden Form der RNA Polymerase-II läßt ebenfalls eine Funktion des Elongator-Komplex bei der Transkription vermuten (Otero et al. 1999). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Verlust von *TOT6* und *TOT7* den gleichen pleiotropen Effekt induziert wie die der anderen

Elongator-Mutationen und kommt durch die Phänotypen wie Zymocin- und  $\gamma$ -Toxin-Resistenz, verlangsamtes Wachstum, Thermosensitivität und die Sensitivität gegenüber den Chemikalien Calcofluor White, Caffein und 6-Azaurazil zum Ausdruck. Dies ist möglicherweise ein Hinweis, daß der *TOT*/Elongator vielleicht das Ziel für die Wirkung des *K. lactis* Zymocin ist.

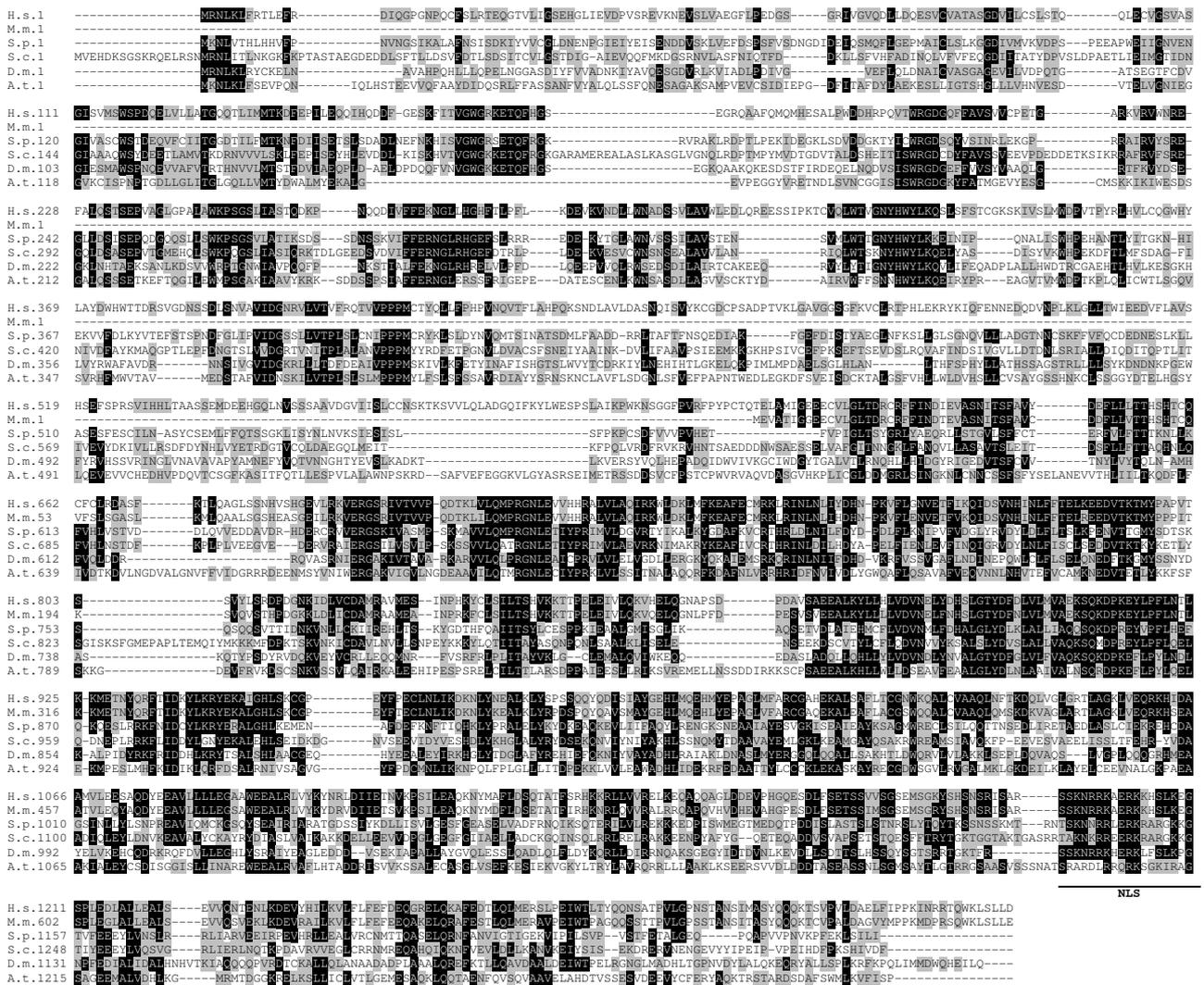


**Abb. 14:** Die *tot6Δ* und *tot7Δ* Mutationen sind hypersensitiv gegen CW, Caffein und 6-AU. **(A)** Calcofluor White (CW) Sensitivität. Serielle Verdünnungen der *tot6Δ* und *tot7Δ* Stämme, des LS20 Wt Stammes und der CW resistente *chs3Δ* Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen, die 25µg/ml, 50µg/ml und kein CW enthielten. Kein Wachstum zeigt CW Hypersensitivität an. **(B)** Caffein Sensitivität. Die *tot2Δ*, *tot6Δ*, *tot7Δ* Stämme, der LS20 Wt Stamm und der *chs3Δ* Stamm wurden replika auf YPD Platten aufgetragen, die 5mM und 10mM Caffein enthielten. Kein Wachstum zeigt Caffein-Sensitivität an. **(C)** 6-Azaurazil (6-AU) Sensitivität. Die *tot3Δ*, *tot6Δ*, *tot7Δ* Stämme, der LS20 Wt Stamm und der *dst1Δ* Stamm wurden replika auf SD Platten aufgetragen, die kein 6-AU, 100µg/ml 6-AU und 100µg/ml 6-AU+ Uracil enthielten. Die *dst1Δ* Mutante diente als 6-AU hypersensitive Kontrolle.

### 3.4 Homologe Totp Proteine

Mit Hilfe der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *TOT* Genprodukte und einer Genbank-Suche konnten homologe Totp Proteine in allen wichtigen Modell-Organismen wie *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Cenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, und in *Schizosaccharomyces pombe* gefunden werden. Von allen Totp Proteinen ist das Tot1p Protein mit 1349 Aminosäuren das größte Protein. Das Tot1p Protein von *S. cerevisiae* ist mit der Aminosäuresequenz zu 28% identisch und zu 46% ähnlich zum menschlichen

Tot1p (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*). Ansonsten bewegen sich die Homologien von Tot1p zwischen 37% identisch und 55% ähnlich (*S. cerevisiae* und *S. pombe*), 25%/43% (*S. cerevisiae* und *D. melanogaster*), 23%/42% (*S. cerevisiae* und *A. thaliana*) und 16%/28% (*S. cerevisiae* und *M. musculus*) (siehe Anhang). In der C-terminalen Region des Tot1p Proteins von *S. cerevisiae* befindet sich im Bereich der Aminosäuren 1228-1246, eine NLS-Sequenz (= Kern-Lokalisierungs-Sequenz) (Dingwall & Laskey 1991).



**Abb. 15:** Alignment der Tot1p Aminosäuresequenzen der Organismen von *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

Trotz der vielen konservierten Regionen im Tot1p Protein gibt es keine weiteren bekannten Proteinmotive (Abb. 15). Aus dem Grund der Übersichtlichkeit ist hier im Ergebnisteil nur das Alignment der Tot1p und Tot4p Proteine dargestellt. Alle

anderen Alignments und die dazugehörigen Sequenzidentitäts-Tabellen (einschließlich der von Tot1p und Tot4p) sind im Anhang abgedruckt.

Eine Analyse der Tot2p Proteinsequenz hat ergeben, daß sich im Tot2p Protein acht WD40 Protein-Protein Bindedomänen befinden (Fellows et al. 2000). Die Homologien des Tot2p Protein in abnehmender Reihenfolge sind zwischen 35% identisch und 56% ähnlich (*S. cerevisiae* und *S. pombe*), 31%/51% (*S. cerevisiae* und *D. melanogaster*), 30%/51% (*S. cerevisiae* und *M. musculus*), 30%/50% (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*) 30%/48% (*S. cerevisiae* und *A. thaliana*) und 28%/48% (*S. cerevisiae* und *C. elegans*) (siehe Anhang). Auffällig ist, daß die Homologien zwischen den verschiedenen Organismen nahezu alle bei 30% liegt.

Von allen Totp Proteinen weist das Tot3p Protein die höchste Konservierung auf. Die Homologien vom Tot3p Protein sind in abnehmender Reihenfolge zwischen 76% identisch und 86% ähnlich (*S. cerevisiae* und *S. pombe*), 73%/85% (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*) 72%/83% (*S. cerevisiae* und *D. melanogaster*), 71%/83% (*S. cerevisiae* und *M. musculus*), 69%/81% (*S. cerevisiae* und *C. elegans*) und 59%/72% (*S. cerevisiae* und *A. thaliana*) (siehe Anhang). Das Tot3p Protein ist eine Histonacetyltransferase (HAT), die mit Gcn5p aus *S. cerevisiae* verwandt ist. Im C-terminalen Bereich von Tot3p liegen die drei HAT-Motive A (489-524), B (530-550) und D (448-463) welche zu der Gcn5 Familie gehört (Wittschieben et al. 1999). Jedoch ist dieses HAT-Motiv nur 102 Aminosäuren lang und fällt nicht in den Hauptteil der konservierten Bereiche, die insgesamt bis zu 73% = 404 Aminosäuren (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*) des Gesamtproteins ausmachen.

Das Tot4p Protein konnte in den meisten der bisher sequenzierten Organismen gefunden werden. Es konnte sogar im Genom von *Methanococcus janaschii*, ein Archaeobakterium, ein Tot4p homologes Protein gefunden werden (Abb. 16) (Bult et al. 1996). In abnehmender Reihenfolge ist das Tot4p Protein 38% identisch und 57% ähnlich (*S. cerevisiae* und *S. pombe*), 32%/50% (*S. cerevisiae* und *D. discoideum*), 30%/49% (*S. cerevisiae* und *A. thaliana*), 28%/48% (*S. cerevisiae* und *D. melanogaster*), 25%/43% (*S. cerevisiae* und *M. musculus*), 24%/45% (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*), 24%/41% (*S. cerevisiae* und *G. lamblia*), und 21%/37% (*S. cerevisiae* und *M. janaschii*). Die Region mit der höchsten Homologie befindet sich in dem aminoterminalen Bereich der ein P-Loop-Motiv enthält (Aminosäurereste 8-16 im Tot4p). P-Loop-Motive binden ATP oder GTP. Diesem Bereich schließt sich eine weitere konservierte Region an, deren Funktion unbekannt ist (Aminosäurereste 61-

100 in Tot4p). Ob die Tot4p homologen Proteine von *H. sapiens* bis zum *M. janaschii* Archaeobakterium auch funktionell homolog sind, ist unbekannt.

```

D.d.1  ---MPLIVLISGPPCSGKTRAKE-----LHYHFTN-----LGGKVLLINEESLLINKNEGYKDSLTKMTSSSLKGATDRNLSKDTIV
S.c.1  ---MPLVLFVGYPCSGKTRIAKH-----LVQLLOSKIDATPSLTKYSITVHSDESLGIKHSDYITSQDRKLRSEIISAVKRDLSKKNKIV
G.l.1  ---MPLLLLFQPLDICKSRVAAQ-----LQQEAVAR-----EDDSVVLDLG---LMGCTSKDLTENIG--TVRTRLRQLVAQYLSKERLV
M.j.1  -MGDMLLIIITGLPVGKSTFSRN-----LAKILSK-----NNIDVIVLGSDDLRESFPVWKEKYEFPFKRSTYR--LIDSALKKYYW

D.d.76  LPSLSNYIRGVRYPDYCTARAAGTRLLVLYCNP-RDLAKKNN---QERDQSVAYSEK-LLELITNRFEPNPKNRFWDSPEFTLEP----QHTLPHELLKTLFEVQE
S.c.83  IVDLSNYIRGVRYPDYCTARAAGTRLLVLYCNP-RDLAKKNN---QERDQSVAYSEK-LLELITNRFEPNPKNRFWDSPEFTLEP----QHTLPHELLKTLFEVQE
G.l.173  IVDHTNHTSRERYDFTARERRTNCIVSCYTDPRMDDAELSMCPENPLVGEERLWYTPRYADICSRFESLLVGAQADQPVFSASAS----POLILDYLYNVVKAPGK
M.j.76  IVDVDTNYNSMRDLINIAKKYKNKYALTYLKAS-LDVLIRRN-----IERGEKIPNEVKKMYERFDEEGKKYKWDPEFLIEDTT---KDIDFNETAKKLIKESK

D.d.175  LR-----LKNYATQSLSLSPA-NFVHELETKTQETTSVSDALQSS-----MVGDTYTKVPGTEKRVVTHSKLN----LVELRNRRGFY
S.c.184  SAKNSGHNDPLSKGLQKPN SATVLKFPASQS-NFIQVLDIETSKIIKTMNHIKSLTSGGVSNGTRV---IVSEGITDINDGCFVLDLPIGNV-VTLAQLQRIRRFQFI
G.l.178  AG-----LKSILSAATDSVALSSSEAAPEVTRRITKDIVATLFNQAASGT-----ATSMMLTVYPPSISVALPYATIP---TAQLQSLLRRSFL
M.j.173  EI-----LKFYVLEENKKNKNNNISDKIDKETRKTIVSEYIKS-----KPKLQKDK-----LKEVVEERKEFL

D.d.248  KFAQ-----LHPPQPHLADSEVDFELNSSSN-----
S.c.288  NFNK-----LIRDIDQDRIGPLFADYLNKLN-----
G.l.259  QHPP-----DFPHVSEGSAAGVFAQYLSEKLQLVVEYSSA
M.j.228  KKKK-----KMEEVADARVLKPKKLLNSY-----

```

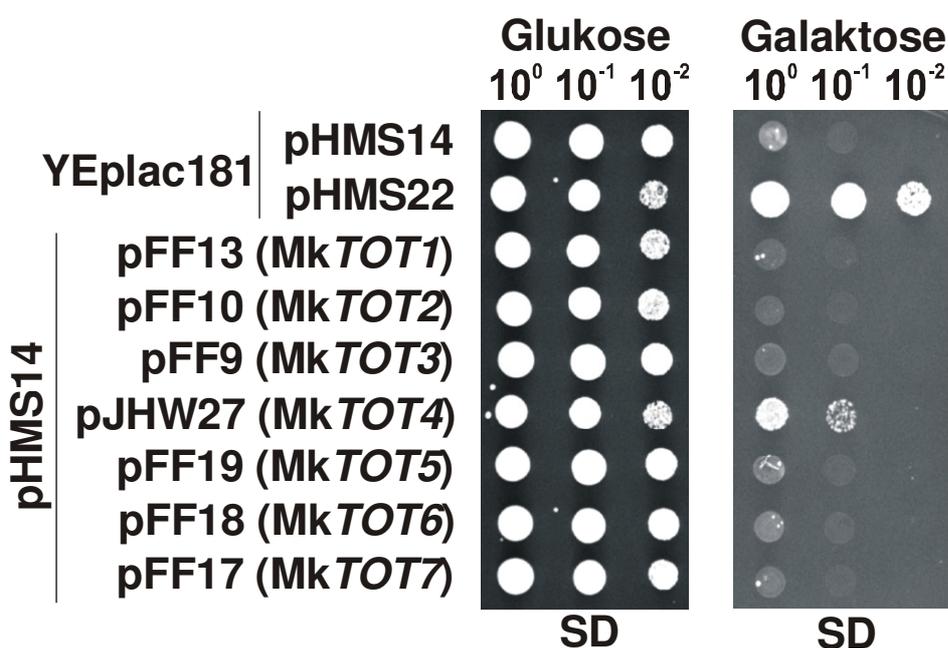
**Abb. 16:** Alignment der Tot4p Protein Sequenz der Organismen von D.d. = *Dictyostelium discoideum*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*, G.l. = *Giardia lamblia*, M.j. = *Methanococcus jannaschii*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

Von allen untersuchten Tot1-7p Proteinen bilden *Tot5p* und *Tot6p* Proteine eine Ausnahme. Von dem *Tot5p* Protein gibt es nur noch in dem Organismus *S. pombe* ein homologes Protein. Das *Tot6p* Protein kommt nur unter den Modell-Organismen in *S. cerevisiae* vor. Das *Tot5p* Protein von *S. pombe* ist zu 26% identisch und 46% ähnlich zu *S. cerevisiae*. Erst zu dem *Tot7p* Protein von *S. cerevisiae* gibt es wieder in allen wichtigen Modell-Organismen ein homologes Protein. Die Konservierung von *Tot7p* ist von allen Totp Proteinen am schwächsten. Sie beträgt 24%/40% (*S. cerevisiae* und *M. musculus*), 23%/41% (*S. cerevisiae* und *S. pombe*), 20%/33% (*S. cerevisiae* und *H. sapiens*) und 19%/37% (*S. cerevisiae* und *A. thaliana*). Die Organismen *C. elegans* und *D. melanogaster* besitzen keine signifikant homologe *Tot7p* Proteine (siehe Anhang).

### 3.5 Überexpression der *TOT* Gene

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß die Überexpression des *TOT4/KT112* Gens von einem Multikopie-Plasmid zur Resistenz gegen  $\gamma$ -Toxin führt (Butler et al. 1994). Um die Auswirkung der Überexpression von *TOT1-7* Gene zu untersuchen, wurden die *TOT1-7* Gene mit ihren natürlichen Promoter mittels PCR aus dem Genom amplifiziert. Für die Überexpression wurden die Gene in dem Multikopie Vektor YEplac kloniert (Gietz & Sugino 1988). Diese *TOT1-7* Multikopie Plasmide wurden dann in den LS20 Stamm mit dem pHMS14 Plasmid transformiert, in dem das  $\gamma$ -Toxin unter der Kontrolle des UAS<sub>GAL1</sub> Promotors steht. Nach der

Transformation wurden sie auf Sensitivität gegen  $\gamma$ -Toxin getestet (Abb. 17). Als Kontrollen dienten pHMS14 und pHMS22 tragende Zellen, die jeweils mit dem leeren Vektor YEplac181 transformiert wurden. Wie aus der Abb. 17 hervorgeht ist, führt nur die erhöhte Kopienzahl des *TOT4* Gens zu Resistenz gegen  $\gamma$ -Toxin, die erhöhte Kopienzahl der *TOT1-3* und der *TOT5-7* Gene ist ohne Wirkung (Abb. 17) (Fichtner et al. 2001a). Jedoch ist das Wachstum mit der erhöhten Kopienzahl des *TOT4* Gens verglichen mit dem Kontrollstamm LS20, der mit dem Leervektor pHMS22 transformiert wurde und somit kein  $\gamma$ -Toxin trägt, reduziert (Abb. 17).

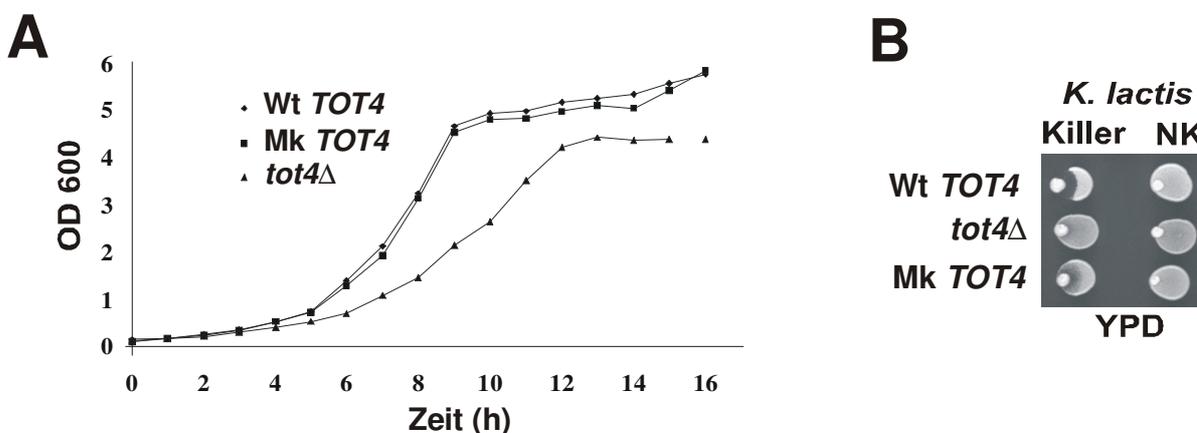


**Abb. 17:** Wirkung der *TOT* Gendosis auf die  $\gamma$ -Toxin-Sensitivität. Die *TOT1-7* Multikopie (Mk) Vektoren wurden in den LS20 Stamm transformiert mit dem pHMS14 Plasmid, der das  $\gamma$ -Toxin Gen unter Gal1 Kontrolle trägt. Serielle Verdünnungen wurden replika auf eine reprimierende Glukose- und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert. Kein Wachstum zeigt  $\gamma$ -Toxin-Sensitivität an.

### 3.6 Phänotypische Analyse erhöhter *TOT4* Gendosis

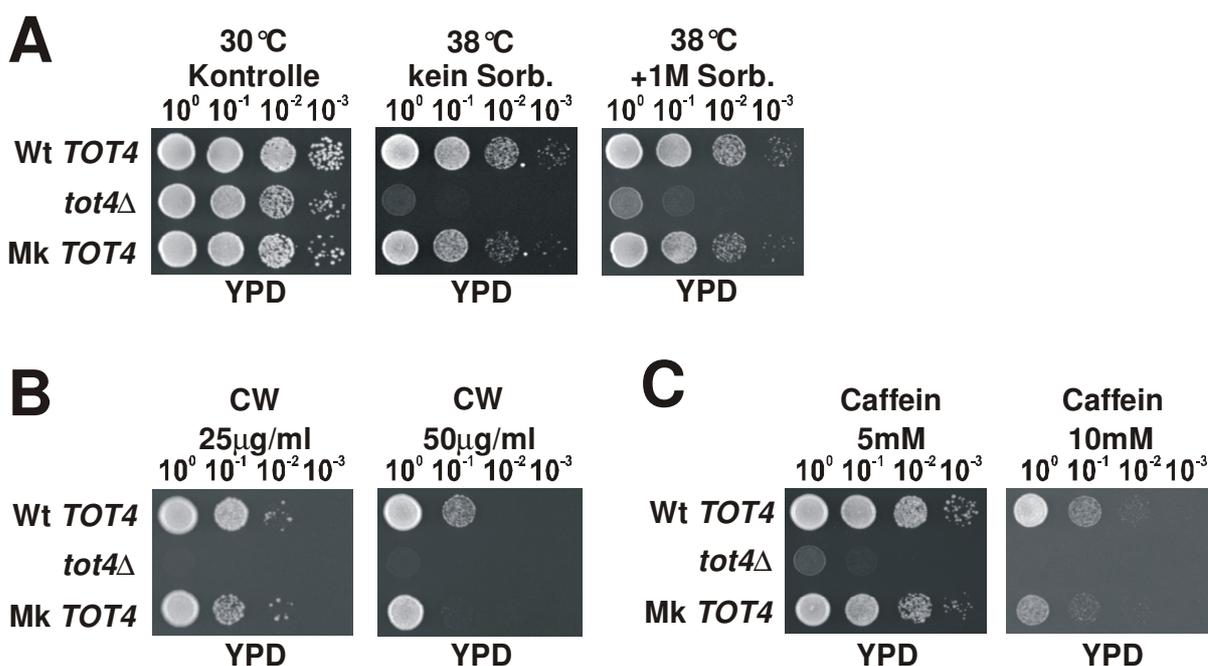
Um zu analysieren, wie das Tot4p Protein in die Zymocin-Wirkung eingebunden ist, wurde die Auswirkung der *TOT4* Überexpression auf die Expression anderer *tot* Phänotypen näher charakterisiert und mit dem Wildtyp sowie mit der Null-Mutation des *TOT4* Gens verglichen. Die Erhöhung der *TOT4* Gendosis hat kaum eine Auswirkung auf das Wachstum und ist nicht unterscheidbar vom *TOT4* Wildtyp. Im Gegensatz dazu wächst der *tot4Δ* Stamm deutlich langsamer (Abb. 18A) (Fichtner et al. 2002a). Gegen Exotoxin getestet, führt *TOT4* in Multikopiezahl zur Resistenz. Die Erhöhung der *TOT4* Kopienzahl führt zur signifikanten Reduzierung der Zymocin Sensitivität. Dieser Resistenz-Phänotyp verhält sich intermediär zum Zymocin

sensitiven Phänotyp vom *TOT4* Wildtyp und der ausgeprägten Resistenz von *tot4Δ* Zellen (Abb. 18B) (Fichtner et al. 2002a).



**Abb. 18:** Die Phänotypen der erhöhten Gendosis von *TOT4* (**A**) Wachstumskurve der Wildtyp Einzelkopie von *TOT4*, der Multikopienzahl (= Mk) von *TOT4* und der Nullmutante *tot4Δ*. Das Wachstum der Stämme wurde in YPD Vollmedium (2% Glukose) durchgeführt. Das Wachstum wurde bei einer OD<sub>600</sub> und über eine Periode von 16h Stunden gemessen. (**B**) Exotoxin Test. Die Stämme wurden gegen das *K. lactis* Killertoxin getestet, links der Killerstamm AWJ137, rechts der Nicht-Killerstamm NK40. Kein Hemmhof zeigt Resistenz an.

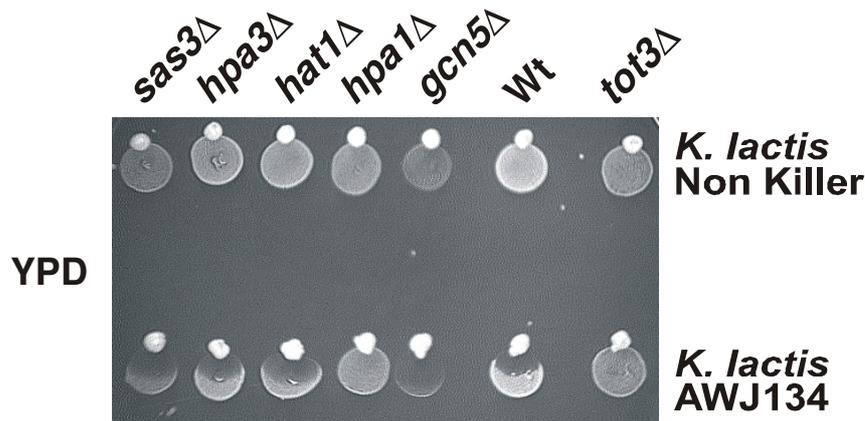
Einen ähnlichen intermediären Phänotyp zeigt *TOT4* in Multikopie im  $\gamma$ -Toxin Test. Die Erhöhung von der *TOT4* Kopienzahl führt zum Schutz gegen  $\gamma$ -Toxin, ist aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der *TOT4* Deletion. Die Lebensfähigkeit des *tot4Δ* Stamms ist in der Gegenwart des  $\gamma$ -Toxins nicht unterscheidbar von dem Kontrollstamm der das Plasmid pHMS22 trägt ohne das  $\gamma$ -Toxin (Fichtner et al. 2002a). Die erhöhte Kopienzahl von *TOT4* wirkt sich kaum auf die Thermosensitivität aus, wohingegen die *tot4Δ* Null-Mutation nicht mehr lebensfähig ist. Auch durch die Zugabe von 1M Sorbitol in das Medium ist die Thermosensitivität der *tot4Δ* Null Mutation nicht beeinflussbar (Abb. 19A) (Fichtner et al. 2002a). Das Auftreten eines intermediären *tot* Phänotyps in Abhängigkeit von der *TOT4* Kopienzahl, zeigt sich auch bei der Sensitivität gegen Calcofluor White und Caffein (Abb. 19B & C) (Fichtner et al. 2002a). Die *TOT4* Multikopie Zellen verhalten sich bedeutend weniger sensitiv gegen Calcofluor White und Caffein als die *tot4Δ* Null-Mutation, aber auch weniger resistent als der Wildtyp (Abb. 19B & C) (Fichtner et al. 2002a). Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen der Schluß gezogen werden, daß die Erhöhung der *TOT4* Kopienzahl zur Resistenz gegen Exotoxin und  $\gamma$ -Toxin führt und die Toleranz gegen Calcofluor White und Caffein leicht herabsetzt. Dieser abgeschwächte *tot* Phänotyp unterscheidet sich deutlich von allen anderen *tot1-7Δ* Zellen.



**Abb.19:** Die erhöhte Gendosis von *TOT4* führt zu einem abgeschwächten *tot*-Phänotyp. **(A)** Temperatursensitivität (TS). Serielle Verdünnungen des *TOT4* Wildtyps, der Multikopienzahl von *TOT4* und der Nullmutante *tot4Δ* wurden auf YPD Platten mit & ohne Sorbitol aufgetragen und bei 30 °C und 38 °C inkubiert. Kein Wachstum zeigt TS an. **(B)** Calcofluor White (CW) Sensitivität. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf YPD Platten aufgetragen, die 25 µg/ml und 50 µg/ml CW enthielten. Kein Wachstum zeigt CW Sensitivität an. **(C)** Caffein Sensitivität. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf YPD Platten replika aufgetragen, die 5mM und 10mM Caffein enthielten. Kein Wachstum zeigt Caffein-Sensitivität an.

### 3.7 Die HAT-Aktivität des Tot3p Proteins

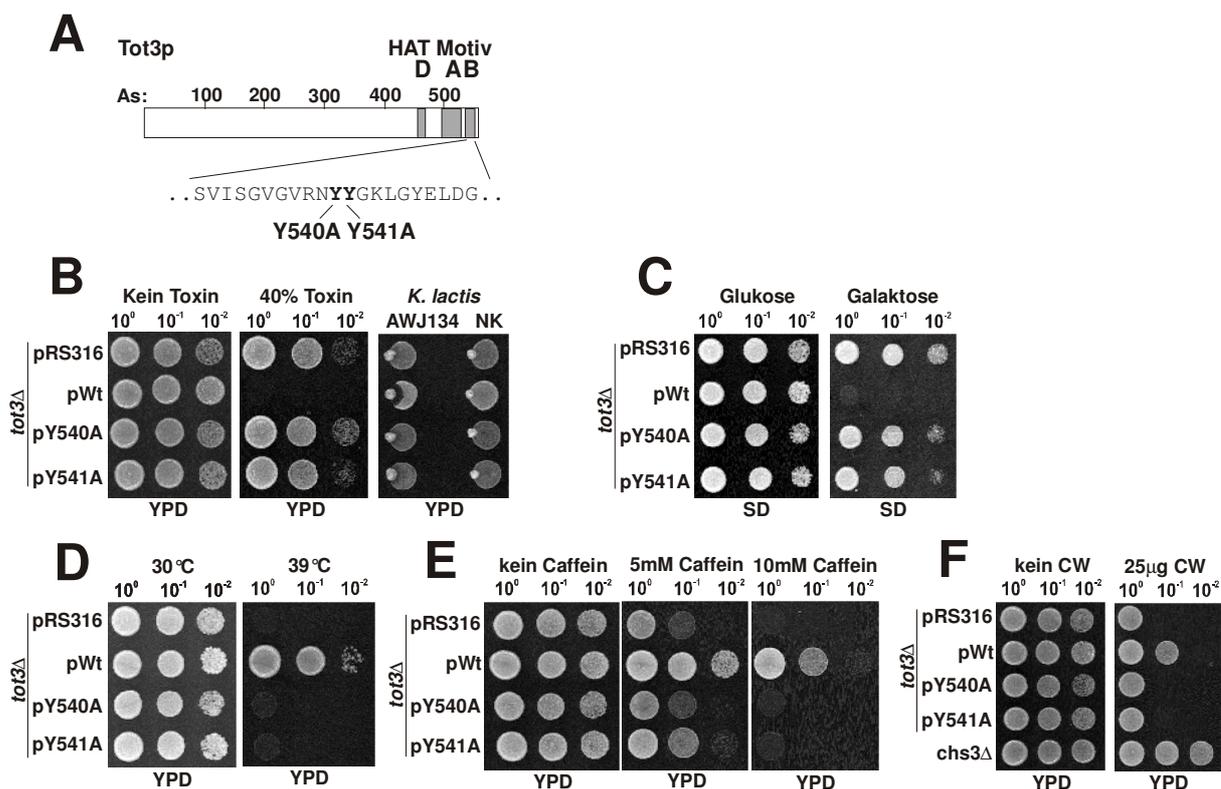
Parallel zu dieser Studie konnte *TOT3/ELP3* als ein transkriptional relevantes Gen identifiziert werden, dessen Produkt mit RNA Polymerase-II interagiert und eine Histon-Acetyltransferase (HAT) Aktivität besitzt (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Wittschieben et al. 2000; Fellows et al. 2000). Im Genom von *S. cerevisiae* gibt es mehrere HAT-Gene. Um herauszufinden, ob die Histon-Acetylierung für die Zymocin-Wirkung benötigt wird, wurden HAT-Disruptionen in *GCN5*, *SAS3*, *HPA1*, *HPA3* and *HAT1* (Kleff et al. 1995; Brownell et al. 1996; Reifsnnyder et al. 1996; Brown et al. 2000) auf Resistenz gegen Exotoxin überprüft. Wie in der Abb. 20 zu sehen ist, sind alle HAT-Disruptanten außer *hpa1Δ*, ein Isoallel von *TOT3/ELP3*, sensitiv gegen Zymocin (Frohloff et al. 2001). Das zeigt, daß speziell die mit Tot3p/Elp3p verbundene HAT-Aktivität für die Zymocin-Wirkung benötigt wird. Die anderen, nicht mit dem Elongator verbundenen HATs, sind für die Zymocin-Wirkung entbehrlich.



**Abb. 20:** Die Wirkung der HAT-Gen Disruptionen auf die Zymocin-Sensitivität. Die HAT Deletionsstämme *gcn5Δ*, *sas3Δ*, *tot3Δ/hpa1Δ*, *hpa3Δ*, *hat1Δ*, und *tot3Δ/hpa1Δ* wurden auf Exotoxin Resistenz getestet. Die Stämme wurden auf eine YPD Platte aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 (unten) und dem Nicht-Killerstamm NK40 (oben) inokuliert. Hemmhöfe gegen den *K. lactis* Killerstamm zeigt Zymocin Sensitivität an. Nur die Deletion des *tot3Δ/hpa1Δ* Gens führt zur Resistenz gegen Zymocin.

### 3.7.1 Einfluß der HAT-Aktivität von Tot3p auf die *tot*-Phänotypen

Um zu überprüfen, ob die HAT-Aktivität von Tot3p für die  $\gamma$ -Toxin Wirkung benötigt wird, wurden zwei *TOT3/ELP3* Allele getestet, die im B-Motiv der katalytischen HAT-Domäne an zwei konservierten Positionen Tyrosin/Alanin Substitutionen (Y540A und Y541A) besitzen (Abb. 21A). Diese Substitutionen reduzieren ihre enzymatische Aktivität auf <25% (Y540A) und ~35% (Y541A) der Wildtyp Elp3p HAT-Aktivität (Wittschieben *et al.*, 2000). Die mutierten *TOT3* Allele (pY540A, pY541A und pWtELP3) wurden unter ihren natürlichen Promotor auf ein Plasmid kloniert und in einen *tot3Δ* Stamm transformiert, der das pHMS14 Plasmid zur  $\gamma$ -Toxin Expression trug. Die erhaltenen Stämme wurden dann auf Komplementation der *tot3Δ* vermittelten  $\gamma$ -Toxin Resistenz getestet. Beide mutierten Allele, Y540A und Y541A, sind nicht in der Lage die  $\gamma$ -Toxin Resistenz des *tot3Δ* Stamms zu komplementieren (Abb. 21B & C). Das zeigt, daß die katalytische HAT-Aktivität des *TOT3* Gens für die Zymocin-Wirkung notwendig ist (Abb. 21B & C). Eine weitere Überprüfung der Phänotypen zeigte, daß die zwei Mutationen in der HAT-Domäne von Tot3p verantwortlich sind für sämtliche *tot*-Phänotypen, wie verlangsamtes Wachstum, TS über 38°C, Caffein Hypersensitivität und Calcofluor-White Sensitivität (Abb. 21D, E, F). Damit konnte gezeigt werden, daß sämtliche *tot*-Phänotypen auf die reduzierte HAT-Aktivität zurückzuführen sind. Die Tot3p HAT-Aktivität ist demnach essentiell für die Sensitivität der Hefezelle gegen  $\gamma$ -Toxin und Zymocin.

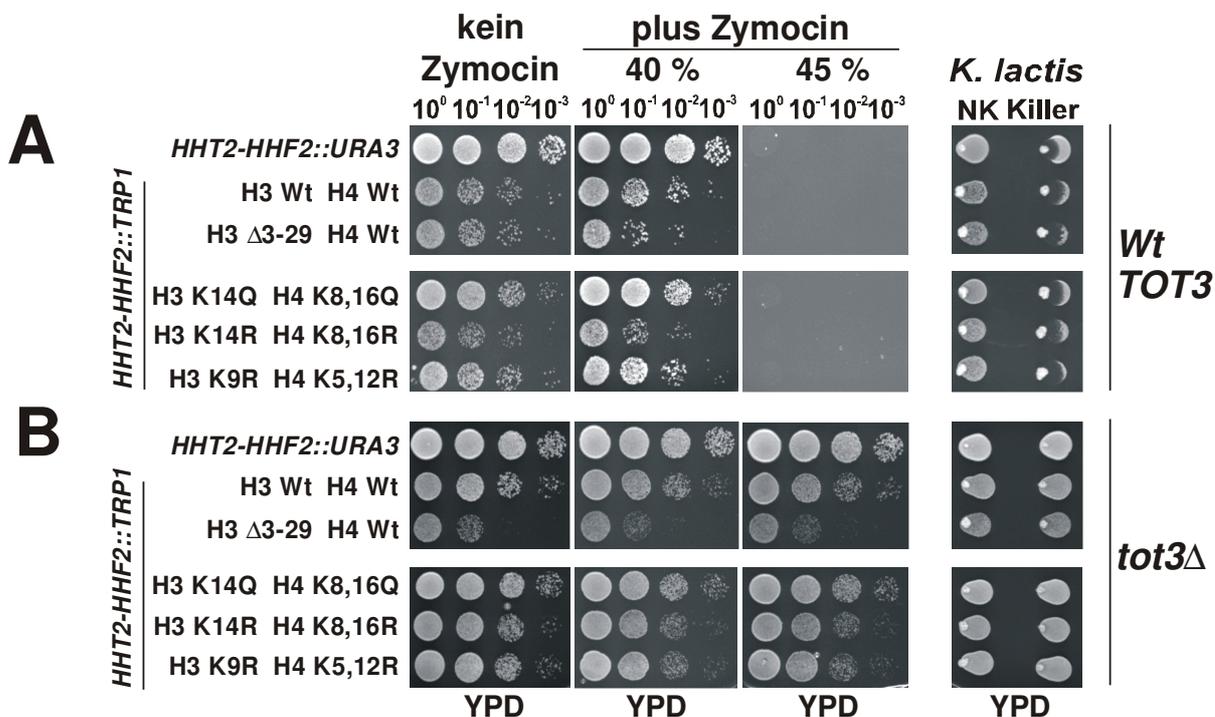


**Abb. 21:** Die Phänotypen der reduzierten HAT-Aktivität von Tot3p. Die HAT-Aktivität ist essentiell für die  $\gamma$ -Toxin Wirkung. **(A)** Schematische Darstellung der Punktmutationen Y540A und Y541A in der HAT-B Domäne von *TOT3* **(B)** Zymocin Test. Serielle Verdünnungen wurden auf eine 40% killertoxinhaltige YPD Platte aufgetragen. Exotoxin Test. Die Transformanten wurden auf eine YPD Platten aufgetragen und mit dem *K. lactis* Killerstamm AWJ134 und dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. **(C)**  $\gamma$ -Toxin Test. Serielle Verdünnungen wurden replika auf eine reprimierende Glukose- und eine induzierende Galaktoseplatte aufgetragen. **(D)** Thermosensitivität (TS). Serielle Verdünnungen wurden auf YPD Platten replika aufgetragen und bei 30°C und 38°C inkubiert. **(E)** Caffein Sensitivität. Serielle Verdünnungen wurden auf YPD Platten replika aufgetragen, die 5mM und 10mM Caffein enthielten. **(F)** Calcoflour White (CW) Sensitivität. Serielle Verdünnungen wurden auf YPD Platten replika aufgetragen, die kein und 25 $\mu$ g/ml CW enthielten.

### 3.7.2 N-terminale Histon H3 und H4 Mutationen

Mutationen im N-Terminus der Histone H3 und H4 kombiniert mit der Deletion des HAT-Gens *TOT3* führen zu synthetischen Defekten wie gesteigerte Thermosensitivität und in einem Fall auch zur Letalität (Wittschieben et al. 2000). Die Kombination anderer HAT Gen-Deletionen wie *gcn5 $\Delta$*  mit *tot3 $\Delta$* , führt zu Phänotypen, die auf eine Funktion des Elongators im Chromatin hindeuten (Wittschieben et al. 2000). Aus diesen Grund wurde untersucht, ob die Histon-Acetylierung durch den Elongator wichtig für die Zymocin-Wirkung ist. Dazu wurden in den zwei genetischen Stämmen *tot3 $\Delta$*  und *TOT3* Wildtyp die endogenen Histon H3 und Histon H4 Genkassetten (*HHT1-HHF1* und *HHT2-HHF2*) deletiert. Um das Überleben der Zellen zu gewährleisten, wurden die Histon H3 und Histon H4 Wildtyp-Gene *HHT1* und *HHF2*, auf einem *URA3-CEN*-Plasmid (Gietz & Sugino 1988) in die Zellen transformiert (Wittschieben et al. 2000). Anschließend wurden verschiedene mutierte

Formen der Histon H3 und H4 Gene (*HHT2-HHF2*) (Zhang et al. 1998) auf einem *TRP1* markierten Plasmid in die Zellen transformiert. Danach konnten die *URA3* markierten Histon H3 und H4 Wildtyp Gene *HHT2* und *HHF2* durch 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) segregiert werden. Die transformierten Zellen wurden dann auf Exotoxin Resistenz/Sensitivität getestet. (Abb. 22) (Jablonowski et al. 2001b).



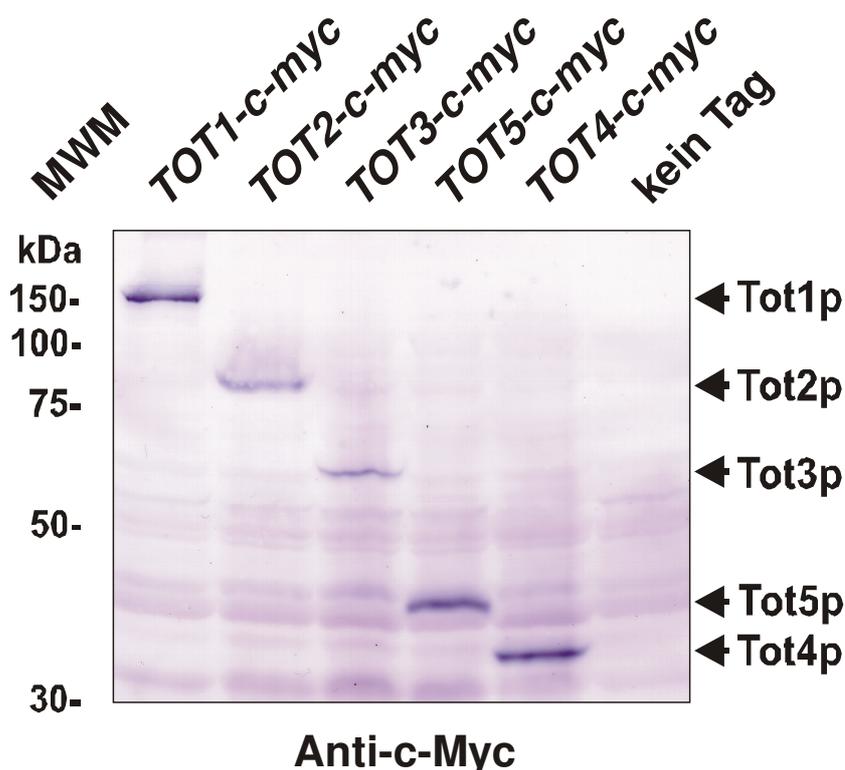
**Abb. 22:** Die Wirkung der n-terminalen Histon H3 und H4 Mutationen auf die Zymocin-Resistenz. **(A)** *TOT3* Wildtypzellen in Gegenwart von *TRP-1* markierten Wildtyp und mutierten Histon H3 & H4 Allelen. **(B)** *tot3 $\Delta$*  Zellen in Gegenwart von *TRP-1* markierten Wildtyp und mutierten Histon H3 & H4 Allelen. Serielle Verdünnungen der Zellen wurden auf 40% und 45% Killertoxinhaltigen YPD Platten replika aufgetragen. Kein Wachstum zeigt Zymocin-Sensitivität an. Die Zellen wurden auf Resistenz gegen *K. lactis* Zymocin überprüft (rechts). Killerstamm AWJ134 (rechte Reihe) und Nicht-Killerstamm NK40 (linke Reihe). Hemmhöfe zeigen Sensitivität gegen das Zymocin an.

Aus diesem Experiment geht hervor, daß weder die Zymocin Resistenz von *tot3 $\Delta$*  Zellen noch der Grad an Zymocin-Sensitivität von *TOT3* Wildtyp Zellen beeinflußt wird (Abb. 22) (Jablonowski et al. 2001b). Die Veränderung der N-Terminus von Histone H3 und H4 durch Teildeletion (*H3 $\Delta 3-29$* ) oder Austausch von acetylierungsrelevante Lysine Rest für die Acetylierung (*H3: K14R / H4: K8,16R* und *H3: K14Q / H4: K8, 16Q*) oder die Deposition des Nukleosoms (*H3: K9R / H4: K5, 12R*) um die Acetylierung zu verhindern (K zu R; Deletion) oder um eine Acetylierung vorzutäuschen (K zu Q), führt weder zu Resistenz-Veränderung der *tot3 $\Delta$*  Zellen noch zu Sensitivität-Unterschiede beim Wildtyp. (Abb. 22) (Jablonowski et al. 2001b; Wittschieben et al. 2000). Das Zymocin scheint demnach nicht die N-terminale Histon

H3 und H4 Acetylierung durch die Elongator HAT-Aktivität zu benötigen. Daraus folgt, daß der TOT/Elongator andere Substrate acetyliert, die zwar noch nicht identifiziert sind, aber Zymocinrelevant sein dürften.

### 3.8 Nachweis der Totp Proteine

Um die *TOT* Gene als Protein kodierende Struktur Gene zu identifizieren, wurden die einzelnen *TOT* Gene mit Hilfe der PCR vermittelten „Ein-Schritt-Epitopmarkierung“ individuell im Genom *in vivo* markiert (Knop et al. 1999). Alle *TOT1-5* Gene wurden auf diese Weise *in vivo* c-terminal mit einem dreifach c-Myc-Epitop kodierenden Bereich versehen. Aus exponentiell gewachsenen *TOT1-5*-(c-myc)<sub>3</sub> Zellen wurden Gesamt-Proteinextrakte gewonnen, von denen 50µg auf ein 10% SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Nach anschließendem Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran konnten die Tot1-5p Proteine mit dem monoklonalen anti-c-Myc Antikörper 9E10 nachgewiesen werden (Abb. 23) (Frohloff et al. 2001).



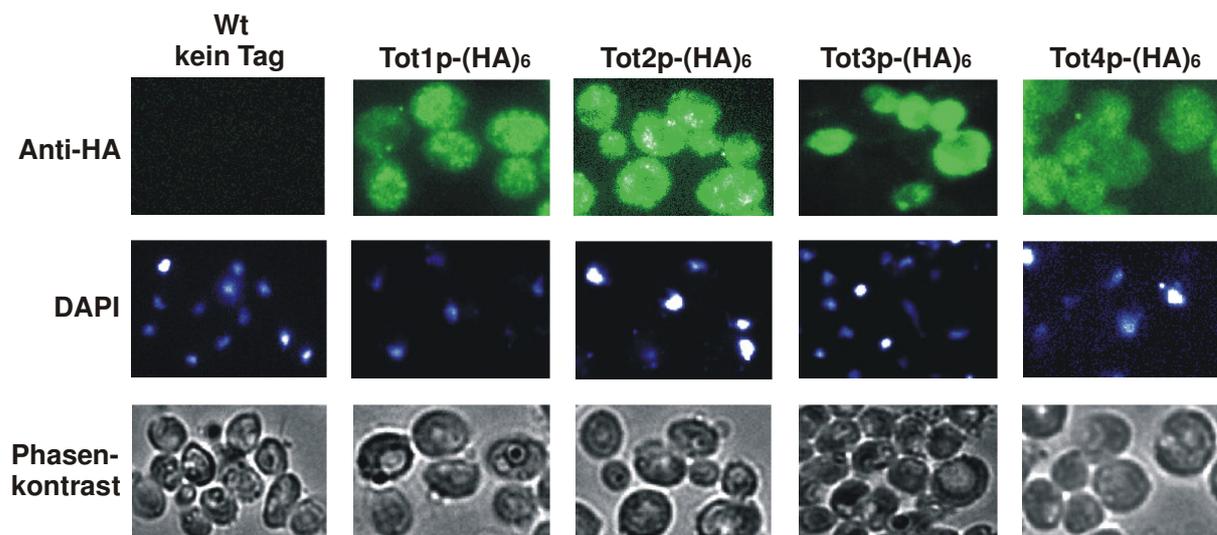
**Abb. 23:** Identifikation der *TOT1-5* Gene als Strukturprotein kodierende Gene. Western-Blot Analyse: Die dreifach c-Myc markierten Tot1-5p Proteine wurden immunologisch durch den Anti-cMyc Antikörper 9E10 nachgewiesen. Die Position der cMyc markierten Tot1-5p Proteine sind durch Pfeile angegeben. Die Molekulargewichte (MWM) sind in Kilodalton (kDA) angegeben.

Das im voraus erwartete Molekulargewicht stimmte mit dem experimentell ermittelten Ergebnis überein. Mit Hilfe der c-terminalen c-Myc-Epitop Markierung und dem

Immunnachweis mit dem monoklonalen anti-c-Myc Antikörper 9E10 konnten die *TOT1-5* Gene als aktiv exprimierte Protein-Struktur-Gene identifiziert werden.

### 3.8.1 Immunlokalisation der Totp Proteine in der Hefezelle

Um der Frage nachzugehen, wo sich die Totp Proteine *in vivo* in der Zelle befinden, wurde an HA-markierten Tot1-4p Proteinen (Knop et al. 1999) eine Immunlokalisation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Formaldehyd fixiert und mit Zymolase behandelt um die Zellwand für Antikörper permeabel zu machen. Anschließend konnten die HA Epitop markierten Tot1-4p Proteine mit dem primären monoklonalen anti-HA Antikörper 12CA5 und dem sekundären Fluorescein (FITC) konjugierten Antikörper nachgewiesen werden. Wie aus diesem Ergebnis hervorgeht, sind die Tot1-4p Proteine wohl hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 24) (Fichtner et al. 2002b).

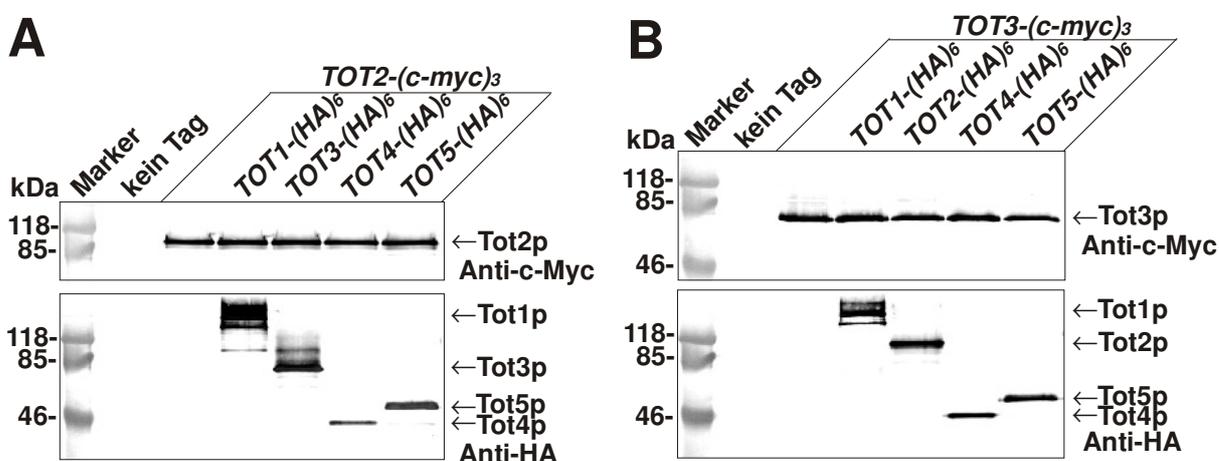


**Abb. 24:** Immunlokalisation der Tot1p, Tot2p, Tot3p und Tot4p Proteine. Der nicht markierte Kontrollstamm und die HA Epitop markierten Tot1-4p Proteinprodukte wurden durch die indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie sichtbar gemacht. Obere Reihe: Anti-HA Fluoreszenz zeigt die Position der HA markierten Tot1-4p Proteine. Mittlere Reihe: DAPI Färbung der DNA, die die Position des Zellkerns zeigt. Untere Reihe: Die Zellen im Phasenkontrast aufgenommen.

### 3.9 Co-Immunpräzipitation der Totp Proteine

Wie oben schon erwähnt, konnte nachgewiesen werden, daß die Elp1p(Tot1p), Elp2p(Tot2p), Elp3p(Tot3p) Proteine Bestandteil eines Elongator-Komplex sind, der insgesamt einen 650 kDa großen Multikomplex darstellt und spezifisch mit der elongierenden RNA-Polymerase II interagiert (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Wittschieben et al. 2000; Fellows et al. 2000). Um nachzuweisen, ob die Totp

Proteine miteinander interagieren, wurde geprüft, ob sich die Totp Proteine co-immunpräzipitieren lassen. Dazu wurden in einen Tot2p-c-Myc und Tot3p-c-Myc exprimierenden Stämmen jeweils ein weiteres *TOT* Gen HA-Epitop markiert, so daß folgende Kombinationen im *Tot2p-c-Myc* Hintergrund konstruiert wurden: *TOT2(c-myc)<sub>3</sub>/TOT1(HA)<sub>6</sub>*, *TOT2(c-myc)<sub>3</sub>/TOT3(HA)<sub>6</sub>*, *TOT2(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4(HA)<sub>6</sub>*, *TOT2(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5(HA)<sub>6</sub>* und im *Tot3p-c-Myc* Hintergrund: *TOT3(c-myc)<sub>3</sub>/TOT1(HA)<sub>6</sub>*, *TOT3(c-myc)<sub>3</sub>/TOT2(HA)<sub>6</sub>*, *TOT3(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4(HA)<sub>6</sub>*, *TOT3(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5(HA)<sub>6</sub>*. Aus den exponentiell gewachsenen Stämmen wurden Gesamt-Protein-Extrakte isoliert. Für die Co-Immunitäzitation der Totp Proteine wurden jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt. Die Gesamt-Protein-Extrakte der Epitop markierten Stämme wurden mittels Bradford Analyse aneinander auf 50µg/ml angepaßt. Die Co-Immunitäzitation erfolgte mit dem an Sepharose-A gekoppelten monoklonalen anti-c-Myc Antikörper 9E10. Die co-immunitäzitierten Proteine wurden mittels einer Western-Blot-Analyse analysiert. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß Tot2p mit Tot1p, Tot3p, Tot4p und Tot5p indirekt oder direkt interagiert (Abb. 25A) (Fichtner et al. 2002a).

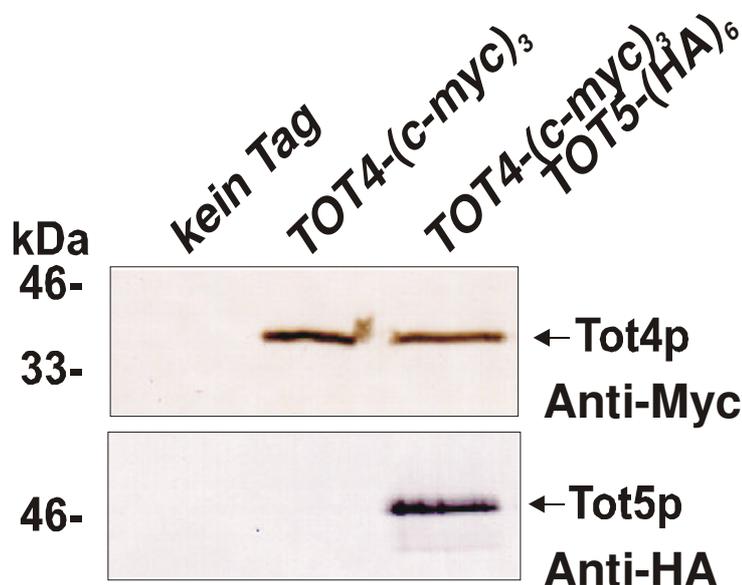


**Abb. 25:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immunitäzitation der Totp Proteine. **(A)** Das Tot2p Protein interagiert mit den Tot1p, Tot3p, Tot4p und Tot5p Proteinen. Die Positionen der HA-Markierten Tot1p, Tot3p, Tot4p und Tot5p Proteine sind durch die Pfeile gekennzeichnet. **(B)** Das Tot3p Protein interagiert mit den Tot1p, Tot2p, Tot4p und Tot5p Proteinen. Die Positionen der c-Myc und HA-Markierten Tot1p, Tot2p, Tot4p und Tot5p Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MWM) sind in KiloDalton kDa angegeben.

Auch Tot3p Protein interagiert direkt oder indirekt, mit Tot1p, Tot2p, Tot4p und Tot5p (Abb. 25B) (Fichtner et al. 2002a). Somit liegen in dem Elongator-Komplex in einer direkten oder indirekten Art und Weise folgende Protein-Protein Interaktionen vor: Tot2p-Tot1p, Tot2p-Tot3p, Tot2p-Tot4p, Tot2p-Tot5p, Tot3p-Tot1p, Tot3p-Tot4p und

Tot3p-Tot5p. Das Einsetzen der gleichen Gesamt-Proteinmengen in der Co-Immupräzipitation zeigt, daß die Tot1-5p Proteine etwa in stöchiometrisch gleichen Mengen vorliegen. Wie in der Abb.25 zu sehen ist, liegen die Tot2p-c-Myc und die Tot3p-c-Myc markierten Proteine in allen co-Immupräzipitierten Fraktionen etwa in gleicher Menge vor.

Um nachzuweisen, ob Tot4p auch mit Tot5p interagiert, wurde eine Co-Immupräzipitation mit dem Stamm *TOT4(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5(HA)<sub>6</sub>* durchgeführt. Damit konnte nachgewiesen werden, daß Tot4p auch mit dem Tot5p Protein interagiert (Abb. 26) (Fichtner et al. 2002a). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine physikalische Interaktion von Tot4p mit Tot2p, Tot3p und Tot5p gezeigt werden. Somit ist Tot4p zumindest zeitweise Bestandteil des Elongator-Komplexes (Abb. 26) (Fichtner et al. 2002a).



**Abb. 26:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP) von Tot4p und Tot5p. Das Tot4p Protein interagiert mit dem Tot5p Protein. Die Proteinextrakte wurden mit dem Anti c-Myc Antikörper 9E10 co-immupräzipitiert, auf ein 10% SDS-PAGE aufgetrennt, elektrogeblottet und mit den anti c-Myc Antikörper 9E10 sowie mit dem anti HA-Antikörper 12CA5 identifiziert. Die Positionen der Totp Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MWM) sind in Kilo Dalton kDa angegeben.

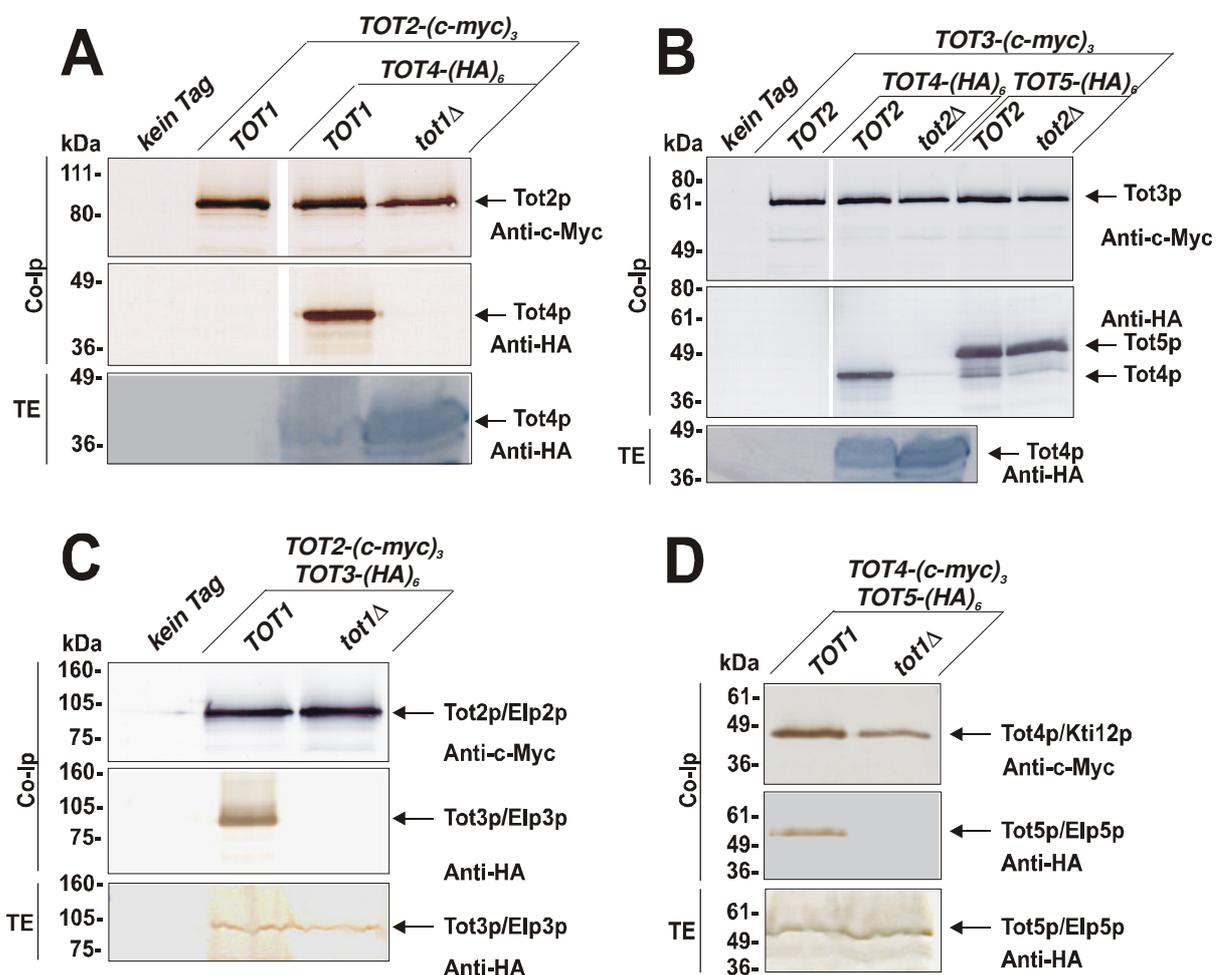
### 3.9.1 Die Interaktionen der Totp Proteine im Elongator-Komplex

Um zu analysieren, wie die einzelnen Untereinheiten im Elongator-Komplex miteinander verbunden sind, wurden Stämme konstruiert, in denen ein *TOT* Gen deletiert ist und zusätzlich zwei weitere unterschiedliche *TOT* Gene c-Myc- und HA-Epitop markiert sind. Mit Hilfe der Co-Immupräzipitation, konnte analysiert werden, ob die Totp Proteine in Abwesenheit des deletierten Totp Proteins immer noch interagieren oder diese Interaktion verloren geht. Um quantitative Aussagen zu

erhalten, wurden von den zu testenden Stämmen, die gleiche Proteinmenge (500µg) für die Co-Immupräzipitation eingesetzt. Die Co-Immupräzipitation wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.9.2 Die Deletion von *TOT1* und *TOT2*

Um zu untersuchen, wie die Abwesenheit der Tot1p und Tot2p Proteine den Aufbau des Elongator-Komplex beeinflussen, wurden folgende Stämme konstruiert: *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4-(HA)<sub>6</sub>/tot1Δ*, *TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4-(HA)<sub>6</sub>/tot2Δ*, *TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot2Δ*, *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT3-(HA)<sub>6</sub>/tot1Δ* und *TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot1Δ*.

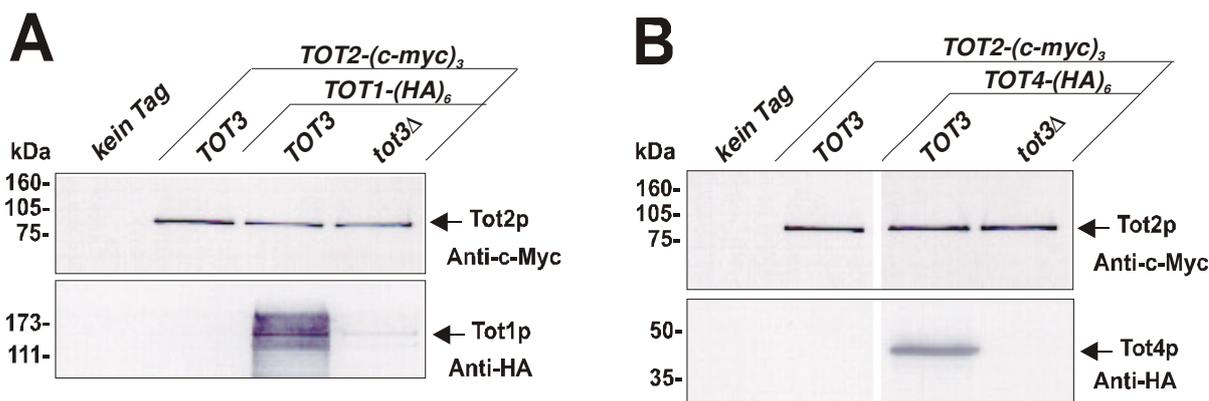


**Abb. 27:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP) Die Abhängigkeit der Interaktion der Elongator-Untereinheiten von Tot1p und Tot2p. **(A)** Die Tot2p-Tot4p Interaktion benötigt Tot1p. Nachweis der HA markierten Tot4p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(B)** Die Tot3p-Tot4p Interaktion benötigt Tot2p. Die Tot3p-Tot5p Interaktion benötigt nicht das Tot2p Protein. Nachweis der HA markierten Tot4p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(C)** Die Tot2p-Tot3p Interaktion benötigt Tot1p. Nachweis der HA markierten Tot3p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(D)** Die Tot4p-Tot5p Interaktion benötigt Tot1p. Nachweis der HA markierten Tot5p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). Die Positionen der Totp Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MWM) sind in Kilo Dalton kDa angegeben.

Wie aus der Abb. 27 ersichtlich, beeinflussen die Tot1p und Tot2p Proteine den strukturellen Zusammenhalt des Elongator-Komplexes. Die Interaktionen der Elongator Untereinheiten sind abhängig von der Funktion bzw. der Anwesenheit der Tot1p und Tot2p Proteine. Im Gegensatz zum Wildtyp Tot1p, das eine Co-Immunitäzitation von Tot4p durch Tot2p erlaubt, ist die physikalische Verbindung in den *tot1Δ* Zellen nicht mehr vorhanden. Für die Tot2p-Tot4p Protein-Protein Interaktion wird somit das Tot1p Protein benötigt. Ähnlich ist die physikalische Interaktion zwischen dem Tot3p Protein und dem Tot4p Protein in den *tot2Δ* Zellen nicht mehr vorhanden. Die Tot3p-Tot4p Protein-Protein Interaktion ist abhängig vom Tot2p Protein (Abb. 27A & B) (Fichtner et al. 2002b). Jedoch ist die Protein-Protein Interaktion von Tot3p und Tot5p unabhängig von Tot2p (Abb. 27B) (Fichtner et al. 2002b). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Protein-Protein Interaktion von Tot2p und Tot3p von Tot1p vermittelt wird (Abb. 27C) (Frohloff et al. 2003). Ebenso benötigt Tot4p das Tot1p Protein, um mit Tot5p interagieren zu können (Abb. 27D) (Frohloff et al. 2003).

### 3.9.3 Die Deletion von *TOT3*

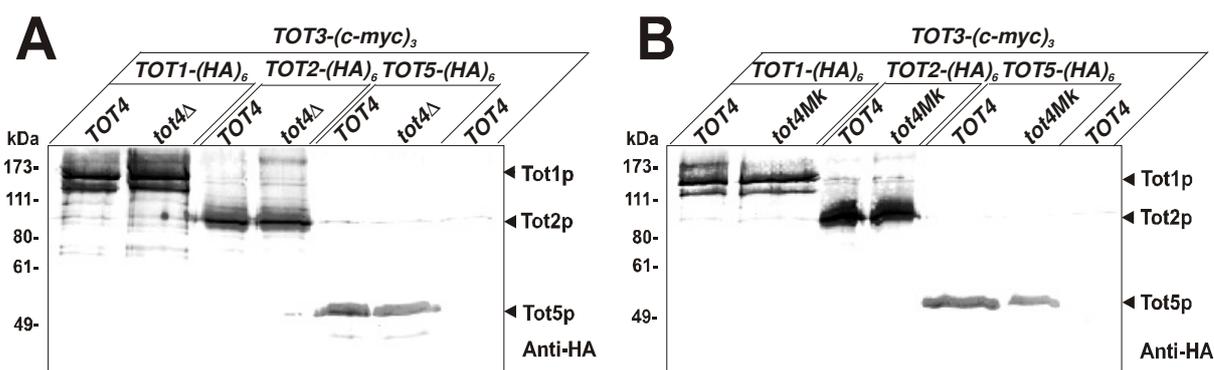
Als nächstes wurde der Aufbau des Elongator-Komplexes in der Abwesenheit des *TOT3* Gens untersucht. Dafür wurden folgende Hefestämme *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT1-(HA)<sub>6</sub>/tot3Δ*, *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4-(HA)<sub>6</sub>/tot3Δ* und *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot3Δ* konstruiert. Die Co-Immunitäzitation und die anschließende Western-Blot Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Wie aus dem Ergebnis der Abb. 28 hervorgeht, werden die Tot2p-Tot1p (Abb. 28A) und Tot2p-Tot4p (Abb. 28B) Protein-Protein Interaktionen Tot3p abhängig vermittelt (Fichtner et al. 2002b). Das Ergebnis, daß die Interaktion von Tot2p-Tot1p von Tot3p abhängig ist (Abb. 28A), konnte inzwischen ebenfalls bestätigt werden (Petrakis et al. 2004). Des weiteren ist die Tot2p und Tot5p Protein-Protein Bindung in *tot3Δ* Stämmen nicht mehr vorhanden (Abb. 30A) (Fichtner et al. 2002b). Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, daß neben seiner enzymatischen Funktion als HAT, Tot3p auch eine wichtige Rolle für den Aufbau des Elongator-Komplex hat. Die Protein-Protein Interaktionen von Tot2p-Tot1p, Tot2p-Tot4p und Tot2p-Tot5p sind alle abhängig von der Tot3p Präsenz. Das läßt den Schluß zu, daß das Tot3p Protein dem Elongator-Komplex eine strukturelle Integrität verleiht.



**Abb. 28:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP). Die Abhängigkeit der Elongator Interaktion von der *TOT3* Gen Funktion. **(A)** Die Tot2p-Tot1p Interaktion benötigt das Tot3p Protein. **(B)** Die Tot2p-Tot4p Interaktion benötigt das Tot3p Protein. Die Positionen der Totp Proteine sind durch die Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MW) sind in kDa angegeben.

### 3.9.4 Die Deletion & erhöhte *TOT4* Gendosis beim Elongatoraufbau

Wenn Tot4p ebenfalls Bestandteil des Elongator-Komplexes ist, wie aus Co-Immupräzipitation hervorgeht, stellt sich als nächstes die Frage, ob der Verlust oder die erhöhte Kopienzahl von *TOT4* sich auf die Protein-Protein Interaktion im Elongator-Komplex auswirken. Dazu wurden die Epitop markierten Wildtypstämme Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot1p(HA)<sub>6</sub>, Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot2p(HA)<sub>6</sub>, Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot5p(HA)<sub>6</sub> mit den *tot4Δ* deletierten Hefestämmen Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot1p(HA)<sub>6</sub>*tot4Δ*, Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot2p(HA)<sub>6</sub>*tot4Δ*, und Tot3p(c-myc)<sub>3</sub>/Tot5p(HA)<sub>6</sub>*tot4Δ* sowie mit den *TOT4*-Multiekopie Zellen verglichen.



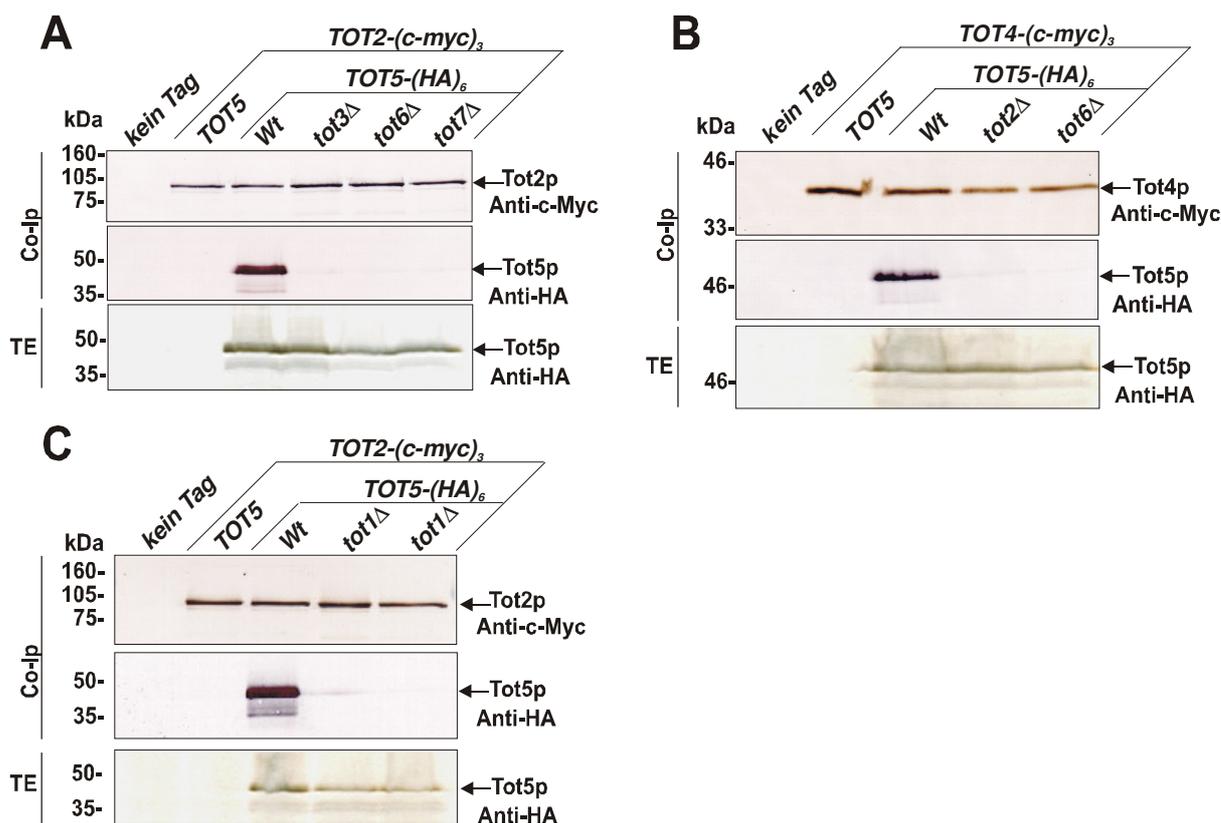
**Abb. 29:** Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP). Totp Protein-Protein Interaktion in Verbindung mit der *TOT4* Funktion. **(A)** Die Tot3p-Tot1p, Tot3p-Tot2p, Tot3p-Tot5p Interaktionen verglichen mit den *TOT4* Wildtyp und den *tot4Δ* Zellen. **(B)** Die Tot3p-Tot1p, Tot3p-Tot2p, Tot3p-Tot5p Interaktionen verglichen mit den *TOT4* Wildtyp und den *TOT4* Mk (= Multiekopie) Stämmen. Die Positionen der Tot1p, Tot2p und Tot5p Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MW) sind in kDa angegeben.

Wie aus dem Experiment hervorgeht, wurde die Interaktion zwischen den Elongator-Untereinheiten Tot1p, Tot2p, Tot5p mit Tot3p weder durch die Deletion noch durch

die erhöhte Kopienzahl von *TOT4* verändert (Abb. 29) (Fichtner et al. 2002a). Obwohl sich das Tot4p Protein mit anderen Totp Proteinen co-immunpräzipitieren läßt, hat die *TOT4* Deletion keine Auswirkung auf den Aufbau des Elongator-Komplex (Fichtner et al. 2002a). Daraus läßt sich schließen, daß Tot4p im Elongator-Komplex ein randständiges Protein sein könnte und für die Integrität des Elongator-Komplex eine weniger wichtige Bedeutung zukommt.

### 3.9.5 Die Deletion von *TOT1*, *TOT2*, *TOT3*, *TOT6* und *TOT7*.

Es konnte nachgewiesen werden, daß der Holo-Elongator aus zwei heterotrimeren Subkomplexen besteht, dem Core-Komplex Elp1p (Tot1p), Elp2p (Tot2p), Elp3p (Tot3p) und dem HAP-Komplex Hap4p (Tot5p), Hap5p (Tot6p), Hap6p (Tot7p) (Li et al. 2001). Um die Frage zu beantworten, wie sich Deletionen von *TOT6(HAP5)* und *TOT7(HAP6)* auf die Interaktion des Elongator-Komplex bzw. auf die Interaktion der zwei Subkomplexe auswirkt, wurden folgende Stämme hergestellt: *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot1Δ*, *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot3Δ*, *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot6Δ*, *TOT2-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot7Δ*, *TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot2Δ* und *TOT4-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT5-(HA)<sub>6</sub>/tot6Δ*. Aus der Co-Immünpräzipitation geht hervor, daß in *tot3Δ*, *tot6Δ* und *tot7Δ* Zellen die Tot5p und Tot2p Proteine im Elongator-Komplex nicht mehr miteinander assoziiert vorliegen (Abb. 30A) (Frohloff et al. 2003). Die Tot2p-Tot5p Protein-Protein Interaktion ist also abhängig von Tot3p, Tot6p und Tot7p. Das zeigt, daß die Tot6p und Tot7p Proteine die Struktur des HAP Komplexes, also der zweiten Subuntereinheit des Elongator-Komplex, beeinflussen. Ihre Deletion führt zur Unfähigkeit des HAP-Komplexes am Core-Elongator zu binden. Aus der Tatsache, daß die Protein-Protein Interaktion zwischen der HAP-Untereinheit Tot5p und der Core-Untereinheit Tot2p durch die Deletion des *TOT3* Gens zerstört wird, kann als Beweis angesehen werden, daß Tot3p die Verbindung der beiden Sub-Komplexe vermittelt (Abb. 30A) (Frohloff et al. 2003). In gleicher Weise bleibt die Protein-Protein Interaktion von Tot3p-Tot5p in Abwesenheit von *TOT2* unbeeinflusst (Abb. 27B) (Frohloff et al. 2003). Vermutlich wird der HAP-Komplex hauptsächlich mit dem Core-Komplex durch Tot1p miteinander verbunden wird. Jedoch werden für die Tot4p-Tot5p Protein-Protein Interaktion die Proteine Tot2p und Tot6p benötigt (Abb. 30B) (Frohloff et al. 2003).

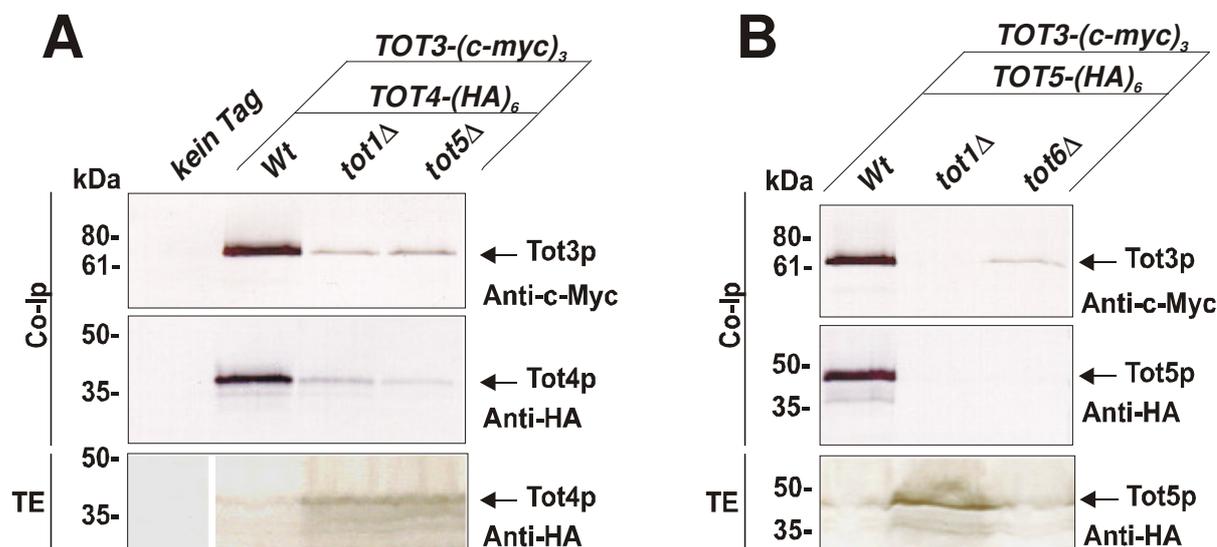


**Abb. 30:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP). Die Abhängigkeit der Elongator Untereinheiten Interaktion von den *TOT1*, *TOT2*, *TOT6* und *TOT7* Gen Funktionen. **(A)** Die Tot2p-Tot5p Interaktion ist abhängig von *TOT3*, *TOT6* und *TOT7*. Nachweis der HA markierten Tot5p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(B)** Die Tot4p-Tot5p Interaktion ist abhängig von *TOT2*, und *TOT6*. Nachweis der HA markierten Tot5p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(C)** Die Tot2p-Tot5p Interaktion ist abhängig von *TOT1*. Nachweis der HA markierten Tot5p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). Die Positionen der Tot2p, Tot4p und Tot5p Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MW) sind in kDa angegeben.

Für den Kontakt zwischen Tot4p und dem Core-Komplex, ist dies ein Hinweis, daß Tot2p direkt mit Tot4p in Verbindung steht. (Frohloff et al. 2003). Daraus läßt sich schließen, daß Tot4p und der HAP-Komplex in unterschiedlicher Weise gleichzeitig den Core-Komplex kontaktieren. Aus dem Ergebnis, daß in Abwesenheit von Tot1p kein Kontakt zwischen Core-Komplex und HAP-Komplex aufgebaut wird (Abb. 30C), kann geschlossen werden, daß Tot1p eine wichtige Funktion für strukturelle Integrität des Elongators hat, zumal Tot1p auch die größte Protein-Untereinheit im Elongator-Komplex stellt.

Um weitere Informationen über den strukturellen Aufbau des Elongator-Komplexes zu erhalten, wurden weitere Deletions-Studien untersucht. Folgende Stammkombinationen wurden analysiert *TOT3-(c-myc)3/TOT4-(HA)6/tot1Δ*, *TOT3-(c-myc)3/TOT4-(HA)6/tot5Δ* und *TOT3-(c-myc)3/TOT5-(HA)6/tot6Δ*. Wie aus der Abb. 31 hervorgeht, wird für die Protein-Protein Interaktion zwischen Tot3p und Tot4p die Anwesenheit von Tot1p nicht benötigt (Abb. 31A). Jedoch liegen die Tot3p und

Tot4p Proteine in geringerer Menge vor als im Wildtyp, obwohl für die Co-Immupräzipitation die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde. Offensichtlich liegt das Tot3p Protein in Abwesenheit von Tot1p in geringerer Menge vor, so daß dadurch auch weniger Tot4p co-immunpräzipitiert werden kann.



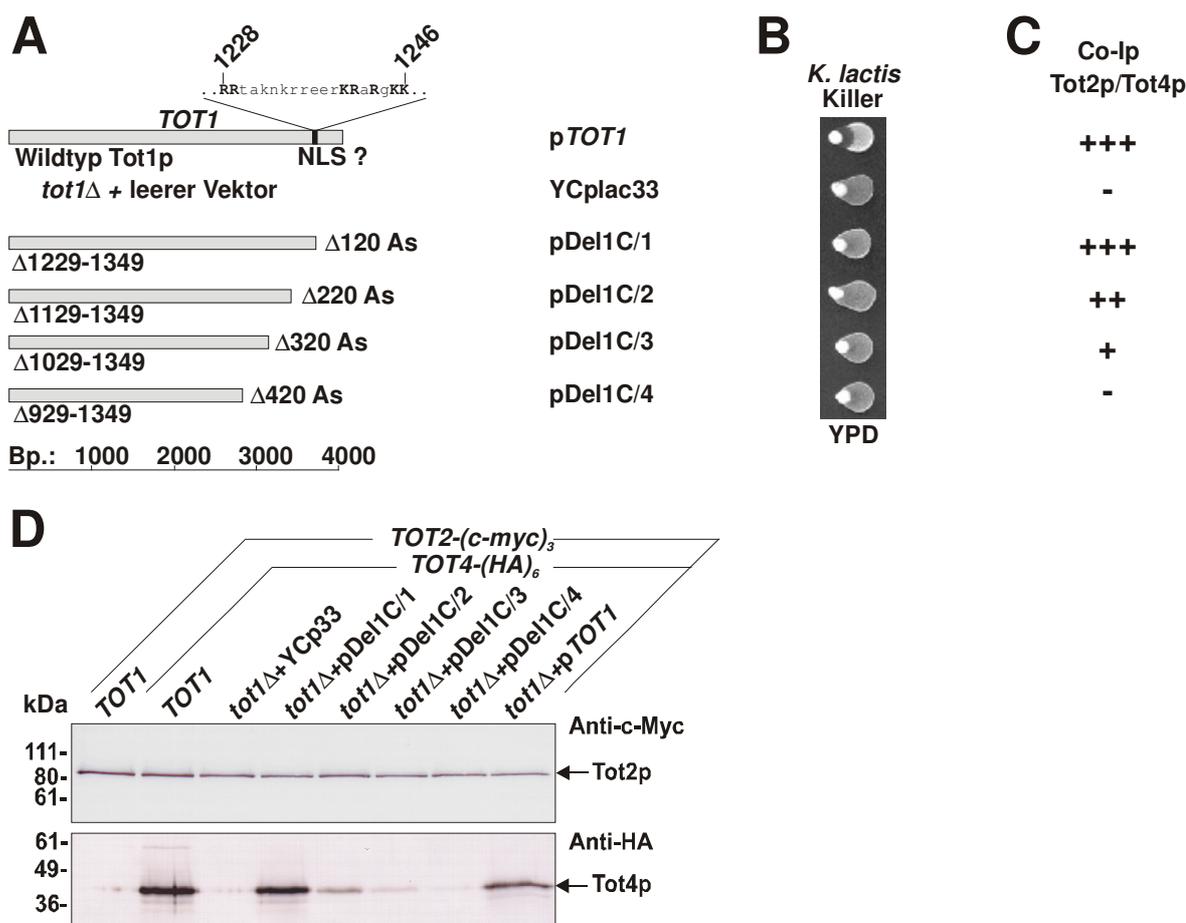
**Abb. 31:** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation (Co-IP). Die Abhängigkeit der Elongator Untereinheiten Interaktion von der *TOT1*, *TOT5*, und *TOT6* Gen Funktion. **(A)** Die Interaktion von Tot4p und Tot3p ist nicht abhängig von *TOT1* und *TOT5*. Nachweis der HA markierten Tot4p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). **(B)** Die Interaktion von Tot5p und Tot3p ist abhängig von *TOT6*. Nachweis der HA markierten Tot5p Expression im Totalprotein-Extrakt (TE). Die Positionen der Tot3p, Tot4p und Tot5p Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MW) sind in kDa angegeben.

Wie aus dem Gesamtproteinextrakt ersichtlich, wird das Tot4p Protein in Abwesenheit von Tot1p nach wie vor exprimiert. Wäre also mehr Tot3p Protein vorhanden könnte auch mehr von Tot4p co-immunpräzipitiert werden. Genauso verhält es sich mit der Co-Immupräzipitation der Tot3p und Tot5p Proteine in Abwesenheit von Tot1p. Auch hier ist kein Tot3p Protein mehr vorhanden. Folglich kann das Tot5p Protein nicht mehr co-immunpräzipitiert werden, da das Tot5p Protein im Gesamtproteinextrakt weiterhin noch nachweisbar ist (Abb. 31B). Ebenfalls wird für die Interaktion der Tot3p und Tot4p Proteine das dem HAP-Komplex angehörige Tot5p Protein nicht benötigt (Abb. 31A). Die Abwesenheit von Tot5p verhält sich genauso wie die Abwesenheit von Tot1p. Auch hier scheint das Tot3p Protein nur noch in geringer Menge vorzuliegen, so daß das im Gesamtproteinextrakt vorliegende Tot4p Protein nur in geringen Mengen co-immunpräzipitiert werden kann. Wäre also mehr Tot3p vorhanden könnte auch mehr Tot4p co-immunpräzipitiert werden. Andersherum, ist kein Tot3p vorhanden kann

auch Tot4p nicht mehr co-immunpräzipitiert werden. Genauso scheint es sich mit der Co-Immunitpräzipitation von Tot3p und Tot5p in Abwesenheit von Tot1p zu verhalten (Abb. 31B). Die Interaktion des Tot5p Proteins mit der HAT-Untereinheit Tot3p des Elongator-Komplex ist abhängig von Tot6p (Abb. 31B).

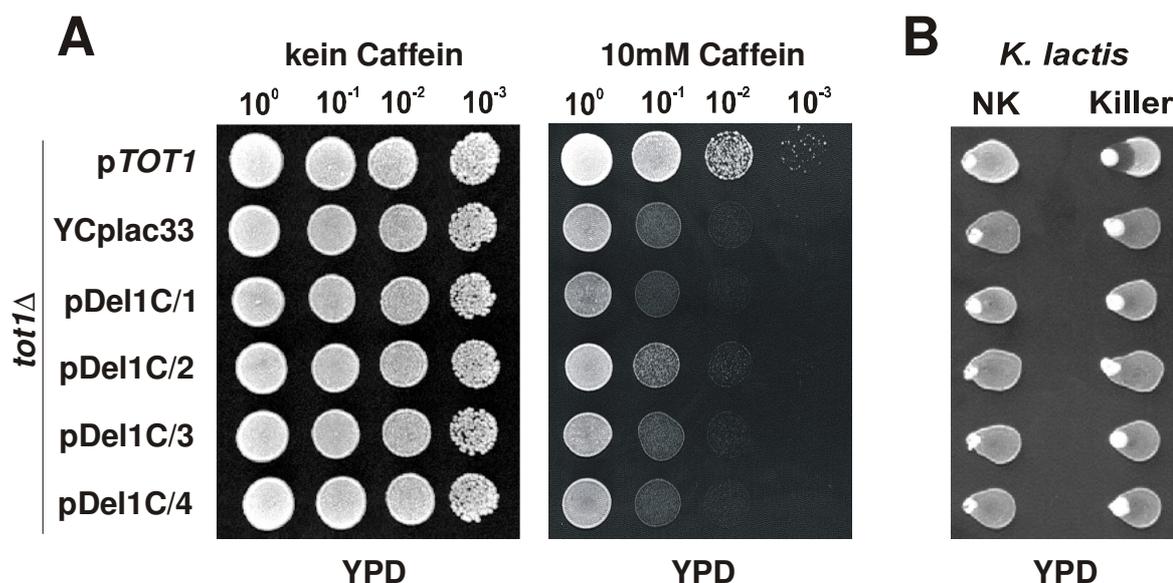
### 3.9.6 C-Terminale Verkürzungen von *TOT1*

Um der Frage nachzugehen, welche Region in Tot1p wichtig ist, damit eine Protein-Protein Bindung zwischen Tot4p und Tot2p erfolgt, wurden verschiedene c-terminale Verkürzungen am *TOT1* Gen getestet. Die C-Terminale verkürzten *TOT1* Gene wurden in ein YCpLac33 *URA3-CEN*-Plasmid kloniert (pDel1C1-4) und in einen Zymocin resistenten *TOT2-(c-myc)/TOT4-(HA)/tot1Δ* Stamm transformiert. Aus dem Experiment geht hervor, daß Verkürzungen am 3'-Ende des *TOT1* Gens allmählich zum Verlust der Protein-Protein Interaktion zwischen Tot2p und Tot4p führen (Abb. 32D) (Fichtner et al. 2002b). Jedoch sind die c-terminalen 120 Aminosäuren ( $\Delta$ 1229-1349aa) aus Tot1p für die Tot4p-Tot2p Protein-Protein Interaktion entbehrlich (Abb. 32D) (Fichtner et al. 2002b). So ist trotz c-terminaler Deletion eine Co-Immunitpräzipitation der Tot4p und Tot2p Proteine möglich. Weitere Verkürzungen ( $\Delta$ 1129-1349aa) und ( $\Delta$ 1029-1349aa) in Tot1p führt nur noch zu einer schwachen bzw. kaum registrierbaren Interaktion zwischen Tot2p und Tot4p (Abb. 32D) (Fichtner et al. 2002b). Das zeigt, daß die c-terminalen 220 Aminosäuren von Tot1p an der Vermittlung der Interaktion zwischen Tot2p und Tot4 verantwortlich sind. Zusätzliche Deletionen um weitere 100 Aminosäuren ( $\Delta$ 929-1349aa) führen dann zum vollständigen Verlust der Interaktion (Abb. 32D) (Fichtner et al. 2002b). Das zeigt, daß die Interaktion zwischen Tot2p und Tot4p von den c-terminalen Aminosäuren 929-1229aa des Tot1p Proteins abhängig ist. Wie in der Abb. 32D zu sehen ist, werden die verkürzten Tot1p Proteine tatsächlich exprimiert und sind nicht das Ergebnis von Protein-Instabilität oder fehlender Tot1p Expression. Bemerkenswerter Weise führen alle Verkürzungen, einschließlich der ersten 120 Aminosäuren an Tot1p zur Zymocin Resistenz (Abb. 32B) (Fichtner et al. 2002b) und Caffein Sensitivität die nicht unterscheidbar von der Nullmutation *tot1Δ* ist (Abb. 33A & B). Daraus läßt sich schließen, daß die c-terminalen 120 Aminosäuren wichtig für die vollständige Funktion des Elongator-Komplexes und der Zymocin-Sensitivität sind. Des weiteren befindet sich im c-terminalen Bereich des *TOT1* Gens eine vermutete „Kernlokalisations-Sequenz“ (NLS) (Abb. 32A) (Dingwall & Lashey 1991).



**Abb. 32:** Die Wirkung der Tot1p Verkürzung auf die Tot2p-Tot4p Interaktion. **(A)** Die c-terminalen Deletionen sind auf horizontalen Achsen dargestellt. Angegeben ist die Anzahl der deletierten Aminosäuren. Die vermutete NLS-Sequenz und seine konservierten Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben. **(B)** Der Exotoxin Test des Wildtyp *TOT1* (pFF12), leerer Vektor YCplac33 und die Plasmid kodierte c-terminalen *TOT1* Deletionen (pDel1C/1-4) im Zymocin resistenten Hintergrund. **(C)** Die Fähigkeit der Plasmidkodierte *TOT1* Deletionserie die Tot2p-Tot4p Proteine Co-Immune zu präzipitieren: (+++) = Wildtypeeigenschaft, (++) und (+) = Reduzierung der Co-Immupräzipitation, (-) = keine Co-Immupräzipitation. **(D)** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation. Die Positionen der Totp Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MW) sind in kDa angegeben.

Aus der Tatsache, daß mit der Deletion der 120 Aminosäuren ( $\Delta 1229-1349$ aa) die NLS-Sequenz deletiert ist, und diese Deletion keine Auswirkung auf die Interaktion zwischen Tot2p und Tot4p hat, zeigt, daß dieser Bereich für die Tot2p und Tot4p Interaktion nicht relevant ist und deshalb tatsächlich eine mögliche Kern-Transport-Funktion haben könnte. So könnte das Fehlen der NLS-Sequenz den Eintransport des Tot1p Proteins oder des Elongator-Komplex in den Zellkern verhindern, das dann zu einer Dysfunktion des Elongators führt. Auf diese Weise wäre die sofort auftretende Zymocin Resistenz und die Caffein Sensitivität erklärbar.

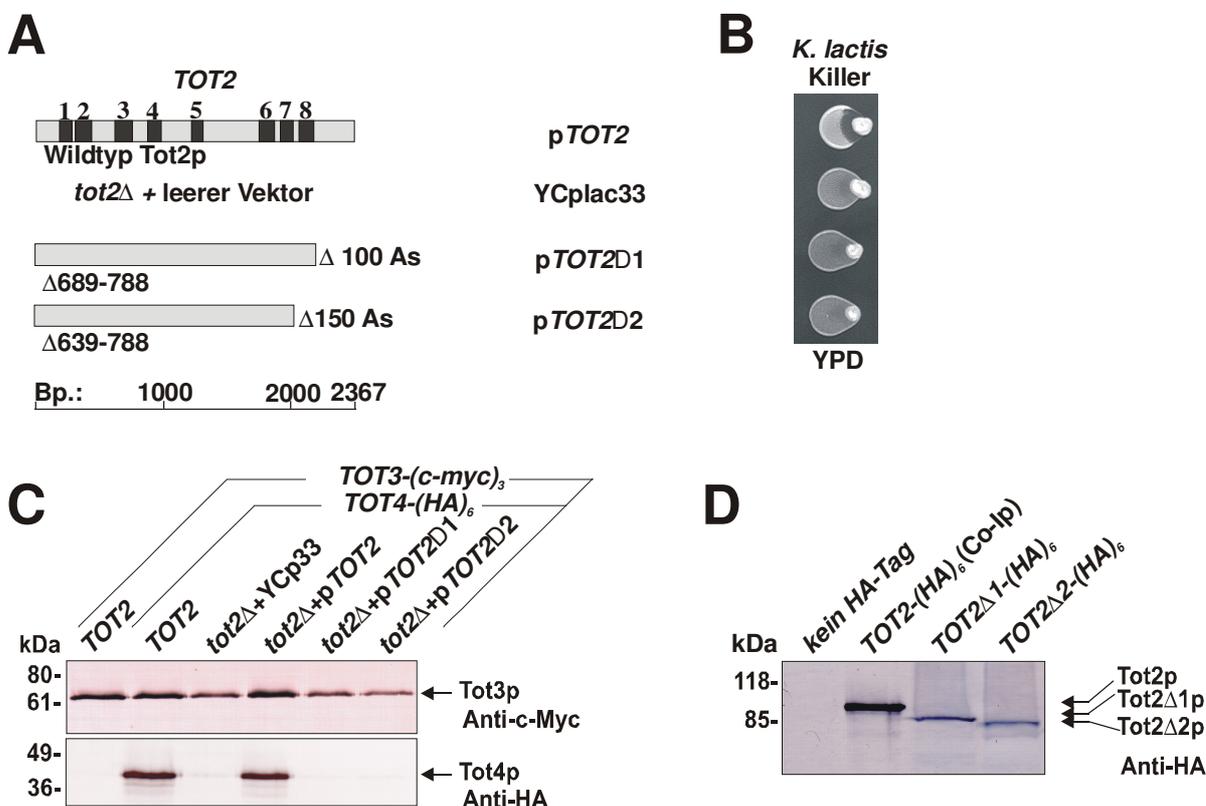


**Abb. 33:** Phänotypen der c-terminalen Deletion von *TOT1*. **(A)** Caffein Sensitivität. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf YPD Platten replika aufgetragen, die kein Caffein und 10mM Caffein enthielten. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Kein Wachstum zeigt Sensitivität gegen Caffein an. **(B)** Exotoxin Test. Die Gleichen Stämme wie in (A) wurden gegen das Killertoxin getestet. Rechts wurde mit dem Killerstamm AWJ137, links mit dem Nicht-Killerstamm NK40 inokuliert. Kein Hemmhof um den Killerstamm zeigt Resistenz auf.

### 3.9.7 C-Terminale Verkürzungen von *TOT2*

Tot2p enthält acht WD40 Domänen, welche für den strukturellen Aufbau des Elongators wichtig sein könnten (Fellows et al. 2000). Jedoch führt die Deletion von *TOT2* nicht zum Verlust der Interaktion von Tot3p-Tot5p (Abb. 27). Das zeigt, daß für die Bindung zwischen dem Core-Komplex Protein Tot3p und dem Tot5p Protein des HAP Komplexes das Tot2p Protein nicht benötigt wird. Weil Tot2p eine wichtige Rolle für die Verbindung von Tot4p mit Tot3p und Tot5p spielt (Abb. 27B & 30B), wurde untersucht, inwieweit sich c-terminale Verkürzungen an Tot2p auf die Tot3p-Tot4p Interaktion auswirken. Für die Co-Immunpräzipitation wurde folgender Stammhintergrund gewählt: *TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>/TOT4-(HA)<sub>2</sub>/tot2Δ* in denen die im YCplac33 klonierten c-terminalen *TOT2* Deletionen (p*TOT2Δ1-4*) transformiert wurden. Die Verkürzungen wurden so ausgewählt, daß von der ersten c-terminalen Verkürzung von *tot2Δ1* ( $\Delta 689-788aa$ ) noch kein WD40 Protein-Protein Bindemotiv betroffen ist. Die weiteren drei c-terminalen Verkürzungen wurden so gewählt, daß von *tot2Δ2* die achte WD40, von *tot2Δ3* die siebte und achte WD40, und von *tot2Δ4* die sechste, siebte und achte WD40 Domäne deletiert ist (Abb. 34A) (Frohloff et al. 2003). Die Co-Immunpräzipitation und die anschließende Western Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Überraschender Weise ist schon die erste C-Terminale Verkürzung nicht mehr in der Lage, die Interaktion von Tot3p und Tot4p im

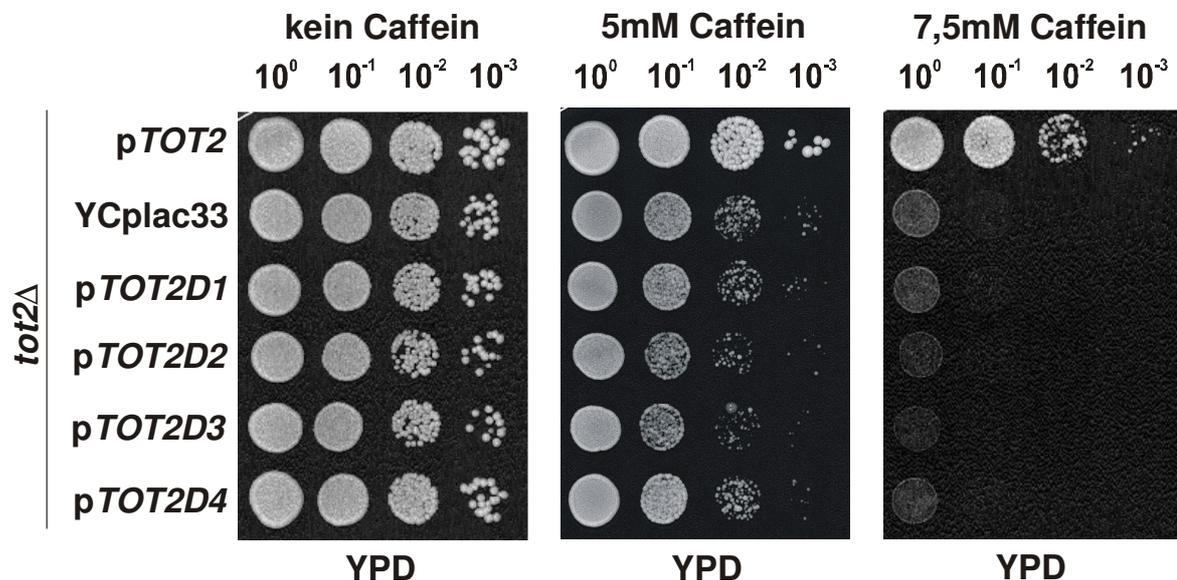
*tot2Δ* Hintergrund herzustellen (Abb. 34C) (Frohloff et al. 2003). Nur das vollständig klonierte *TOT2* Wildtypgen war in der Lage, die Tot3p-Tot4p Interaktion zu ermöglichen, wie das chromosomal kodierte *TOT2* Wildtypgen (Abb. 34C) (Frohloff et al. 2003).



**Abb. 34:** Die Wirkung der c-terminalen Tot2p Deletionen auf die Tot3p-Tot4p Interaktion. **(A)** Die c-terminalen *TOT2* Deletionen sind in der horizontale Achse dargestellt, daneben sind die Plasmid klonierten Allele abgedruckt (z.B. *pTOT2Δ1*). Die schwarzen Boxen zeigen die nummerierten acht WD40 Motive. **(B)** Exotoxin Test des Wildtyp *TOT2*, *tot2Δ* mit leerem Vektor YCplac33 und die c-terminal deletierten *TOT2* Allele (*pTOT2Δ1-2*). **(C)** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immupräzipitation. **(D)** Western-Blot Analyse. Nachweis der Expression der c-terminal verkürzten Tot2p Proteine aus dem Proteingestamtextrakt. Die Positionen der Wildtyp Tot2p Proteine und der verkürzten Tot2p Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MWM) sind in kDa angegeben.

Das zeigt, daß die für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren im c-terminalen Bereich von Tot2p liegen. Die Aminosäuren 689-788aa sind also unentbehrlich Eine Überprüfung des Proteingestamtextrakt mit *in vivo* verkürzten und HA markierten *Tot2p* Proteinen ergab, daß die verkürzten Tot2p Proteine tatsächlich in der Zelle exprimiert werden und nicht das Ergebnis von Proteininstabilität oder fehlender Tot2p Expression sind (Abb. 34D) (Frohloff et al. 2003). Folglich liegt die Funktion von Tot2p, die Verbindung von Tot3p mit Tot4p zu vermitteln, im extremen C-Terminus, nämlich in den letzten 100 Aminosäureresten, obwohl in diesen Bereich sich keine

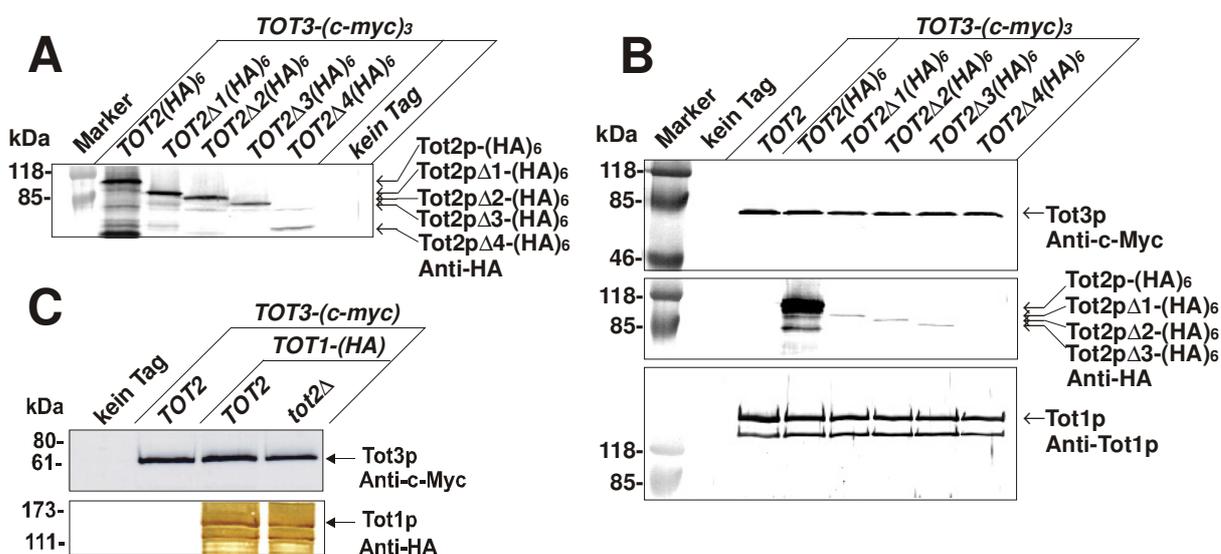
WD40 Domäne befindet. Dieses Ergebnis erklärt auch die sofort auftretende Resistenz im Exotoxin Test (Abb. 34B) (Frohloff et al. 2003) und die Caffein Sensitivität die nicht unterscheidbar von der Nullmutation *tot1Δ* ist (Abb. 35). Dies zeigt die Wichtigkeit des C-Terminus für die Zymocin-Sensitivität des Tot2p Proteins.



**Abb. 35:** Caffein sensitive Phänotyp der c-terminalen Deletion von *TOT2*. Serielle Verdünnungen der Stämme wurden auf YPD Platten replika aufgetragen, die kein Caffein, 5mM Caffein und 10mM Caffein enthielten. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Kein Wachstum zeigt Caffein Sensitivität an.

Diese Daten deuten darauf hin, daß Tot2p den Kontakt zwischen Tot4p und Elongator vermittelt. Der Befund, daß die Zymocin-Wirkung bereits in Abwesenheit des C-Terminus aufgehoben ist, kann als Hinweis gesehen werden, daß Zymocin die Interaktion von Tot4p mit dem Elongator benötigt. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß Tot4p die *TOT*-Funktion des Elongators beeinflusst. Neben der Besonderheit, daß Überexpression von Tot4p Resistenz gegen Zymocin induziert, ist das ein weiterer Hinweis, daß Tot4p aktiv am Target-Prozeß beteiligt ist. Um weiter die Rolle der Tot2p WD40 Domänen für den Aufbau des Core-Komplex zu untersuchen, wurde der Frage nachgegangen, ob sich die Tot2p Verkürzungen auf die Tot1p vermittelte Tot2p und Tot3p Protein-Protein Interaktion auswirken. Es sollte untersucht werden, welche der WD40 Domänen verantwortlich für die von Tot1p vermittelte Interaktion ist. Dazu wurde folgender Stammhintergrund gewählt: *TOT3-(c-myc)<sub>3</sub>/tot2Δ1-4(HA)<sub>6</sub>*. Bei den Verkürzungen an Tot2p handelt es sich um identische c-terminale Deletionen wie oben beschrieben. Der Unterschied ist, daß die *TOT2* Gendeletionen im Hefegenom vorliegen und nicht plasmid kodiert sind. Auch hier wurde die Expression der verkürzten Tot2p Proteine überprüft und nachgewiesen (Abb. 36A). Wie in der

Abb. 36A zu sehen ist, liegt das c-terminal um die sechste, siebte und achte WD40 Domäne verkürzte Tot2p Protein in einer deutlich geringeren Menge im Gesamtproteinextrakt vor, als ohne c-terminale Deletion. Zur Überraschung führt auch hier schon die erste c-terminale *TOT2* Deletion ( $\Delta 689-788aa$ ) fast zum vollständigen Verlust der Protein-Protein Interaktion zwischen Tot2p, Tot3p und Tot1p (Abb. 36B). Die Deletion der achten und siebten WD40 Domäne führt zu keiner weiteren Veränderung. Deletion der achten, siebten und sechsten WD40 Domänen, hebt die Tot2p Protein Interaktion völlig auf (Abb. 36B).



**Abb. 36:** Die Auswirkung der c-terminalen Verkürzungen des Tot2p Proteins auf die Interaktion zwischen Tot2p und dem Tot1p und Tot3p Protein. **(A)** Western-Blot Analyse. Nachweis der Expression der c-terminal HA markierten und verkürzten Tot2p Proteine im Gesamtproteinextrakt. **(B)** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immünpräzipitation mit den c-terminal HA markierten und verkürzten Tot2p Proteine. **(C)** Parallel Western-Blot Analyse der Co-Immünpräzipitation mit dem vollständig deletierten *TOT2* Gen. Die Positionen der Totp Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte (MWM) sind in kDa angegeben.

Daraus folgt, daß für eine stabile Interaktion zwischen Tot2p und Tot1p/Tot3p die 100 c-terminalen Aminosäuren ( $\Delta 689-788aa$ ) von Tot2p benötigt werden. Auch die vollständige Deletion von Tot2p hat keinerlei Auswirkung auf die Interaktion zwischen Tot1p und Tot3p (Abb. 36C). Daraus folgt, daß Tot1p direkt an Tot3p bindet und für deren Interaktion Tot2p nicht benötigt wird.

Zur besseren Übersicht, sind die Ergebnisse der Interaktionsstudien der einzelnen Elongator-Untereinheiten noch einmal tabellarisch auf Seite 85 dargestellt (Tab. 7).

**Tab. 7:** Übersicht über die Epitop markierten Deletions-Stämme und ihre Bindefähigkeit im Elongatorkomplex.

Detektierte Genprodukte	Disruptiertes Gen	Interaktion der detektierten Genprodukte
<i>TOT2myc/TOT3HA</i>	<i>tot1Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot1Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT5HA</i>	<i>tot1Δ</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>tot1Δ</i>	ja
<i>TOT3myc/TOT5HA</i>	<i>tot1Δ</i>	nein
<i>TOT4myc/TOT5HA</i>	<i>tot1Δ</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>tot2Δ</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT5HA</i>	<i>tot2Δ</i>	ja
<i>TOT4myc/TOT5HA</i>	<i>tot2Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT1HA</i>	<i>tot3Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot3Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT5HA</i>	<i>tot3Δ</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT1HA</i>	<i>tot4Δ</i>	ja
<i>TOT3myc/TOT2HA</i>	<i>tot4Δ</i>	ja
<i>TOT3myc/TOT5HA</i>	<i>tot4Δ</i>	ja
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>tot5Δ</i>	ja
<i>TOT2myc/TOT5HA</i>	<i>tot6Δ</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT5HA</i>	<i>tot6Δ</i>	nein
<i>TOT4myc/TOT5HA</i>	<i>tot6Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT5HA</i>	<i>tot7Δ</i>	nein
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot1-1Δ(1229-1349aa)</i>	ja
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot1-2Δ(1129-1349aa)</i>	schwach
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot1-3Δ(1029-1349aa)</i>	sehr schwach
<i>TOT2myc/TOT4HA</i>	<i>tot1-4Δ(929-1349aa)</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>TOT2-1Δ(689-788aa)</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>TOT2-2Δ(639-788aa)</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>TOT2-3Δ(600-788aa)</i>	nein
<i>TOT3myc/TOT4HA</i>	<i>TOT2-4Δ(550-788aa)</i>	nein
<i>TOT3myc/ TOT2-1Δ(689-788aa)HA</i>		schwach
<i>TOT3myc/ TOT2-2Δ(639-788aa)HA</i>		schwach
<i>TOT3myc/ TOT2-3Δ(600-788aa)HA</i>		schwach
<i>TOT3myc/ TOT2-4Δ(550-788aa)HA</i>		sehr schwach

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifikation der *TOT* Gene & Analyse der Phänotypen

Das Zymocin von *K. lactis* wirkt gegen eine Reihe von Hefen einschließlich der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zytostatisch. Obwohl bis heute die Wirkungsweise des Zymocins immer noch unklar ist, konnten resistente *S. cerevisiae* Mutanten (*skt*, *iki* und *kfi*) isoliert werden (Kawamoto et al. 1990; Butler et al. 1994; Kishida et al. 1996). Mit der Klonierung und konditionalen Expression des  $\gamma$ -Toxins durch einen induzierbaren Promotor war es möglich, diese resistenten Mutanten in zwei Klassen einzuteilen, die Toxin Aufnahme (= Klasse-I) und die mit veränderten intrazellulären Toxintargetprozeß (= Klasse-II) Von der Klasse-II gibt es gegenwärtig zehn verschiedene *kfi*-Mutanten die nicht miteinander komplementierbar sind (Butler et al. 1994). Die hohe Anzahl an Klasse-II resistenten Mutanten deuteten auf eine sehr komplexe Wirkungsweise des  $\gamma$ -Toxins hin. Es könnte sich dabei um einen biochemischen Signalweg handeln, der blockiert wird, oder um einen möglichen Zielkomplex der aus verschiedene Komponenten besteht. Um die betroffenen Gene der Klasse-II Mutanten zu identifizieren, wurde eine mTn3 markierte Disruptionsgenbank von *S. cerevisiae* genetisch durchsucht (Abb. 4). Mit Hilfe dieser mTn3 Disruptionsgenbank konnten drei *tot1-3::mTn3* Integrianten gefunden werden, die den Toxin resistenten Phänotyp und weitere gemeinsame Merkmale zeigen. Anhand der Phänotypen sind die drei *tot1-3::mTn3* Integrianten nicht zu unterscheiden. Dies läßt auf einen Funktionsverlust der *tot1-3::mTn3* Integrianten schließen. Durch Vektorette PCR war es möglich, die mTn3 Insertionen im Genom zu lokalisieren (Abb. 5). Aufgrund der Tatsache, daß von den vielen resistenten *kfi*-Mutanten die noch nicht Charakterisiert sind, durch die mTn3 Mutagenese nur drei resistente mTn3 Integrianten gefunden wurde, könnte vermutlich an eine eventuelle Unterrepräsentation der mTn3 Genbank gelegen haben. Eine weitere Möglichkeit für den geringen Erfolg der mTn3 Genbank Suche könnten mTn3 Mehrfachintegrationen gewesen sein in deren Verlauf durch die Vektorette PCR nicht alle Mehrfachintegrationen in eine Zelle nachgewiesen werden konnte. Des weiteren hätte eine Komplementationsanalyse der mTn3 Intergranten mit den *kfi*-Mutanten sicher zu mehr Erfolg geführt. Durch die anschließende PCR vermittelte Disruption dieser Gene, konnten diese Gene als die möglichen  $\gamma$ -**T**oxin **T**argets *TOT1-3* Gene identifiziert werden. Zusätzlich wurden zwei weitere Gene (*KTI12* und *IKI1*) von

denen vorher berichtet wurde, daß sie mutiert ebenfalls zur Holo-Zymocin Resistenz führen (Butler et al. 1994; Yajima et al. 1997), individuell disruptiert: *KTI12 (TOT4)* und *IKI1 (TOT5)* (Frohloff et al. 2001). Diese zwei zusätzlichen *TOT* Gene weisen bei ihrer Disruption genau die gleichen phänotypischen Merkmale auf und sind somit phänotypisch nicht von den *tot1-3Δ* Zellen zu unterscheiden. Genetisch sind diese gleichen Phänotypen ein Hinweis, daß die Tot4p und Tot5p Proteine weitere Bestandteile des Elongator-Komplexes sind. Weitere phänotypische Untersuchungen haben ergeben, daß alle disruptierten *TOT1-5* Gene die gleichen Phänotypen aufweisen (Abb. 6). In Verbindung mit Zymocin- und der  $\gamma$ -Toxinresistenz zeigen alle *tot1-5Δ* Zellen langsames Wachstum, Thermosensitivität über 38°C (Abb. 8) und sie sind alle hypersensitiv gegen Calcofluor White, Caffein und 6-Azaurazil (Abb. 9). Auch die Tatsache, daß keiner dieser Phänotypen sich bei Kombination von *totΔ/totΔ* Doppelmutationen verändert (Abb. 10), könnte genetisch als Funktionsverwandtheit der *TOT1-5* Gene interpretiert werden. Gleiche Phänotypen unterstützen genetisch, daß die *TOT* Genprodukte funktionell miteinander verwandt sind oder zusammen einen funktionellen Komplex bilden (= Ziel-Komplex Hypothese). Durch die parallele Identifikation der *TOT* Gene als *ELP1/IKI3*, *ELP2* und *ELP3* Strukturgene, die für den Elongator-Komplex der RNA-Polymerase-II kodieren, konnte gezeigt werden, daß die *ELP1-3/TOT1-3* Genprodukte tatsächlich in einen Proteinkomplex vorliegen (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999). Diese Tatsache unterstützt wesentlich die vermeintliche Ziel-Komplex-Hypothese. Durch eigene Co-Immundefizite konnte gezeigt werden, daß der vermeintliche  $\gamma$ -Toxin Ziel-Komplex, TOT, zusätzlich zu den bekannten Elongator-Komponenten Tot1-3p (Elp1-3p), aus zwei weiteren Bestandteilen besteht, die von den Genen *TOT4 (KTI12)* und *TOT5 (IKI1)* kodiert werden (Abb. 25 & 26).

#### **4.1.1 Disruption der *TOT6* und *TOT7* Gene**

Ursprünglich wurde berichtet, daß der RNA-Polymerase-II Elongator-Komplex nur aus den drei Untereinheiten Elp1p (Tot1p), Elp2p (Tot2p) und Elp3p (Tot3p) besteht (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000). In dieser Studie konnte jedoch genetisch und biochemisch gezeigt werden, daß der Elongator-Komplex aus zwei weiteren Proteinen, Tot4p und Tot5p besteht (Abb. 25 & 26). Schließlich konnte dies bestätigt werden, indem nachgewiesen wurde, daß der Elongator-Komplex aus den zwei Subkomplexen, den Core-Komplex Tot1p (Elp1p),

Tot2p (Elp2p), Tot3p (Elp3p) und den HAP-Komplex Tot5p(Elp4p). Tot6p (Elp5p), Tot7p (Elp6p) besteht (Li et al. 2001; Winkler et al. 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß es zwei weitere *TOT* Gene gibt, die nach ihrer Deletion (*tot6Δ* und *tot7Δ*) ebenfalls Resistenz gegenüber dem *K. lactis* Zymocin verleihen (Abb. 11). Im Vergleich zu den *tot1-5Δ* Zellen führt der Verlust der *TOT6* und *TOT7* Gene ebenfalls zu den typischen *tot*-Phänotypen (Abb. 13 & 14). Diese identischen Phänotypen liefern einen weiteren genetischen Beweis dafür, daß die *TOT* Genprodukte alle funktionell miteinander verwandt sind. Biochemisch konnte durch Co-Immünpräzipitation gezeigt werden, daß Tot1p, Tot2p, Tot3p, Tot4p und Tot5p einen großen Multiprotein-Komplex angehören. Jedoch konnte bisher nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden, daß Tot4p ebenfalls mit dem Elongator-Komplex assoziiert, obwohl dies zweifellos aus dem Co-Immünexperimenten hervorgeht (Abb. 25 & 26). Möglicherweise liegt der Grund darin, daß die Aufreinigung des Komplexes durch Co-Immünpräzipitation weniger stringent ist. Die Isolierung der elongierenden RNA Polymerase-II in Assoziation mit dem Elongator (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000) erforderte eine sehr stringente Aufreinigung, was möglicherweise zum Verlust von Tot4p führte. Es ist jedoch weiterhin unklar, Elongator tatsächlich an ein RNA Polymerase-II Partnerkomplex ist. Zwar konnte der Elongator, bestehend aus den Proteinen Elp1p (Tot1p), Elp3p (Tot2p) und Elp3p (Tot3p), mit der RNA Polymerase-II isoliert werden (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000), jedoch wurde dies nicht von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Allerdings wurde der Elongator dabei mit Hilfe eines TAP-Tag isoliert und aufgereinigt, was dazu führte, daß die RNA Polymerase II nicht mitisoliert werden konnte. So konnte der Komplex hauptsächlich nur im Zytoplasma nachgewiesen werden und nicht im Zellkern an der RNA Polymerase-II (Krogan & Greenblatt 2001). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, daß das Tot1p an seinem C-Terminus eine funktionelle NLS-Sequenz besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß es mit dieser NLS-Sequenz möglich ist, GFP *in vivo* erfolgreich in den Zellkern zu transportieren (Fichtner et al. 2003) Auf diese Weise konnte die Funktionalität der NLS-Sequenz bewiesen werden. Möglicherweise wird dadurch das Tot1p oder möglicherweise ein vor assemblierter Elongator-Komplex über den Zellkerneintransport reguliert und kontrolliert. Des weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, daß die NLS Sequenz für die Elongator Integrität nicht benötigt wird und somit tatsächlich einzig allein für die Zellkernttransport benötigt wird (Fichtner et

al. 2002b). In neusten Untersuchungen war es möglich zu zeigen, daß der Elongator sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an RNA binden kann. Mit Hilfe von RNA-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß der Elongator an verschiedenen aktiv transkribierten Genen vorhanden ist und mit der entstehenden RNA der elongierenden RNA pol II assoziiert ist. Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis für die Rolle des Elongators in der Transkriptions-Elongation (Gilbert et al. 2004). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß es sehr wahrscheinlich ist, daß der Elongator-Komplex seinen Wirkungsort im Zellkern und an der elongierenden RNA pol II hat.

#### **4.2 Homologe Totp Proteine in anderen Organismen**

In allen wichtigen Modell-Organismen gibt es von den Totp Proteinen signifikant homologe Proteine. So konnte der Elongator-Komplex neben *S. cerevisiae*, auch aus den HeLa-Zellen von *H. sapiens* isoliert werden (Hawkes et al. 2002). Diese Tatsache spiegelt die Wichtigkeit der Totp Proteine und des Elongators wieder. Von Tot1p konnte gezeigt werden, daß es von *H. sapiens* bis zu den Archebakterien *Methanopyrus kandleri* (Nelissen et al. 2003) und *Methanococcus jannaschii* (diese Studie) konserviert ist. Das Tot1p Protein von *S. cerevisiae* ist homolog zu dem IKAP Scaffold Protein von *H. sapiens*, das drei unterschiedliche Kinasen reguliert (Cohen et al. 1998). Von dem IKAP Protein in *H. sapiens* konnte nachgewiesen werden, daß eine Mutation in ihm für die Dysautonomie Krankheit verantwortlich ist. Demnach verursacht eine Mutation in einer Spleißstelle des IKAP Gens ein verkürztes IKAP Protein, daß dann zu einer Mißbildung und fortschreitenden Abbau des sensorischen und autonomen Nervensystems führt. Das führt dazu, daß nur 50% der erkrankten Personen das 30. Lebensjahr erreichen (Slaugenhaupt et al. 2001). Eine weitere interessante Verbindung zwischen dem Elongator und Krankheitsursachen besteht darin, daß Aminosäure-Substitutionen im IKAP Genprodukt signifikant das Asthmarisiko bei Kindern erhöht (Takeoka et al. 2001). Das zeigt, daß eine Dysfunktion von Tot1p zu schweren Funktionsstörungen in höheren Organismen führt. Das Tot4p Pflanzenhomolog DRL1 (**D**eformed **R**oots and **L**eafs) wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Elongator-Funktion diskutiert. So verursacht eine Mutation im DRL1 Gen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* schwere Organfehlentwicklungen der Wurzel und Blätter (Nelissen et al. 2003).

Wie die anderen Totp Proteine, kommt das Tot2p auch in allen wichtigen Modell-Organismen vor. Tot2p weist in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz acht WD40 Domänen auf (Fellows et al. 2000). Die hohe Anzahl der WD40 Domänen in Tot2p könnte ein Hinweis darauf sein, daß Tot2p nur strukturelle Funktionen besitzt. Neuste Befunde haben gezeigt, daß Tot2p für die enzymatische Funktion des Holo-Elongators eine weniger wichtige Rolle einzunehmen scheint. Es konnte nachgewiesen werden, daß Tot2p für die HAT-Aktivität des Elongators-Komplex *in vitro* entbehrlich ist (Petrakis et al. 2004). Demnach scheint Tot2p ein mehr für Protein-Protein Interaktionen verantwortliches Protein zu sein. Tot2p hat demnach keine Auswirkung auf die Integrität der restlichen Elongatorproteine im Elongator-Komplex, weil die HAT-Funktion durch das Fehlen von Tot2p ungestört ist. Es ist daher zu vermuten, daß Tot2p im Elongator-Komplex eine randständige Position einnimmt. Möglicherweise ist Tot2p verantwortlich für die Bindung von Elongator assoziierten Proteinen wie Tot4p oder Kti11p oder bisher noch unbekanntem Proteine. Vorstellbar wäre auch, daß Tot2p die Bindung zwischen dem Elongator-Komplex und der RNA pol-II vermittelt.

Tot3p ist das am höchsten konservierte Totp Protein und konnte als eine Histonacetyltransferase (HAT) identifiziert werden, die mit dem Gcn5p Protein aus *S. cerevisiae* verwandt ist (Wittschieben et al. 1999). Für die Funktion des restlichen hochkonservierten Bereichs gibt es nur einzig und allein den Hinweis, daß in dieser Studie gezeigt werden konnte, daß Tot3p neben der HAT-Funktion auch eine Protein-Protein Binfunktion besitzt, die wichtig für die Elongator-Integrität ist (Fichtner et al. 2002b & Petrakis et al. 2004). Die HAT-Aktivität konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Wittschieben et al. 2000). Ebenso war es möglich zu zeigen, daß der Elongator-Komplex für die Acetylierung der Histone H3 und H4 *in vivo* benötigt wird (Winkler et al. 2002). *In vitro* konnte die Acetylierung der N-terminalen Aminosäuren Lysin-14 am Histon H3 und Lysin-8 am Histon H4 nachgewiesen werden (Winkler et al. 2002). Wie diese Studie zeigt, sind die Acetylierungen der N-terminalen Aminosäuren Lysin-14 am Histon H3 und Lysin-8 am Histon H4 nicht für die Zymocin-Wirkung relevant. Demnach muß der Elongator-Komplex noch weitere bisher noch unbekannte Substrate haben, die Zymocin relevant sind. Des weiteren ist es unklar, welche Rolle die restlichen Totp Proteine für die HAT-Aktivität spielen. Sie könnten unter anderem ebenfalls wichtig für die HAT-Aktivität sein oder auch regulatorische Funktionen für die HAT-Aktivität von Tot3p

ausüben. Auch eine Einbindung der Totp Proteine in der HAT-Substrat-Erkennung oder in der Substrat-Bindung wäre denkbar. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die gemeinsamen Phänotypen der *tot1-7Δ* Zellen sein. Unklar ist weiterhin auch, welche Funktion die HAT-Aktivität für die Wirkungsweise des  $\gamma$ -Toxin hat.

Auch das Tot4p Protein konnte von allen Totp Proteinen in den meisten der bisher sequenzierten Organismen gefunden werden (Abb. 16). Neben Tot1p konnte von Tot4p ebenfalls in dem Prokaryonten Archaeobakterium *Methanocaldococcus jannaschii* ein signifikant homologes Tot4p Protein gefunden werden (Bult et al. 1996). Somit ist das Tot4p Protein von allen anderen Totp Proteinen das zweite, das bis zu den Prokaryonten konserviert vorliegt. Aus der Tatsache, daß sowohl der Verlust als auch die Multikopie von Tot4p keine Außwirkung auf die Integrität des Elongator-Komplex hat, läßt vermuten, daß Tot4p im Elongator-Komplex eine Randständige Position einnimmt. Außer einer möglichen Elongator-Funktion gibt es bisher keine weiteren Hinweise für die Funktion des Tot4p Proteins. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, ob Tot4 ebenfalls für die HAT-Funktion des Elongator-Komplex wichtig ist.

Interessanterweise scheint jedoch nicht der gesamte Elongator-Komplex in der Evolution konserviert zu sein. So gibt es von dem Tot5p Protein allein nur in *S. pombe* ein signifikant homologes Protein (Abb. 44). Mehr noch, von dem Tot6p Protein gibt es überhaupt kein signifikant homologes Protein in allen anderen Modellorganismen. Das Tot7p Protein ist wieder unter mehreren Modell-Organismen vertreten. Jedoch ist es nicht bei sämtlichen Modell-Organismen vertreten (Abb. 45). Das könnte ein Hinweis sein, daß Tot7p ebenfalls in der Natur weniger konserviert ist. Insgesamt ist es auffällig, daß die Totp Proteine durch ihre Konservierung in grob zwei Gruppen, den stark konservierten (Tot1p, Tot2p, Tot3p und Tot4p) und den schwach konservierten (Tot5p, Tot6p und Tot7p) Proteinen eingeteilt werden können. Das zeigt, daß es bei den anderen Organismen nur einen Komplex, bestehend aus Tot1p, Tot2p, Tot3p, Tot4p und Tot7p zu geben scheint. Jedoch könnte es möglich sein, daß die fehlenden Tot5p und Tot6p Proteine durch andere Proteine im Komplex ersetzt worden sind. *S. cerevisiae* hat sich demnach mit den Proteinen Tot5p und Tot6p getrennt von den anderen Organismen entwickelt. Möglicherweise könnte dies in der Wirkungsweise des Zymocins eine Rolle spielen. So könnte das ein Hinweis sein, daß die Proteine Tot5p und Tot6p vielleicht die Zielproteine für das Zymocins im Elongator-Komplex sein könnten. Da das *K. lactis* Zymocin nicht gegen alle

Organismen zytostatisch wirkt, könnte der Grund vielleicht in dem Fehlen der Tot5p und Tot6p Proteine liegen. So könnte das Fehlen von Tot5p und Tot6p im Elongator-Komplex anderer Organismen, vielleicht die Resistenz gegenüber dem Zymocin erklären.

### 4.3 Die Histonacetyltransferasen (HATs) der Hefezelle

Das Zymocin kann nicht einen Stillstand des Zellwachstums erreichen, indem es einfach den Elongator-Komplex inaktiviert. Sonst würden die *tot1-7Δ* Null-Mutationen ausreichen, um einen G1-Arrest zu induzieren. Trotzdem benötigen sensitive *S. cerevisiae* Zellen einen funktionellen Elongator-Komplex, einschließlich der enzymatischen HAT-Aktivität, um auf das *K. lactis* Zymocin sensitiv zu reagieren. Daß der Elongator und seine HAT-Aktivität für die Funktion des Zymocins benötigt wird, wird durch die genetische Beobachtung unterstützt, daß Hefezellen die keine Histonacetyltransferasen (*gcn5Δ*, *hpa3Δ*, *hat1Δ* und *sas2Δ*) oder keine Transkriptions- und Elongations-Faktoren (*dst1Δ* und *spt4Δ*) besitzen, nicht in der Lage sind, die Sensitivität zu beeinflussen, wie es *tot1-7Δ* Zellen möglich ist (Abb. 20) (Frohloff et al. 2001 & Jablonowski et al. 2001b). Aufgrund dieser Tatsache können auch gemeinsame überlappenden Rollen der HAT-Funktionen, wie sie der SAGA-Komplex und der Elongator-Komplex besitzen (Wittschieben et al. 2000), genetisch für die Zymocin-Wirkung ausgeschlossen werden.

#### 4.3.1 Die HAT-Aktivität von Tot3p

Obwohl alle *TOT* Gene nicht essentiell sind, führt deren Deletion zu den *tot*-Phänotypen (Frohloff et al. 2001). Woraus sich schließen läßt, daß die HAT-Aktivität des Elongator-Komplex verloren geht. Durch die Einführung von zwei *TOT3* Allelen in einen *tot3Δ* Stamm, die in der HAT Domäne mutiert sind und eine reduzierte HAT-Aktivität verglichen mit dem Wildtyp von < 25% und ~35% besitzen, konnte gezeigt werden, daß die HAT-Aktivität für die Elongator-Funktion *in vivo* essentiell ist (Wittschieben et al. 2000). Interessanterweise führt schon diese Reduktion der enzymatischen HAT-Funktion, zu den typischen *tot*-Phänotypen einschließlich der Zymocin-Resistenz. Dadurch wird deutlich wie wichtig allein die enzymatische HAT-Funktion für die Zymocin-Wirkung ist. Das zeigt, daß die enzymatische HAT-Funktion des Elongators essentiell für die Sensitivität gegen  $\gamma$ -Toxin und leben unter Streß ist. Darüber hinaus konnte durch Punktmutationen außerhalb der HAT-Domäne von

*TOT3* gezeigt werden, daß der Zymocin-Resistenz Phänotyp von den anderen Phänotypen abtrennbar ist (Jablonowski et al. 2001b). So sind die Punktmutanten zwar Zymocin-Resistent, verhalten sich aber nach den anderen Phänotypen wie Wildtypzellen. Das zeigt genetisch, daß die HAT-Aktivität des Elongators weiterhin wie im Wildtyp aktiv ist. Daraus kann möglicherweise geschlossen werden, daß das  $\gamma$ -Toxin durch die Punktmutationen im *TOT3* Gen nicht mehr in der Lage ist, direkt oder indirekt an den Elongator bzw. Tot3p zu binden. Dadurch kann das  $\gamma$ -Toxin in der Zelle nicht mehr seine Wirkung entfalten und führt somit zur Resistenz der Zelle gegenüber dem  $\gamma$ -Toxin. Ebenso kann durch das Ergebnis der Punktmutationen ausgeschlossen werden, daß die  $\gamma$ -Toxin Resistenz durch das Fehlen von Elongator abhängigen Genprodukten verursacht wird. Wäre beispielsweise der Elongator notwendig für die Transkription von Elongator abhängigen Genen, würden durch das Fehlen eines funktionellen Elongators auch die Elongator abhängige Genprodukte fehlen. Das Fehlen der Elongator abhängigen Genprodukte könnte dann zur Zymocin-Resistenz führen. Da durch die Punktmutationen ein funktioneller Elongator aber weiterhin noch vorhanden ist, sind auch die möglichen Elongator abhängigen Genprodukte noch vorhanden. Damit kann ausgeschlossen werden, daß Elongator abhängige Gene für die Resistenz bzw. Sensitivität verantwortlich sind. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß durch das Fehlen des Elongators die Transkription von Elongator abhängigen Genen herunterreguliert werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Zymocin-Wirkung benötigte HAT-Aktivität wäre, daß  $\gamma$ -Toxin selbst das Substrat der Acetylierung von Tot3p sein könnte, um seine Toxizität in der Zelle zu entfalten. Demnach wäre das  $\gamma$ -Toxin erst nach seiner Acetylierung in der Zelle toxisch. Auf diese Weise könnte die fehlende oder reduzierte HAT-Aktivität die zur  $\gamma$ -Toxin Resistenz führt ebenfalls erklärt werden.

#### **4.3.2 N-terminale Histon H3 und H4 Mutationen**

Nachdem Reduktion der HAT-Aktivität Resistenz gegen Zymocin hervorruft, stellte sich die Frage nach dem Zymocin relevanten Substrat der HAT. Die vorherrschenden Acetylierungspositionen des Elongators sind die N-terminalen Enden der Histone H3 und H4. Das Histon H3 wird am Lysin-14 und Histon H4 wird am Lysin-8 acetyliert (Winkler et al. 2002). Die Teildeletion des N-Terminus Histon H3 und Histon H4 oder der Austausch von Lysinen die von der HAT acetyliert werden oder die Deposition des Nukleosoms um die Acetylierung zu verhindern oder eine Acetylierung

vortäuschen hat in der Wildtyp Zelle wie auch in der *tot3Δ* Deletions Mutante keinerlei Auswirkung auf die Sensitivität bzw. Resistenz gegen Zymocin (Abb. 22). Daraus kann man schließen, daß die Substrate des Elongator-Komplexes die Histone H3 und H4 keine Zymocin relevanten Substrate darstellen. Denkbar ist, daß die HAT-Funktion von Tot3p neben Histone weitere bisher noch unbekannte Proteinsubstrate acetyliert. Wären die N-Termini von Histon H3 und H4 das einzigste Elongator Substrat könnte man erwarten, daß diese, falls lebensfähige, Veränderungen im Wildtyp ebenfalls Schutz gegen Zymocin bieten sollten. Dies würde einer Fehlfunktion des Elongator-Komplex und der HAT-Funktion gleichkommen und sollte logischerweise zur Zymocin-Resistenz führen. Da dies jedoch nicht der Fall ist und die Wildtyp-Zellen weiterhin sensitiv sind, ist anzunehmen, daß die HAT-Funktion von Tot3p mögliche weitere bisher noch unbekannte Substrate hat, die möglicherweise für die Zymocin-Wirkung relevant sind.

#### 4.4 Erhöhte Gendosis der *TOT* Gene

Wie schon in einer vorherigen Studie gezeigt werden konnte, führt eine Erhöhung der Kopienzahl von *TOT4* zur Resistenz gegen Zymocin (Butler et al. 1994). Da die Phänotypen der *tot1-7Δ* Zellen alle gleich sind (Frohloff et al. 2001; Jablonowski et al. 2001b; Winkler et al. 2001), wurde auch das Verhalten der erhöhten Kopienzahl der *TOT1-7* Gene auf Zymocin-Resistenz überprüft. Von allen *TOT* Genen, führt jedoch nur die erhöhte Kopienzahl des *TOT4* Gens zur Resistenz (Abb. 17) (Fichtner et al. 2002a). Alle anderen *TOT* Gene verhalten sich weiterhin sensitiv gegen Zymocin (Abb. 17). Außer der Resistenz gegen  $\gamma$ -Toxin führt die erhöhte *TOT4* Kopienzahl insgesamt zu einem sehr leichten *tot* Phänotyp. So ist das Wachstum bei 30°C bzw. 38°C nicht vom Wildtyp unterscheidbar, lediglich die Caffein- und CW-Sensitivität ist minimal stärker ausgeprägt im Vergleich zum Wildtyp (Fichtner et al. 2002a). Das zeigt, daß möglicherweise die Elongator-Funktion durch die erhöhte Gendosis leicht beeinträchtigt wird. Der Grad der  $\gamma$ -Toxin Resistenz durch die erhöhte *TOT4* Kopienzahl unterscheidet sich deutlich von dem Verlust der *TOT4* Funktion. So wird die Resistenz der Multikopie *TOT4* Zellen gegenüber dem  $\gamma$ -Toxin deutlich langsamer ausgeprägt (Fichtner et al. 2002a). Das zeigt, daß *TOT4* Teil des Elongator-Komplex ist und/oder ihn in seiner Funktion beeinflusst oder reguliert. Trotzdem konnte das Tot4p Protein bis jetzt nicht als Teil des Elongator-Untereinheit

durch Massenspektroskopie identifiziert werden (Winkler et al. 2001). Jedoch konnte in dieser Studie eine Interaktionen von Tot2p-Tot4p, Tot3p-Tot4p und Tot4p-Tot5p biochemisch durch Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 25 & 26). Folglich gibt es eine Interaktion von *Tot4p* mit dem Elongator-Komplex. Das zeigt, daß *TOT4* eine Funktion im physikalischen Kontakt mit dem Elongator hat und möglicherweise den Elongator-Komplex dadurch beeinflussen oder regulieren kann. Auf Grund der Tatsache, daß *TOT4* wichtig für Sensitivität ist und Verlust von *TOT4* sowie hohe Gendosis von *TOT4* zur Zymocin-Resistenz führen, wurden zwei Modelle formuliert (Butler et al. 1994). Das einfachere Modell geht davon aus, daß Tot4p direkt mit  $\gamma$ -Toxin interagiert und der Verlust der *TOT4* Funktion die Bindung und die Wirkung des  $\gamma$ -Toxins verhindert. Die erhöhte Kopienzahl von *TOT4* führt zu einen Überschuß an Tot4p, der das  $\gamma$ -Toxin abfangen und so das toxische Potential aus titrieren kann. Auf diese Weise können die noch verbleibenden freien Tot4p Proteine ihre Funktion am Elongator weiter ausüben. Diese verminderte Anzahl der noch freien Tot4 Proteine würde somit auch die verminderte Elongator-Funktion und die damit verbundenen schwächeren *tot* Phänotypen erklären. Andererseits müßte dann eine Erhöhung des  $\gamma$ -Toxins bei hoher *TOT4* Dosis die Sensitivität gegen  $\gamma$ -Toxin wiederherstellen. Bisher konnte jedoch durch eine Zwei-Hybrid-Suche kein Interaktionspartner vom  $\gamma$ -Toxin gefunden werden (Fichtner et al. 2002a). Daraus läßt sich vielleicht schließen, daß es keinen direkten Kontakt zwischen  $\gamma$ -Toxin und Tot4p gibt. Wenn  $\gamma$ -Toxin und Tot4p nicht miteinander interagieren, wie könnten dann die gefundenen Ergebnisse mit einem anderen Modell interpretiert werden? Das zweite Modell (das Indirekte Modell), geht davon aus, daß Tot4p Teil des Elongator-Komplex ist und die Wirkung des  $\gamma$ -Toxins dessen Aufbau unabhängig von Tot4p beeinflusst (Butler et al. 1994). Nach diesem Modell beeinträchtigt der Verlust von *TOT4* die Elongator-Assemblierung und führt somit zur  $\gamma$ -Toxin Resistenz. Des weiteren geht man davon aus, daß der Überschuß an Tot4p die Stöchiometrie der Elongator Untereinheiten stört und dadurch dann zur Resistenz führt. Im Gegensatz dazu konnten die Protein-Protein Interaktionen von Tot1p-Tot3p, Tot2p-Tot3p, Tot3p-Tot5p und die somit verbundene strukturelle Unversehrtheit des Elongators durch das Fehlen von *TOT4* nicht gestört werden (Fichtner et al. 2002a). Das beweist, daß Tot4p keine strukturelle Rolle als Elongator-Untereinheit im Aufbau des Elongators spielt. Stattdessen könnte *TOT4* vielleicht eine wichtige regulatorische Rolle für den Elongator spielen. Dies würde dann einen vorübergehenden Kontakt von Tot4p mit

dem Elongator-Komplex erklären. Wenn der Elongator-Komplex Teil der elongierenden RNA-Polymerase-II ist (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000), könnte die *TOT4* Funktion eine Rolle für die Vermittlung der Bindung des Elongators an die RNA-Polymerase-II haben und daß könnte dann immer noch auf das zweite Modell angewandt werden. Wenn die Bindung des Elongators an die RNA-Polymerase-II durch das Fehlen von *TOT4* verhindert wird, ist möglicherweise auch die Chromatin relevante HAT-Funktion des Elongators *in vivo* gestört. Dies könnte dann zu die typischen *tot4Δ* Phänotypen einschließlich Zymocin Resistenz erklären. Es wäre aber auch vorstellbar, daß durch den Überschuß von Tot4p die Bindestelle des Elongators an der RNA-Polymerase-II von freien unassemblierten Tot4p Proteinen besetzt wird und somit kein korrekt assemblierter Elongator-Komplex mehr an die RNA-Polymerase-II binden könnte. Auf diese Weise würde freies Tot4p mit den Elongator assemblierten Tot4p um die RNA-Polymerase-II Bindestelle konkurrieren. Die Folge wäre dann ebenfalls die intermediären *tot* Phänotypen mit der verminderten  $\gamma$ -Toxin Resistenz.

#### 4.5 Nachweis und Co-Immunpräzipitation der Totp Proteine

Mit Hilfe der *in vivo* Epitop Markierung (Knop et al. 1999) der *TOT* Gene war es möglich die Genprodukte auf Proteinebene zu identifizieren und zu charakterisieren. Ursprünglich wurde berichtet, daß der Elongator nur aus drei Untereinheiten besteht (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000). Mit Hilfe Co-Immunpräzipitation konnte jedoch in dieser Studie gezeigt werden, daß die Tot1p, Tot2p, Tot3p, Tot4p, Tot5p, und Tot6p Proteine in einem Multiproteinkomplex miteinander verbunden sind. Dieser Befund stimmt auch mit den identischen Phänotypen der *tot1-7Δ* Zellen überein. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß dieser Proteinkomplex aus zwei Subkomplexen dem Core-Elongator Elp1p (Tot1p), Elp2p (Tot2p) und Elp3p (Tot3p) und dem HAP-Komplex Elp4p (Tot5p), Elp5p (Tot6p) und Elp6p (Tot7p) besteht (Winkler et al. 2001; Li et al. 2001). Diese zwei Subkomplexe bilden zusammen den Holo-Elongator (Winkler et al. 2001; Li et al. 2001). Zwischenzeitlich konnte dieser Holo-Elongator auch von drei weiteren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander nachgewiesen werden (Li et al. 2001; Winkler et al. 2001; Krogan et al. 2001). Jedoch konnte keine dieser Arbeitsgruppen Tot4p als Elongator-Komponente bisher nicht nachweisen. Durch die Co-Immunexperimente geht zweifellos hervor, daß Tot4p mit dem Elongator-Komplex

assoziiert (Abb. 25 & 26). Möglicherweise liegt der Grund, daß dies nicht bestätigt werden konnte darin, daß die Methode der Elongator-Aufreinigung durch Co-Immunpräzipitation weniger stringent ist als die Affinitätschromatographie mit denen die zwei Subkomplexe nachgewiesen werden konnten (Winkler et al. 2001; Li et al. 2001; Krogan et al. 2001).

#### 4.6 Immunlokalisierung der Tot1-4p Proteine in der Hefezelle

Um nachzuweisen, wo die Tot1-4p Proteine in der Hefezelle lokalisiert sind, wurde mit Hilfe der *in vivo* HA-Epitop-Markierten *TOT1-4* Genen eine Immunlokalisierung durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß die Proteine des Core-Elongators hauptsächlich im Zytoplasma der Hefezelle lokalisiert sind (Abb. 24) (Fichtner et al. 2002b; Pokholok et al. 2002). Dieses Ergebnis stimmt mit dem humanen Elongator überein (Elp1p-Elp3p), der sich ebenfalls hauptsächlich im Zytoplasma befindet (Hawkes et al. 2002; Kim et al. 2002). Daß die Tot1-4p Proteine sich auch im Zellkern befinden, konnte durch die obige Immunlokalisierung nicht nachgewiesen werden, weil die im Zytoplasma befindlichen Epitop-Markierten und gefärbten Totp Proteine den Zellkern überdecken. Durch die Tatsache, daß der Elongator an Promotor-Regionen bindet und sich nicht mit kodierenden Genregionen immunpräzipitieren lassen, wie es mit anderen transkriptions relevante Elongations-Faktoren möglich ist, ist es immer noch zweifelhaft, ob der Elongator überhaupt Teil des RNA-Polymerase-II Elongations-Apparates ist (Pokholok et al. 2002; Krogan et al. 2002). Trotzdem könnte es möglich sein, daß der Elongator im Zellkern an der Transkription beteiligt wird. Dieses Ergebnis spiegelt eventuell eine mögliche *TOT*-Elongator Regulationsfunktion durch zelluläre Lokalisation und Import in den Zellkern wieder. Der Befund wird dadurch gestützt, daß das Hefe-Homologe Gen von *TOT2* der Maus *M. musculus StIP1* ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist und durch eine Interleukin (IL-6) Behandlung in den Zellkern geschleust werden (Collum et al. 2000). Diese Tatsache unterstützt die These, daß der Elongator einer innerzellulären Abgrenzung unterworfen ist (Collum et al. 2000). Bemerkenswerterweise besitzt Tot1p eine mögliche c-terminale Kernlokalisations Sequenz (NLS), welche zur Translokation in den Zellkern dienen könnte indem entweder Tot1p oder eine Vorform des Elongator-Komplex in den Zellkern eintransportiert wird (Fichtner et a. 2002b). Interessanterweise konnte durch Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, daß eine c-terminale Deletion von Tot1p, welche die NLS-Sequenz enthält,

keine Auswirkung auf die Tot4p-Tot2p Protein-Protein Interaktion hat (Abb. 32) (Fichtner et al. 2002b) aber Zymocin-Resistenz bewirkt (Abb. 32) (Fichtner et al. 2002b). Das zeigt, daß die NLS-Sequenz für die Tot4p-Tot2p Protein-Protein Interaktion nicht benötigt wird, aber wichtig für die Zymocin-Wirkung ist. Wenn der Verlust der NLS-Sequenz Import verhindert, wäre es denkbar, daß der Elongator vielleicht über Zell-Kompartimentierung reguliert wird (Hendzel et al. 2001). Des weiteren konnte die potentielle NLS-Sequenz mit GFP fusioniert werden. Durch Fluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß das fusionierte NLS-GFP Protein im Zellkern vorliegt, wohingegen das GFP Protein ohne NLS-Sequenz im Zytoplasma lokalisiert ist (Fichtner et al. 2003). Damit konnte gezeigt werden, daß das Tot1p Protein eine funktionelle NLS-Sequenz besitzt. Das könnte ein Hinweis sein, daß möglicherweise die Zymocin Wirkungsweise ebenfalls kernlokalisiert ist. So konnte nachgewiesen werden, daß Transkription von RNA-Polymerase-II Genen in Zymocin behandelten Zellen verringert wird. RNA-Polymerase-I abhängige Gene hingegen, sind von Zymocin nicht betroffen (Frohloff et al. 2001; Jablonowski et al. 2001b). Das zeigt, daß das Zymocin mit der RNA-Polymerase-II interferiert.

#### **4.7 Die Interaktion der Tot1-6p Proteine im Elongator-Komplex**

Die Analysen zum Elongator-Aufbau wurde mit Hilfe von Co-Immunpräzipitation in *tot1Δ* Stämmen durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß die Bindung zwischen den Core-Elongator Untereinheiten Tot2p und Tot3p abhängig von Tot1p ist (Abb. 27C). Auch die Tot2p Interaktion mit Tot4p und mit Tot5p sind Tot1p abhängig (Abb. 27A & 30C). Daher kann angenommen werden, daß Tot1p eine wichtige Rolle für den Elongator-Aufbau und für die Kommunikation mit Tot4p spielt. Jedoch ist Tot1p nicht allein verantwortlich für die Protein-Protein Wechselwirkungen. Auch Tot2p ist für die Interaktion vom Holo-Elongator mit Tot4p wichtig. So sind die Bindungen zwischen Tot3p und Tot4p sowie zwischen Tot4p und Tot5p von Tot2p abhängig (Abb. 27B & 30B). Die im *tot2Δ* Stamm nicht mehr vorhandene Interaktion zwischen Tot3p und Tot4p sowie zwischen Tot4p und Tot5p zeigt die Wichtigkeit von Tot2p für die Tot4p Bindung an den Holo-Elongator.

Ähnlich wie in *tot1Δ* und *tot2Δ* Stämmen verhält es sich mit *tot3Δ* Stämmen. Die Interaktionen zwischen Tot2p und Tot1p, Tot2p und Tot4p sowie Tot2p und Tot5p sind alle von Tot3p abhängig (Abb. 28A/B & 30A). In Abwesenheit von Tot3p unterbleibt die Bindung zwischen Core- und HAP-Komplex. In allen *tot1Δ*, *tot2Δ* und

*tot3Δ* Stämmen geht die Interaktion mit Tot5p verloren. Diese Daten zeigen daß Tot3p neben seiner Rolle als HAT auch für den Aufbau des Holo-Elongators verantwortlich ist. Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß die drei HAP-Untereinheiten Tot5-7p (Elp4-6p) für die HAT-Aktivität des Tot3p Proteins *in vivo* benötigt werden (Winkler et al. 2002). Dieser Befund stimmt mit der Tatsache überein, daß die *tot1-7Δ* Stämme resistent gegen Zymocin und bestärkt die Beobachtung, daß für die Wirkung des Zymocin die HAT-Aktivität des Elongators benötigt wird.

Ganz anders verhält es sich bei den *tot4Δ* Stämmen. Das Ergebnis, daß die Interaktion von Elongator-Untereinheiten in *tot4Δ* Stämmen nicht gestört wird (Abb. 29A), ist möglicherweise ein Hinweis, daß Tot4p im Elongator-Komplex eher randständig ist und keine strukturelle Untereinheit für den Elongator darstellt. Auch Überexpression des *TOT4* Gens bleibt ohne Auswirkung auf die Struktur des Holo-Elongators (Abb. 29B). Trotzdem konnte durch Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, daß Tot4p mit dem Holo-Elongator interagiert (Abb. 25 & 26) (Frohloff et al. 2001 & Fichtner et al. 2002a). Obwohl andere Arbeitsgruppen Tot4p bisher nicht als Elongatorpartner nachweisen konnten (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000; Winkler et al. 2001; Li et al. 2001; Krogan et al. 2001), wird aus dieser Studie klar, daß Tot4p Elongator-Relevanz besitzt.

Möglicherweise vermittelt Tot4p die Interaktion zwischen Elongator und RNA-Polymerase-II Holo-Enzym. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis überein, daß Tot4p sowohl Elongator als auch mit der hyperphosphorylierten Form der RNA-Polymerase-II interagiert (Frohloff et al. 2003). In diesem Fall könnte Tot4p als ein Elongator-Ladefaktor für die RNA-Polymerase-II dienen. So führt die Entfernung von Tot4p ebenfalls zu den typischen *tot* Phänotypen von Elongator-Mutanten (Frohloff et al. 2001 & Jablonowski et al. 2001b). Eine Vermittlerrolle von Tot4p würde dann die Tatsache erklären, warum hohe *TOT4* Gendosis zur Resistenz gegen Zymocin führt, weil so möglicherweise Elongator gebundene Tot4p Proteine mit freien Tot4p Proteinen um die Bindung der RNA-Polymerase konkurrierten. (Butler et al. 1994; Frohloff et al. 2001; Fichtner et al. 2002a). Durch die Identifizierung einer P-Loop Bindedomäne im N-Terminus von Tot4p, die wichtig für die Protein-Funktion ist, könnte Tot4p als G-Protein fungieren (Fichtner et al. 2002a).

Des weiteren führt der Verlust des *KT113/ATS1* Gens, das ein homologes GTP-Austauschfaktor kodiert (Kirkpatrick et al. 1994), zur Zymocin-Resistenz (Fichtner &

Schaffrath 2002). Die *tot*-Phänotypen der *KTI13/AST1* Deletion können durch die erhöhte *TOT4* Dosis unterdrückt werden (Butler et al. 1994). Unter der Bedingung, daß Tot4p ein zentrales Protein eines anderen Komplex ist, der die Interaktion zwischen dem Elongator und der RNA-Polymerase-II vermittelt, würde der Verlust von Tot4p die Elongatorbindung an die RNA-Polymerase-II verhindern und so zu einen Verlust der HAT-Aktivität führen der wieder zur Resistenz gegen über dem Zymocin führt. Wenn Tot4p in der Lage ist, die RNA-Polymerase-II mit dem Elongator zu beladen, sollte man annehmen, daß Tot4p am Elongator eine randständige Position einnimmt und auf die Elongatorstruktur keinen Einfluß hat. Übereinstimmend damit, ist eine *TOT4* Deletion diesbezüglich wirkungslos (Abb. 29) (Fichtner et al. 2002a). Damit Tot4p mit dem Elongator interagieren kann, benötigt es *TOT1 (ELP1)*, *TOT2 (ELP2)*, *TOT3 (ELP3)* und *TOT5 (ELP5)* (Fichtner et al. 2002b), also mehrere Elongator-Untereinheiten selbst. Es wäre interessant zu bestimmen, ob die Unfähigkeit eines mutierten Elongator-Komplex mit Tot4p zu interagieren auch die RNA-Polymerase-II Interaktion beeinträchtigt. Wenn dies so wäre, dann wäre es vorstellbar daß das Tot4p Protein das Brückenprotein zwischen den Elongator-Komplex und der RNA-Polymerase-II sein könnte. Dann könnte das Tot4p Protein vielleicht der vermeintliche Beladungsfaktor des Holo-Elongator-Komplex an der RNA-Polymerase-II sein.

Die Interaktion zwischen Tot2p und Tot5p sowie zwischen Tot4p und Tot5p ist von Tot6p abhängig (Abb. 30A & B). Die Interaktion zwischen Tot2 und Tot5p ist abhängig von Tot7p (Abb. 30A). Dadurch wird die Interaktion zwischen Tot5p vom HAP-Komplex mit dem Core-Komplex deutlich. Daraus folgt, daß nur in ein vollständig assemblierten HAP-Komplex Tot5p mit dem Core-Komplex interagieren kann. Würde Tot5p die zentrale Rolle für die Interaktion zwischen den Core-Komplex und dem HAP-Komplex einnehmen, würde durch das Fehlen von Tot6p und Tot7p es keinen funktionellen HAP-Komplex geben, der folglich nicht mehr in der Lage ist am Core-Komplex zu binden.

Im Gegensatz zu dem Bericht, in dem angenommen wird, daß der HAP-Komplex vorzugsweise mit der Core-Elongator freien RNA-Polymerase-II bindet als an der Core-Elongator gebundenen RNA-Polymerase-II (Li et al. 2001), konnte die HAP-Komplex Untereinheit Elp5p (Tot5p) und die Core-Elongator Untereinheit Elp2p (Tot2p) mit der RNA-Polymerase-II co-immunpräzipitiert werden (Frohloff et al. 2003). Dieses läßt vermuten, daß ein funktioneller Holo-Elongator die Bindung aller

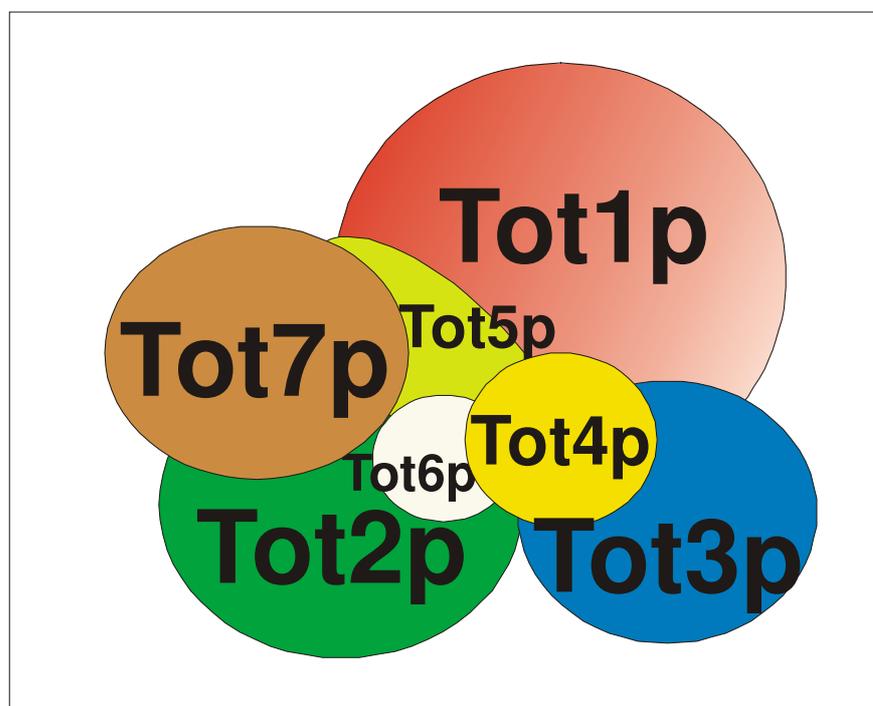
sechs Untereinheiten an der elongierenden RNA-Polymerase-II benötigt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß alle drei HAP-Untereinheiten Tot5-7p (Elp4-6p) für die HAT-Aktivität des Elongators *in vivo* benötigt werden (Winkler et al. 2002). Dieser Befund deutet darauf hin, daß Tot5-7p (Elp4-6p) eine essentielle Rolle in der strukturellen Organisation oder aber in der Substrat-Erkennung des Holo-Elongators haben (Winkler et al. 2002). Interessanterweise wurden die beiden Proteine Tot5p und Tot7p (Elp4p und Elp6p) auch als ATPase homologe Proteine vorgeschlagen (Ponting 2002).

Interessanterweise läßt sich im *tot1Δ* Stamm kein Tot4p und Tot5p mehr co-immunpräzipitieren, weil offensichtlich im *tot1Δ* Stamm kein oder nur noch sehr wenig Tot3p vorhanden ist (Abb. 31). Auch in den *tot5Δ* und *tot6Δ* Stämmen ist fast kein Tot3p mehr vorhanden. Wäre also mehr Tot3p vorhanden, wäre auch mehr Tot4p vorhanden. Das bedeutet, daß Tot1p und Tot5p nicht für die Protein-Protein Interaktion zwischen den Tot3p und Tot4p Proteinen benötigt wird. Tatsächlich konnte dieses Ergebnis, daß im *tot1Δ* Stamm kein oder nur noch sehr wenig Tot3p vorhanden ist bestätigt werden (Petrakis et al. 2004). Das dies jedoch nicht auch für die *tot5Δ* und *tot6Δ* Stämme bestätigt werden konnte, liegt wahrscheinlich an den verschiedenen Stammhintergründen der Hefezellen. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Fehlen von Tot3p im *tot1Δ* Stamm nicht durch eine Verminderung der TOT3 Expression herrührt, sondern durch Proteinabbau verursacht wird (Petrakis et al. 2004). In diesen Zusammenhang muß auch das Ergebnis in der Abbildung 27C betrachtet werden, nämlich das Tot3p durch das Fehlen von Tot1p abgebaut wird und sich dadurch nicht oder nur noch sehr wenig co-immunpräzipitieren läßt. Das zeigt wie schwierig es ist den Aufbau des Elongator-Komplex durch Deletionen und Co-immunpräzipitation zu untersuchen. Das gleichzeitige Auftreten von Protein-Abbau durch die *tot1Δ* Deletion zeigt die Schwierigkeit und Komplexität der Protein-Protein Wechselwirkung im Elongator-Komplex auf.

#### **4.8 Das Elongator-Modell**

Aus den Co-Immunpräzipitierungen (Tabelle 7) läßt sich für den Elongator-Komplex folgendes Modell aufstellen (Abb.37). Dieses einfache Modell berücksichtigt, daß der Holo-Elongator aus zwei Subkomplexe besteht (Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999; Fellows et al. 2000; Winkler et al. 2001; Li et al. 2001). Diese Tatsache wird in dem Modell mit der räumlichen Nähe der Tot1-3 Proteine Rechnung getragen (=

Core-Komplex) (Abb. 37). Versucht man dieses Modell auf der Basis des Core-Komplex weiter aufzubauen, wird hier die räumliche Nähe der Tot5p, Tot6p und Tot7p Proteine durch die Co-Immunitpräzipitation der *totΔ* Stämme bestätigt (Fichtner et al. 2002a & 2002b; Frohloff et al. 2003). Gleichzeitig wird die zentrale Lage von Tot5p deutlich, das eine Mittlerrolle zwischen den Core-Komplex und dem HAP-Komplex einzunehmen scheint. Denn Tot5p ist in Abwesenheit von Tot6p und Tot7p nicht mehr mit den zwei Core-Proteinen Tot2p und Tot3p sowie mit Tot4p co-immunitpräzipitierbar. In dem Modell nimmt das Tot5p Protein in der Mitte zwischen dem Core-Komplex und dem selbst angehörenden HAP-Komplex ein (Abb. 37).



**Abb.: 37** Das Modell des Holo-Elongator Komplex. Die theoretische Größe der Totp Proteine wurde in diesem Modell berücksichtigt. Der Core-Komplex besteht aus den Proteinen Tot1p, Tot2p und Tot3p Proteinen. Der HAP-Komplex besteht aus den Tot5p, Tot6p und Tot7p Proteinen.

Weiter geht aus der Co-Immunitpräzipitation der *totΔ* Stämme hervor, daß eine Deletion des *TOT4* Gens keine Auswirkung auf die Bindungen zwischen den Tot2/Tot1p, Tot2p/Tot5p (Fichtner et al. 2002a), sowie keine Auswirkung zwischen den Tot3p/ Tot1p, Tot3p/Tot2p und Tot3p/Tot5p Proteinen in dem Elongator-Komplex hat (Abb. 29A). Dies deutet auf eine randständige Lage des Tot4p Proteins im Elongator-Komplex hin. In dem hier aufgestellten Modell konnte diese Tatsache ebenfalls berücksichtigt werden. Jedoch stellt dieses Modell nicht die endgültige Fassung des Elongator-Komplex dar, sondern begründet sich lediglich aus den Daten dieser Studie. So konnte nicht berücksichtigt werden, daß Kti11p ebenfalls an

dem Core-Elongator bindet (Fichtner et al. 2003), weil dafür noch genauere Daten fehlen.

Ein Nachteil der Co-Immünpräzipitation zur Aufklärung der Integrität des Elongator-Komplex ist, daß keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Interaktionen zwischen den Totp Proteinen direkt oder indirekt sind. Durch weitere Co-Immünpräzipitations-Studien konnte jedoch gezeigt werden, daß durch das jeweilige Fehlen von *elp3Δ (tot3Δ)*, *elp4Δ (tot7Δ)*, *elp5Δ (tot5Δ)* und *elp6Δ (tot6Δ)*, es zu fast keiner signifikanten Interaktion zwischen den Elongator-Untereinheiten im Elongator-Komplex mehr kommt (Petrakis et al. 2004). Demnach scheint die vollständige Integrität des Elongator-Komplex, von ein paar Ausnahmen abgesehen, von jeder einzelnen Elongator-Untereinheit abhängig zu sein. So scheint der Elongator-Komplex schon durch das Fehlen einer einzigen Elongator-Untereinheit zu zerfallen und ist deshalb nicht mehr co-immünpräzipitierbar. Die Ausnahmen sind: *elp4Δ (tot7Δ)* für die Elp1p-Elp2p Interaktion, *elp5Δ (tot5Δ)* für die Elp6p-Elp7p Interaktion (Petrakis et al. 2004) und *elp2Δ (tot2Δ)* für die Tot3p-Tot5p Interaktion (Fichtner et al. 2002b & Petrakis et al. 2004). Auch durch „Two-Hybrid“-Experimente konnte keine weitere Aufklärung der Interaktionen zwischen den Elongator-Untereinheiten erzielt werden. Obwohl alle Kombinationsmöglichkeiten durch Two-Hybrid-Experimente getestet wurden, konnte im Elongator-Komplex nur zwischen Elp6p (Tot6p) und Elp4p (Tot7p) eine Two-Hybrid-Interaktion nachgewiesen werden (Petrakis et al. 2004). Das macht deutlich, wie schwierig es ist, die Integrität des Elongator-Aufbau zu untersuchen und spiegelt gleichzeitig die Komplexität der Protein-Interaktion im Elongator-Komplex wieder.

Interessanterweise verhält sich das Fehlen von Tot2p gleich wie Tot4p. Tot2p hat wie Tot4p keinerlei Auswirkung auf die verbleibende Integrität des Elongator-Komplex (Petrakis et al. 2004). Zur Überraschung ist Tot2 sogar für die HAT-Aktivität des verbleibenden Elongator-Komplex entbehrlich (Petrakis et al. 2004), obwohl das Fehlen von Tot2p die typischen *tot*-Phänotypen verursacht. Demnach scheint Tot2p ebenfalls mehr eine randständige Position im Elongator-Komplex einzunehmen und möglicherweise eine Mittlerrolle zwischen dem Elongator-Komplex und einem bisher unbekanntem Protein einzunehmen. Möglicherweise könnte dieses unbekannt Protein Tot4p oder Kti11p sein, die eben nicht zu dem Holo-Elongator-Komplex gehören sondern nur mit ihm assoziiert sind.

#### 4.9 Das Arbeitsmodell der Zymocin-Wirkung

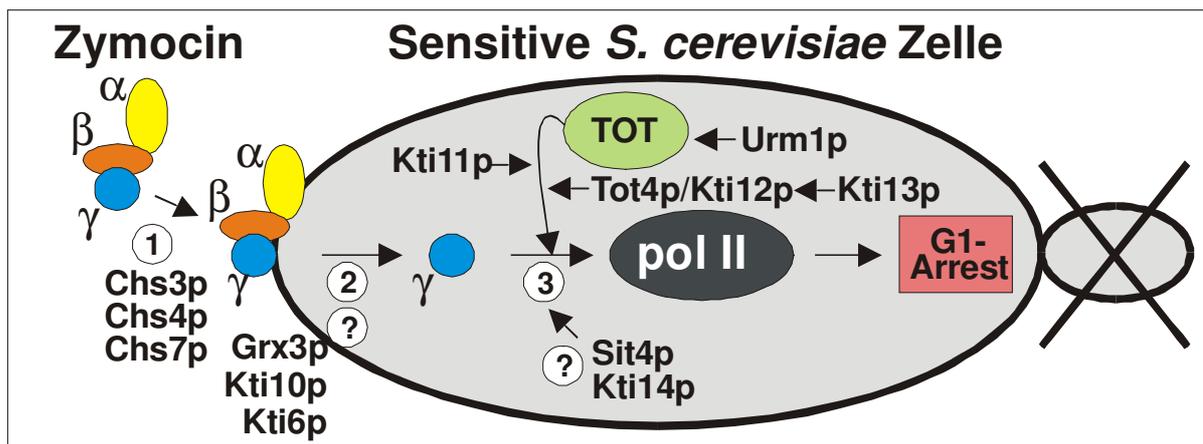
Die Daten dieser Studie zeigen, daß das in der Abbildung 3 gezeigte Modell der Zymocin-Wirkung um Elongator und Tot4p erweitert werden kann (Abb. 38). So zeigen die Daten in dieser Studie daß die Tot1-7p Proteine in einen Komplex vorliegen (Frohloff et al. 2001). Weiter konnte gezeigt werden, daß das Zymocin negativ auf die Transkription von RNA-Polymerase-II wirkt (Frohloff et al. 2001; Jablonowski et al. 2001b). Dementsprechend ist anzunehmen, daß der *TOT*-Komplex vermutlich die RNA-Polymerase-II beeinflusst. Das wird auch dadurch bestätigt, daß Tot3p im Elongator-Komplex eine HAT-Funktion übernimmt (Winkler et al. 2002).

Des weiteren konnten die Gene *GRX3* und *SIT4*, deren Verlust Zymocin Resistenz bedingt, identifiziert werden. *GRX3* kodiert ein Glutaredoxin, das wichtig für die Zymocin-Aufnahme zu sein scheint, da es in hoher Kopienzahl nur gegen Exotoxin Resistenz verleiht. Da die  $\beta$ -Untereinheit des Zymocins mittels einer kovalenten Disulfidbindung ( $\beta$ -S=S- $\gamma$ ) im Komplex mit der  $\gamma$ -Untereinheit verbunden ist, sollte zur  $\beta$ - $\gamma$ -Entkopplung die Disulfidbindung zur Sulfhydryl-Form ( $-\text{SH}_2$ )<sub>2</sub> reduziert werden. Wie diese Reduzierung abläuft, ist bisher noch nicht bekannt, jedoch hat Grx3p eine hohe Ähnlichkeit zu Thioredoxinen (Grant 2001). Grx3p könnte die Reduzierung Disulfidbindung -S=S- verhindern, so daß das  $\gamma$ -Toxin nicht mehr vom Holo-Zymocin entkoppelt werden könnte. Damit könnte es zu keiner Konvertierung in eine translozierbare Form des  $\gamma$ -Toxins kommen (Jablonowski et al. 2001c).

Das *SIT4* Gen kodiert eine Phosphatase und Zellen die das *SIT4* Gen nicht mehr besitzen zeigen die gleichen Phänotypen wie die *totΔ* Zellen einschließlich Zymocin und  $\gamma$ -Toxin-Resistenz (Jablonowski et al. 2001c). Sit4p ist mit dem Elongator-Komplex funktionell verbunden. So wird Tot1p des Elongator-Komplex von Sit4p und seinen assoziierten Proteinen Sap185p und Sap190p dephosphoryliert (Jablonowski et al. 2004). Das stimmt auch damit überein, daß *sit4* Mutationen auf die Transkription vieler Gene wirkt (Arndt et al. 1989). Damit besteht also eine Verbindung zwischen Sit4p und dem Elongator-Komplex zur Transkription der RNA-Pol-II.

Gleichzeitig konnten in der Zwischenzeit durch Komplementations-Analysen die *KTI10*, *KTI11*, *KTI13* und *KTI14* Gene identifiziert werden. Das als Klasse-I beschriebene *KTI10* Gen (Butler et al. 1994) konnte als *PMA1* Gen identifiziert werden (Mehlgarten & Schaffrath 2004). Das *PMA1* Gen kodiert eine H<sup>+</sup>-ATPase,

eine Plasma-Membran H<sup>+</sup>-Pumpe. Aus der Tatsache, daß *pma1Δ* Mutanten resistent gegen Exotoxin, aber sensitiv gegen Endotoxin sind läßt schließen, daß Pma1p früh bei Aufnahme des  $\gamma$ -Toxins eingebunden ist und Zymocin deswegen dieses Protein benötigt (Mehlgarten & Schaffrath 2004). Auch das als Klasse-I beschriebene *KT16* Gen (Butler et al. 1994) konnte durch Komplementations-Analysen identifiziert werden (Schaffrath, persönliche Mitteilung).



**Abb. 38:** Das hypothetische Arbeitsmodell zur Zymocin-Wirkung in der sensitiven *S. cerevisiae* Zelle (verändert nach Schaffrath). Der drei Stufen Zymocin-Signalweg: **1.** Holo-Zymocin Bindung an die Zellwand der sensitiven Hefezelle. **2.** Der  $\gamma$ -Toxin Import in die Hefezelle. **3.** Die intrazelluläre Kommunikation des  $\gamma$ -Toxins mit dem unbekannten Ziel das dann zu dem G1 Zellzyklus Arrest führt.

Während dieser Studie konnten die ORFs *YBL071w-A* als *KTI11* und *YAL020c/ATS1* als *KTI13* durch Komplementations-Analysen, identifiziert werden (Fichtner et al. 2002c). *KTI13* ist ein Allel von *ATS1* das als  $\alpha$ -Tubulin Suppressor isoliert worden ist (Kirkpatrick & Solomon 1994). Die Disruption der Gene *KTI11* und *KTI13* führt zu allen bekannten *tot* Phänotypen wie Exo- und Endotoxin-Resistenz, thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Aza-Uracil Sensitivität (Fichtner et al. 2002c). Durch TAP-Markierung und TAP-Aufreinigung konnte nachgewiesen werden daß Kti11p mit Tot1-3p interagiert (Fichtner et al. 2003). Jedoch hat das Fehlen von Kti11p keine Auswirkung auf die Integrität des Elongator-Komplex (Fichtner et al. 2003). Das Kti11p Protein ist ein sehr kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 9,3 kDA (Fichtner et al. 2003). Bisher konnte aber noch nicht nachgewiesen werden, mit wem Kti11p im TOT Core-Komplex interagiert. Von dem Kti13p Protein konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, daß es an dem Elongator-Komplex bindet.

Das *KTI14* Gen konnte durch Komplementations-Analysen Identifiziert werden (Mehlgarten & Schaffrath 2003). *KTI14* ist isoallel zu *HRR25*, das eine Casein

Kinase-I (CKI) Isoform kodiert. *KT114* ist, im Gegensatz zu den anderen identifizierten *KTI* Genen, essentiell, eine Nullmutation ist also nicht lebensfähig. Jedoch führen Kinase-Minus *hrr25* Mutationen (K38A und T176I) zu den typischen *tot*-Phänotypen (Mehlgarten & Schaffrath 2003). Anders als die *tot1-7Δ* Zellen, zeigt die *KT114* Mutante Sensitivität gegenüber Methylmethansulfonat (Mehlgarten & Schaffrath 2003). Die Deletion der verbleibenden drei weiteren *CKI* Gene (*YCK1-3*) der Hefe, haben keine Auswirkung auf Zymocin-Sensitivität.

**Tab. 8:** Die Klasse-II Gene deren Mutationen *S. cerevisiae* Resistenz gegen das Exotoxin und das Endotoxin von *K. lactis* vermitteln.

Mutante	ORF, Gen (Synonyme)	Funktion	Referenz
<i>iki2Δ</i>	unbekannt	Unbekannt	Kishida et al. 1996
<i>iki4Δ</i>	unbekannt	Unbekannt	Kishida et al. 1996
<i>iki5Δ</i>	unbekannt	Unbekannt	Kishida et al. 1996
<i>kti1Δ</i>	YML014W, <i>TRM9</i>	tRNA-Methylase	Butler et al. 1994, mündliche Mitteilung Schaffrath 2005
<i>kti3Δ</i>	YGR200c, <i>ELP2</i> ( <i>TOT2</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Butler et al. 1994, Frohloff et al. 2001
<i>kti4Δ</i>	YHR187w, <i>IK11</i> ( <i>TOT5, ELP5, HAP2</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Butler et al. 1994, Kishida et al. 1996, Frohloff et al. 2001
<i>kti7Δ</i>	YLR384c, <i>ELP1</i> ( <i>TOT1, IK13</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Frohloff et al. 2001, Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999
<i>kti8Δ</i>	YPL086c, <i>ELP3</i> ( <i>HAP1, TOT3</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente, Histon-Acetyltransferase (HAT)	Butler et al. 1994, Frohloff et al. 2001, Otero et al. 1999; Wittschieben et al. 1999
<i>kti9Δ</i>	YPL110w, <i>ELP4</i> ( <i>HAP1, TOT7</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Jablonowski et al. 2001, Winkler et al. 2001; Li et al. 2001
<i>kti11Δ</i>	YBL071w-a, <i>KTI11</i>	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Butler et al. 1994, Fichtner & Schaffrath 2003
<i>kti12Δ</i>	YKL110c, <i>KTI12</i> ( <i>TOT4</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Butler et al. 1994, Frohloff et al. 2001,
<i>kti13Δ</i>	YAL020c, <i>ATS1</i> ( <i>FUN28, KTI13</i> )	Alpha Tubulin Suppressor	Butler et al. 1994, Fichtner & Schaffrath 2003
<i>kti14Δ</i>	YPL204w, <i>HRR25</i>	Casein Kinase-I Aktivität	Butler et al. 1994, Mehlgarten & Schaffrath 2003
<i>elp6Δ</i>	YMR312w, <i>ELP6</i> ( <i>HAP3, TOT6</i> )	RNA-Pol-II Elongatorkomponente	Fellows et al. 2000; Winkler et al. 2001; Li et al. 2001
<i>urm1Δ</i>	YIL008w, <i>URM1</i>	Proteinmodifikation	Fichtner et al. 2003
<i>sit4Δ</i>	YDL047w, <i>SIT4</i> ( <i>LGN4</i> )	Protein Phosphatase	Jablonowski et al. 2001c

Der Weg des Zymocins, durch die Zellmembran, der Weg durch das Zytoplasma in den Zellkern um dann letztlich einen G1 Zellzyklus-Arrest zu bewirken, ist sehr lang. Auf jeder dieser Stationen sind mögliche Genprodukte eingebunden, die für die Aufnahme in die Hefezelle, den Transport im Zytoplasma und den Eintransport in den Zellkern verantwortlich sind. Das wird unter anderem auch dadurch deutlich, daß die

mutierten *KTI* Genprodukte in zwei Klassen eingeteilt werden können. Die Klasse-I Mutanten (Tab. 1), die Zymocin-Aufnahme und  $\gamma$ -Toxinimport vereiteln und Klasse-II Mutanten (Tab. 8), die wahrscheinlich intrazelluläre Proteine des  $\gamma$ -Toxintargets entschärfen. Die große Anzahl der inzwischen identifizierten Klasse-II Gene spiegelt die komplizierte  $\gamma$ -Toxin-Wirkung wieder. Die Auffälligkeit, daß alle bisher identifizierten Klasse-II Gene die gleichen Phänotypen aufweisen, ist möglicherweise ein Hinweis, daß auch ihre Funktion in der Zelle ähnlich ist. Möglicherweise gibt es noch mehr Zymocin relevante Gene als bisher bekannt. Deshalb bedarf es in der Zukunft noch weiterer Untersuchungen, um das Puzzle zusammenzufügen, wie die bisher identifizierten und zukünftigen Genprodukte miteinander zusammenwirken, um so der Wirkung des Zymocins inklusive G1-Arrest auf die Spur zu kommen. Letztendlich wird dies ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung von Proliferationskontrolle und mikrobielle Konkurrenz liefern. Möglicherweise ergeben sich dann auch Therapie-Ansätze für die Bekämpfung von Infektionen oder sogar für die Arretierung von Tumorzellen. Let's go!

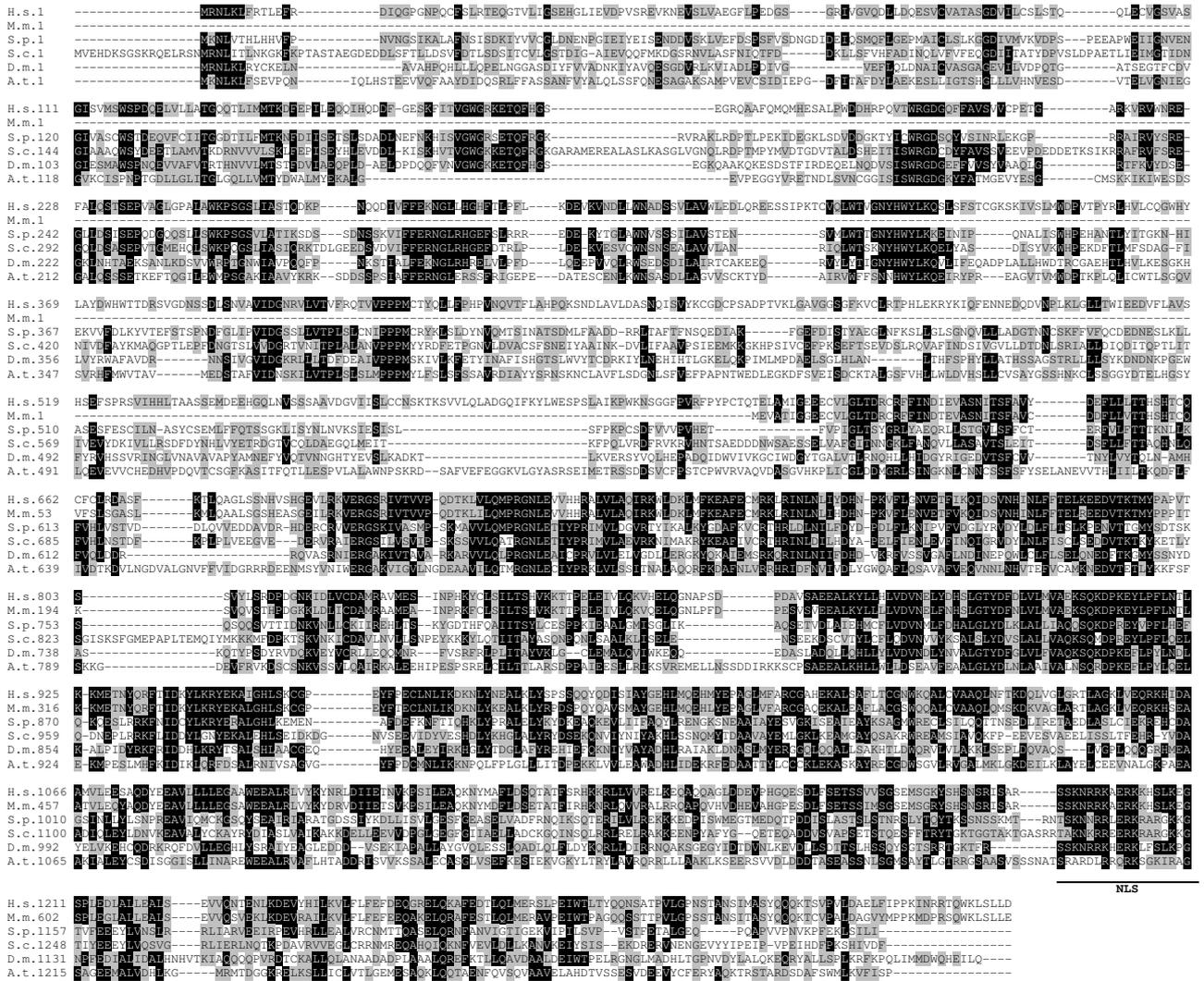
## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie konnten 7 Elongatorrelevante Hefegene (*TOT1-7*) identifiziert und charakterisiert werden. Die *tot1-7Δ* Null-Mutationen weisen alle die gleichen Phänotypen auf. Sie sind resistent gegen  $\gamma$ -Toxin und Zymocin, verhalten sich rezessiv, sind thermosensitiv über 38°C, wachsen langsam und sind sensitiv gegen Calcofluor White, Caffein und 6-AU. Bis auf Tot5p und Tot6p gibt es Homologe Proteine in allen wichtigen Modellorganismen und sind bis zu den Archebakterien konserviert. Das *TOT3* Gen kodiert eine HAT. Von allen nichtessentiellen HAT-Genen in *S. cerevisiae* führt nur die *TOT3* Deletion zur Zymocin-Resistenz. Mutationen, die die HAT-Aktivität reduziert, schützt ebenfalls schon vor Zymocin. Demnach ist die HAT-Aktivität notwendig für die Toxin-Sensitivität und verantwortlich für leben unter Streß. N-terminale Mutationen der Histone H3 und H4 führen zu keiner Veränderung der Toxin-Sensitivität. Obwohl Histon H3 am Lysin-14 und Histon H4 am Lysin-8 von der Elongator-HAT acetyliert werden, scheiden die Histone H3 und H4 als Zymocinrelevante Substrate für die Elongator-HAT aus. Von allen *TOT* Genen führt nur erhöhte *TOT4* Gendosis zur Zymocin-Resistenz. Die *TOT1-5* Gene konnten als Protein kodierende Gene identifiziert werden, die hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Durch Co-Immünpräzipitation der Totp Proteine konnte gezeigt werden, daß die Tot1-6p Proteine in einem Proteinkomplex vorliegen. Die Integrität des Elongator-Komplex wird durch die erhöhte Gendosis von *TOT4* und von *tot4Δ* nicht beeinflußt. Die Interaktion von Tot2p/Tot3p, Tot2p/Tot4p, Tot2p/Tot5p und Tot4p/Tot5p sind Tot1p abhängig. Die Interaktion zwischen Tot3p/Tot4, Tot4p/Tot5 sind Tot2p abhängig. Die Interaktion zwischen Tot2p/Tot1p, Tot2p/Tot4p und Tot2p/Tot5p sind Tot3p abhängig. Die Interaktionen zwischen Tot2p/Tot5p, Tot3p/Tot5p und Tot4p/Tot5p sind Tot6p abhängig. Die Interaktion zwischen Tot2p und Tot5p ist Tot7p abhängig. C-terminale Deletionen der *TOT1* und *TOT2* Gene führen zur Toxin-Resistenz. Die Tot1p vermittelte Bindung zwischen Tot2p/Tot4p ist davon nicht betroffen. Für die Vermittlung der Bindung zwischen den Tot2p und Tot4p sind die C-terminalen Aminosäuren 1029-1129 von Tot1p mitverantwortlich. Für die Tot2p vermittelte Bindung zwischen Tot3p/Tot4 sind die 100 C-terminalen Aminosäuren unentbehrlich.

## 6. Anhang

### 6.1 Alignments der Totp Proteine & Daten

#### 6.1.1 Tot1p Alignment & TOT1 Daten



**Abb. 39:** Alignment der Tot1p Aminosäuresequenzen der Organismen von H.s. = *Homo sapiens*, M.m. = *Mus musculus*, D.m. = *Drosophila melanogaster*, A.t. = *Arabidopsis thaliana*, S.p. = *Shizosaccharomyces pombe*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot1p**

Seq->	H.s.	M.m.	S.c.	S.p.	D.m.	A.t.	C.e.
H.s.	1,000	0,444	0,245	0,252	0,278	0,222	0,180
M.m.	---	1,000	0,143	0,151	0,169	0,144	0,111
S.c.	---	---	1,000	0,357	0,204	0,175	0,153
S.p.	---	---	---	1,000	0,220	0,207	0,167
D.m.	---	---	---	---	1,000	0,184	0,178
A.t.	---	---	---	---	---	1,000	0,146
C.e.	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tab. 9:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus dem Alignment der Tot1p Aminosäuren-Sequenzen der **Abb. 39** angefertigt. *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *C.e.* = *Cenorhabditis elegans*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 (Hall 2001) erstellt.

Standard ORF Name: YLR384c

Synonym: *ELP1*, *IKI3*; *TOT1*, *KTI7*.

Beschreibung: Tot1p besitzt eine Kernlokalisierungssequenz (NLS).

**Genetik**

Disruption: Die *tot1Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot1Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretrierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

**Physikalische Merkmale**

Koordinaten: 892902 - 888853 (C)

Länge: 4050 nt

Chromosom: 12

GC Gehalt: 39.3 %

Protein Länge: 1349 aa

Isoelektrischer Punkt: 4.95

Molekular Gewicht: 152991 Da

**Accession Nummern von Tot1p & Tot1p homologen**

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL Q06706

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL O59704

*Homo sapiens*: TrEMBL Q8N516

*Mus musculus*: TrEMBL AAH52387

*Drosophila melanogaster*: TrEMBL Q9VGK7

*Cenorhabditis elegans*: TrEMBL Q9N595

*Arabidopsis thaliana*: TrEMBL Q9FNA4

### 6.1.2 Tot2p Alignment & TOT2 Daten

```

H.s. 1  -MVA PVLETS HVVCCPNRVRGVLNWSGSPRGLLAFGCTSCSVLYDPLKRR-----VVVITNLNGHTARVNCIQWICKQ-----DGSPSTELVSGGSDNQV
M.m. 1  -MVS VLEPVSHVFCPCNNRVRGALSWNTCPGGLLAFGCTSCSVLYDPPKPK-----VVVITNLNGHTARVNCIQWIRTE-----DGSPSNELVSGGSDNRV
D.m. 1  ----M QVNLHTSVAQNCCTECADW----CPNGMLAYGACNATAIMDPKFGQNSA--KVLFTLVEHTKRVNIVRWLD-----CDKLTLSGGDDAIA
S.p. 1  ----MFOYEALHVGQN--RIPATAATWSSNLGLIYGAERLIAVADPPKFIN-----YLMAGHSCRINCVCELAIN-----SEYRSPFTLISGVSCKTL
S.c. 1  ----MVECI TPEALF IGANK--QTQVSDIHKVKKIVAFGAGKTLALWDPIEPNNK--GVYATLKGHEAEVTCVRFVDP-----SDFMVSASEDDHHV
A.t. 1  MSENKIVFAKRVF IGAGCNRVNVNWSGASGLVDFGAQNAVAVFCPKTAQIL---T---LTPCHKASVNGTHTWLPSTKFAFKARKLDRQYLLSGSDSGIT
C.e. 1  ----MKLIEEFITASAVNP--RSHCLTACKTAPLWYASSLQATVQITPKDDSEVGVIKSTERRMOKPITVTKRLKSS-----EIVADEFTVGGVDSRV

H.s. 88  ILWELEDNQLLKA VHLQEGEGPVYAVHAVYQRRTSDPALCLTIVSAADS AVRLWSK-----KGP EVMCLQTLNFGNGFALALCLSFLENT-----
M.m. 88  ILWELEDNQLLKS VRLOGHEGEPVCAVHAIYQSGPSEGEQHAIASAA SDSTVRIWSK-----KGS EVKYLQTLSPFRDGEVLSVCLADLPGT-----
D.m. 81  ILWELEDTGT TKSFTLKGHTS GVNITVDGIRQQDGS-----WLLATAAADTTIKLWTF-----QDN NYVCFQTLISLSDGCFCLRLCLLPKS-----
S.p. 81  RLWOLIEE-----YFTCIKTI ELEAT--VNC LCVNENIVVCGCSNSSCIVYGNWAEQR-----NLTETLSRFTCE--IIPLEHAIWLKLD-----
S.c. 84  KLVKFTDYS-----HLQCIQTIQHYSKTI VALSALPSTLISVGCADGTIISIRQNIQND-----EFG LAHEPTIKKGEFYPICLSLSKVE-----
A.t. 95  ILWELEDLNN DQWRHVLQLPLSHKKGVTCTIAYMVSETDAMPASSDGVNVNMPVSPSPSECKVCLDSICVDTKAIVTLSLAELEPN-----
C.e. 89  VLWRIRGEHVEYVADLTCDCGSGVSVCGVEDGRKVVAAAVWVFRIRKKAASAAHLSACRKKTKNCKEPCRRVARLRLFCALALRRAIKNLVSETSNGF

H.s. 173  -----DVPILACGNDDCRTHIFAQND-----QFQKVLSTLQGHEDWIRGVEWA AF-----GRDL
M.m. 173  -----NVPV LACGDDDCRTHLYIQDD-----QFQKALSTLQGHEDWIRGVEWATF-----GRDL
D.m. 161  -----NOV LAFSCDDETVSLSWSEQVETAGEGDSLGRQFQRKHKLTCGHEDWIRGIDFVVD-----GRDL
S.p. 155  -----HGIILTVCGSSKIMYYG-----KPVRF TLG-KIDLKL VFDALMCHEDWVMSVDWH-----TSG-STA
S.c. 162  -----EKKYLLAIGCIVNVNVEIASFIL-----SDSGIEKCRVVAELDGHEDWVKSAPRHF-----QBTPTGDY
A.t. 187  -----PGRFALALGLDNKIRKLY-----SGERTGKFTSVCE LKGHIDWIRSLPHLHTTEIPNSI
C.e. 189  HAWWTSSIGDLLNSTEIKLDHKAFALCLDAISIQNSVLA VGTSKRFV ELYGESAD-----KKSFSRLISVAGHIDWIRSLPHLHTTEIPNSI-----PDHL

H.s. 223  FLASCSQDCITRIRWKL YIKSTSLETODDDNIRLKEN-----TFTIENESVKIAFAVTL ETVLAGHENNVNVAVHWQVVF-----YKDGVLQQPVRLLSAS
M.m. 223  FLASCSQDCITRIRWRL YMKPASFEITKDG-SLR LKEN-----TFTIKDGGVRTTAVITL ETVLAGHENNVNVAVHWQVVF-----YKDGVLQQPVRLLSAS
D.m. 221  FLASCSQDNFIRLWRITAPRSKEQMOENRVDLHOLSHNDDEIKVEEKIQLGKEAWYAVSL ESVLYGHEGHWYGVVHWKTP-----DQE-----LRLLSAS
S.p. 208  FLASCSQDRYIRLWNISLWGSDEKVESEFFESVLSN-----KPVRF TLG-KIDLKL VFDALMCHEDWVMSVDWH-----TKEMILSSS
S.c. 220  LFCSSQDRYIRLWRIRINDLIDDESDDSKLLTLLSN-----KQYKFOIDDELVRVGINFALIMGHIDWIRSLQWHE-----SRLOLILAT
A.t. 246  MLVSSSQDQYIRIRWKLVLV G--DVGSWRREITLASY-----IEGPFVYSDGETFTYQLSVEVSLIGHEDWVYVSWVQEPVIDFDIDGRLVNHQPLSILSAS
C.e. 274  LVASAGQDYIRVRLWIPETDEKSENIREDSSTTPDE--LTSSANLFSIN YTPYRCS SHAVMCHGHDWVHSTVMSNDG-----RVLLIAS

H.s. 312  MDKTMIFWAPDEESGVWLEQVRVGEVGG-----NTLGFYDCQFNEDG-----SMITAHAFHGCALHLWKO--NTVNPREWITPEIVISGHED
M.m. 311  MDKTMIFWAPDEESGVWLEQVRVGEVGG-----NTLGFYDCQFNGENG-----TMITAHAFHGCALHLWKO--STVNPROMAPEIVISGHED
D.m. 311  IDKTIWIFWAPDEEG-WLEEV RVGEVGG-----NSVGFYGGKSGSGD-----HSMIAHSYCGGFHWSQ--DPRDRLMTPGVIVGSHYGY
S.p. 288  ADSSMIVWEPDNTICHTWVVI GRGEMASSHGSTTATGSAGGFVGLWNPNG-----NCVV CWGRTGWRWLRK--QDAGQWLQPS-LSGHTK
S.c. 301  ADTSMIVWEPDNTSCHWVCSLRGEMSS--KGASTATGSSCGFVCLWF THERM-----DFFLTNGKTSWRMWA--TKDNIICDQRLGTSGATK
A.t. 337  MDKTMIFWAPDEEKKTICWVNVV VCGELSH-----CALGFYGGHWSPNS-----LSL LAHGVCFAHLWRNVSSKSESNWQMKVPSGHFA
C.e. 358  SDKTIWIFWAPDEEDNWRDDVRLGIVGG-----GQAGGFAAVSSSLDLKDSGKNAENVVVSSYFGGLHWKSS--TDEOKTWFALPMTGCHVG

H.s. 390  GVODLWMDPEEGE---FIITVGT DQTRRLFAPWKRKQD---SQVTWHEIARPOIHGYD LKCLAMIN---RFQFVSGADEKVLVRFV SAPRNFVENFCAIT
M.m. 389  GVODLWMDPEEGE---FIITVGT DQTRRLFAPWKRKQDQD--RSQVTWHEIARPOIHGYDNIKCLAMID---RFQFVSGADEKVLVRFV SAPRNFVENFVSIT
D.m. 388  EYRDLAWBHGSGA---YIMTASADOTTRILFAPWLODGAN---PTWHEIARPOIHGYDQALALLS---RYKFFSGAEKVLVRFV SAPRNFVENFIRHIS
S.p. 372  SVKGVAMDPEEGE---EYLSAGTDQTRRLFAPWKRKDN---AWHEIARPOIHGYDITLSICMP--SRICFVSGADEKVSVEKFTKTTVRLIYRLIC
S.c. 387  DVTDIAMSPESGE---YLLATSLDQTRRLFAPWITDASGRKREIATWHEFSRPOIHGYDMLCIVETVT--DTR-FVSGADEKVLVRFV DPLKGVAGMLQKRV
A.t. 417  AAYDVTIWARICE---YLLVSGDQTRTRVFAWKNDE--GNEAEDEWHHEIARPOIHGHIDINCVAMVQGKNHFRVSGAEKVRVRFVPAFLSFKTLNHTC
C.e. 446  EYRDLWMDHRSDDGDSGFLMSVGCQDQTRVFAKNGRQO---SYVEIARPOIHGHIDMCLSFVN---PSIFVSGAEKVRVRFVPAFLSFKVKSLEAIT

H.s. 479  QSLNH-VLCNQDSDLPEGATVPALGLSNKAVFGQDIASQPSDEEELLTSTGF EYQVAFQPSHLTPEPTEDELLQNTLWPEVQKLYGHGYEITFCVTCNS
M.m. 481  QSLSH-MLCD-DQD LPEGATVPALGLSNKALFGQDIASQPFEEDELLS-PAFGSPQVTFQPAVLENEPTEDELLQNTLWPEIQKLYGHGYEITFCVACNN
D.m. 476  QLEND--AGDVL LDSLPGKASVPSLGLSNKAVYKVDSEVSTSKT---SKDEYFDNYFVPIALETPPEDELLQNTLWPELQKLYGHGYEITFALAAATA
S.p. 458  DTNIG-----EES-LPDAANVPLGLSNK---ATTASGETVNAEEV-QTP---VADVIGSNHPPPEEHLQRLLLPEVVKLGHGYEYVYCAITSN
S.c. 480  QCFQE-----EKSEMPDSATVPPVGLSNK---AGEDANEDDEEEG-KNETPDIIDPLSLECPPEMEDQLRHLWPEVVKLYGHGYEITCLDISE
A.t. 512  AGGEGSFPEDLQADVQVLGANMSALGLSKPTVY LHSSEPLERNGGGEG-LDTFETVPEAAPPDLKEPPEDEQLAFHTLWPESHKLYGHGNLFLSLCSDH
C.e. 535  GVPTFK---SFGDSDLAEFGACVPALGLSNKPMVEGETVDGHEWEEDAFR-----AAPVVLTSPPPEDELLQNTLWPEQKLYGHGYEYVAVTANF

H.s. 578  SKTLASACKAAKKEHAAITLWNTTSWKQVQ--NLVHSLTVTQMAFSPNEKFLAVSRDRWLSWKKQDITSEFEPVFSLEAFTNKITSVHSRIWISCD
M.m. 578  SKTLASACKASQKHEHAAITLWSTASWKQVQ--SLAFHSLTVTQMTFSPDKFLAVSRDRWLSWKKQDATSEFDPFFSLEAFTNKITSVHSRIWISCD
D.m. 570  DESLLASCKASABHACHILLNPN SNWKQVQ--KLSGHSLTVTQLSFSPDSRYLLS VSRDRWLYCERCDSS---VSYQVASTDPSNGVHTRIIWISCD
S.p. 542  NENIATATSKRSQTPHAVIRLLETOSMNQCC--VLKGHSLTVTITKFSPPDRYILSAGRDRVLCVH--EQAEN-----LLDYNN-PASIKAHHSRIWIDAS
S.c. 569  DOKLHASACRSNNVQNAVRIEFTSENWLEIKPALPHSLTTRLKFSSKDKGKFLSVCRDRKPAWLV--ERNME-----DNTFEELRPKNEKPHTRIIWAD
A.t. 611  KENLHASACKASAMFNLWMEVCTWAVG--RLQSHSLTVTHLFEVDDTLLS VSRDRHFSVFSIORTDN-----GEVSHKLMKAVEAHRRIWAGS
C.e. 623  TENLHASACKSSHVEHVSVMVLSNLSNWSKKS-ELIIGHSLTVTQIAWNPSTRLLVSRDRTAKLYTEKNGEVDG---FDYDCVWITSGKPHTRIIWACD

H.s. 677  WSPD--SKYFETCSRDKKVVVWGECDSTDDICEHNI GPCCSVLDVGGAVTAVSVCP--VLHP SORYVAVGLECSKTCLYTKKTKDQVP-EINDWTHCVE
M.m. 677  WSPD--NKYFETCSRDKKVVVWGECKSSHNPMEHP IRECSSILVDGSSVTAVSVCP--VLNPAORYIVA FGLSEKTCIYVSNWKNITQ---EINDWTSVVE
D.m. 664  WSHD--GQFFVTSRRDKVVVWKKEDCKESSLNGQANGVLELKNESITAVAFSNSYLSGTD DTYILA GFBTGLIKIYQF-----VRGAWKLLSD
S.p. 632  WAPKEMGYEFPATASRDKFKVFKINDN--KKICDVAALQFSDAVTAVDFAPFFHND-----ELLVAGTFAKGI FIVRCPREN-----LTKWYPTR
S.c. 661  WAPLEFCNVFVTASRDKTVKVRHQKEPADDYVLEASIKHKAVTAISIHDSMIRE-----KILISVLENGEITLYSYTLG-----KFERLITQ
A.t. 704  WNP--FCHCFATSSRDKTVKINSVENDARIKQILVLPFEGSSVTAVAWTGLDRNEK-----SGCVAVGVESEGTIELSNVKIIEETEGTATAALALR
C.e. 717  WIDD--EHEVTSARDKQVIVWAE SAG-----QTAPKATVKLDEPVTATAVAVS-----KDVIVAGLQTSBLIVLRFDFSEG-----LHV

H.s. 772  TQSOSHTLARKLCKWKNCSGKTE-----QKEAEGAEWLHFA SCGEDHTVRIHVNKCAL
M.m. 770  TNPSQSHSLGTRRLCKWKNCSDDDDDDDDDETEQSEEGPEWLFASCGEDHTVRIYVNRRAL
D.m. 754  LNKSOAHLIVRRLQFR-----PGKQLCLASCGEDHLVRIYDIKLT--
S.p. 716  LPDHMAPMESINOLLKPTFTETMG-----LYSLLIAGCEDTSVRLNVTLG--
S.c. 745  LNEIDITPADKTRLRMS--HLKRN G-----KHLGVGSSDLSTRYISLAYE--
A.t. 794  LPPFMCVSAVNRLLAWRPT EKCESN-----QSLRWLHSCGDDNCRVRFNFKF--
C.e. 787  TEKIGANRIBDSAVLR LRFKNG-----RKLAVATTDAKTRIFNVSO--
    
```

**Abb. 40:** Alignment der Tot2p Aminosäuresequenzen der Organismen von *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *C.e.* = *Caenorhabditis elegans*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot2p**

<b>Seq</b>	<b>H.s.</b>	<b>M.m.</b>	<b>D.m.</b>	<b>S.p.</b>	<b>S.c.</b>	<b>A.t.</b>	<b>C.e.</b>
<b>H.s.</b>	1,000	0,776	0,381	0,257	0,262	0,289	0,252
<b>M.m.</b>	---	1,000	0,391	0,256	0,256	0,288	0,247
<b>D.m.</b>	---	---	1,000	0,264	0,273	0,289	0,277
<b>S.p.</b>	---	---	---	1,000	0,333	0,264	0,224
<b>S.c.</b>	---	---	---	---	1,000	0,255	0,208
<b>A.t.</b>	---	---	---	---	---	1,000	0,209
<b>C.e.</b>	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tab. 10:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus dem Alignment der Tot2p Aminosäuren-Sequenzen der **Abb. 40** angefertigt. *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *C.e.* = *Cenorhabditis elegans*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 (Hall 2001) erstellt.

Standard ORF Name: YGR200C

Synonym: *ELP2*, *TOT2*, *KT13*

Beschreibung: Tot2p besitzt 8 WD40 Protein-Protein Bindedomänen und eine Transmembran Domäne.

**Genetik**

Disruption: Die *tot2Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot2Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretrierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

**Physikalische Merkmale**

Koordinaten: 902272 - 899906 (C)

Länge: 2367 nt

Chromosom: 7

GC Gehalt: 38.9 %

Protein Länge: 788 aa

Isoelektrischer Punkt: 5.36

Molekular Gewicht: 89411 Da

**Accession Nummern von Tot2p & Tot2p homologen**

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL P42935

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL O94533

*Homo sapiens*: TrEMBL Q9NV81

*Mus musculus*: TrEMBL Q91WG4

*Drosophila melanogaster*: TrEMBL Q9V5N6

*Cenorhabditis elegans*: TrEMBL Q9NEW7

*Arabidopsis thaliana*: TrEMBL Q9XIC1

### 6.1.3 Tot3p Alignment & TOT3 Daten

```

H.s. 1  -----MRQKRK-----GDLSPAEMLMLTIIGDVIKOLIEAHEQ--GKDLNLNKVKTITAAKYGLSAQPRLVDIIAA
M.m. 1  -----MRQKRKGAKVVGQGRKGGSGFSEITIGDLSPAEMLMLTIIGDVIKOLIEAHEQ--GKDVNLNKMKTKTAAKYGLASQPRLVDIIAA
D.m. 1  -----MKAKKILG-----VGLSROEIQVIVIGETIQEELKKAHEA--KDVNLNRMKSLVASKYGLDSSPRLVDIIAA
C.e. 1  -----MYQNCIQMD-----QKGSORALLAOTINETIVKLLIEAHNQ--KDVNLNRMLKCVIAOKNGLSFPKLVVDIIAG
S.p. 1  -----MSTSSLAFLK---AKACAEIVAEIASENQ--NKVINLNLAKMRISKKHQLSESPRLVDIIAA
S.c. 1  -----MARHGKGPK-----TNKKLAPKERTIQCCADITLLEITDSLTSGTTRINLNGLITKYSKKYKLLKQOPRLVDIINS
A.t. 1  MATAVVMNGELKQKPRPGK-----GYQGRGITTEBARVRAITSEIVSTMTERSHR--NENVLNLAKTAAACRKYGLARAPKLVEMIIAA

H.s. 64  VP--PQYRKVLMPKLKAKPVRTASGIADVAVMCKPHRCPHISFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPELQTRER
M.m. 83  VP--PHYRKILMPKLKAKPVRTASGIADVAVMCKPHRCPHISFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPELQTRER
D.m. 66  VP--QDAKILLPKLRAPKVRTASGIADVAVMCKPHRCPHINMTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPELQTRER
C.e. 67  VP--SDYKDSLPLPKLRAPKVRTASGIADVAVMSKPHRCPHINFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPELQTRER
S.p. 59  IPPDAYIKESLMRKLRAKPVRTASGIADVAVMCKPHRCPHIAFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPEVQARCR
S.c. 73  IP--DQYKQYLLPKLRAPKVRTASGIADVAVMCKPHRCPHIAFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPEVQARCR
A.t. 82  LP--DSERETLLPKLRAPKVRTASGIADVAVMSKPHRCPHIAFTGNICVYCPGGPDSDFEYSTQSYTGYPEPTSMRAIRARYDPEVQARCR

H.s. 152  IEQLKQLGHSVDKVEFIVMGGTFMALPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSNNIIEAVKYSESLTKCIGITITETRPDYCMKRHLSMDMLTYGCT
M.m. 171  IEQLKQLGHSVDKVEFIVMGGTFMALPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSNNIIEAVKYSESLTKCIGITITETRPDYCMKRHLSMDMLTYGCT
D.m. 154  IEQLKQLGHSVDKVEFIVMGGTFMALPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSANVVEAVRYSEKSRTKCIGITITETRPDYCMKRHLSMDMLTYGCT
C.e. 155  LNQLMQLGHSVDKVEFIVMGGTFMSLPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSASVEAVRYSESKMKCIGITITETRPDYCLPRHLNMDMLTYGCT
S.p. 149  VEQLRSLGHTVDKVEFIVMGGTFMSLPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSASVEAVRYSEKSRTKCIGITITETRPDYCLDQHLNMDMLTYGCT
S.c. 161  IEQLKQLGHSVDKVEFIVMGGTFMSLPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSASVEAVRYSEKSRTKCIGITITETRPDYCLDQHLNMDMLTYGCT
A.t. 170  IDQLKRLGHSVDKVEFIVMGGTFMSLPEEYRDFIRNLHLDALSGHTSASVEAVRYSEKSRATKIGITITETRPDYCLGPHLRDMLTYGCT

H.s. 242  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGLERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
M.m. 261  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGLERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
D.m. 244  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGLERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
C.e. 245  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGLERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
S.p. 239  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGMERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
S.c. 251  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGMERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL
A.t. 260  RLEIGVQSVYEDVARDTNRGHTVKAACEFHHLAKDSCEKVVVHMMMPDLPNVGMERDIEQIEFFENPAFRPDGLKLYPTLVIRGTGLYEL

H.s. 332  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
M.m. 351  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
D.m. 334  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
C.e. 335  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
S.p. 329  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
S.c. 341  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE
A.t. 350  WKTGRYKSYSPDLVLELVARILALVPPWTRVYRVQDIPMPLVSSGVEHGNLRELALARMKDLGTCRDVRTREVGIQEIHHKVRPYQVE

H.s. 422  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSSRDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
M.m. 441  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSSRDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
D.m. 424  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSNARDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
C.e. 425  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSNARDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
S.p. 419  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSNARDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
S.c. 431  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSNARDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA
A.t. 440  LVRRDYVANGGWETFLSYEDPDQDILIGLLRLRKCSEETFRFELGCG-VSIVRELHVYGSVVPVSNARDPKFKFHQGFGLLMEEAERIA

H.s. 510  REEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
M.m. 529  REEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
D.m. 512  REEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
C.e. 513  REEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
S.p. 508  KYEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
S.c. 521  KEEHGSKIAVISGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----
A.t. 477  -----VTCGVGTRNYYRKLGYRLOGPYMKMLK----

```

**Abb. 41:** Alignment der Tot3p Aminosäuresequenzen der Organismen von *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *C.e.* = *Cenorhabditis elegans*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

#### Accession Nummern von Tot3p & Tot3p homologen

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL Q02908

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL O14023

*Homo sapiens*: TrEMBL Q9BVF7

*Mus musculus*: TrEMBL Q8C2K2

*Drosophila melanogaster*: TrEMBL Q9VQZ6

*Cenorhabditis elegans*: TrEMBL Q23651

*Arabidopsis thaliana*: TrEMBL Q93ZR1

**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot 3p**

<b>Seq-&gt;</b>	<b>H.s.</b>	<b>M.m.</b>	<b>D.m.</b>	<b>C.e.</b>	<b>S.p.</b>	<b>S.c.</b>	<b>A.t.</b>
<b>H.s.</b>	1,000	0,925	0,818	0,779	0,712	0,725	0,635
<b>M.m.</b>	---	1,000	0,787	0,743	0,676	0,701	0,620
<b>D.m.</b>	---	---	1,000	0,768	0,703	0,716	0,621
<b>C.e.</b>	---	---	---	1,000	0,707	0,690	0,629
<b>S.p.</b>	---	---	---	---	1,000	0,756	0,593
<b>S.c.</b>	---	---	---	---	---	1,000	0,588
<b>A.t.</b>	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tab. 11:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus dem Alignment der Tot3p Aminosäuren Sequenzen der **Abb. 41** angefertigt. *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *D.m.* = *Drosophila melanogaster*, *C.e.* = *Cenorhabditis elegans*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 (Hall 2001) erstellt.

Standard ORF Name: YPL086c

Synonym: *ELP3, TOT3, HPA1, KT18*

Beschreibung: Das Tot3p Protein besitzt eine Histonacetyltransferase (HAT) Domäne.

**Genetik**

Disruption: Die *tot3Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot3Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretrierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

**Physikalische Merkmale**

Koordinaten: 386441 - 384768 (C)

Länge: 1674 nt

Chromosom: 16

GC Gehalt: 38.1 %

Protein Länge: 557 aa

Isoelektrischer Punkt: 9.11

Molekular Gewicht: 63657.3 Da



**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot 4p**

Seq->	H.s.	M.m.	D.m.	S.p.	S.c.	A.t.
H.s.	1,000	0,765	0,271	0,238	0,216	0,242
M.m.	---	1,000	0,284	0,245	0,215	0,238
D.m.	---	---	1,000	0,288	0,255	0,255
S.p.	---	---	---	1,000	0,369	0,266
S.c.	---	---	---	---	1,000	0,243
A.t.	---	---	---	---	---	1,000

**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot4p (Fortsetzung)**

Seq->	D.d.	S.c.	G.l.	M.j.
D.d.	1,000	0,292	0,196	0,185
S.c.	---	1,000	0,202	0,171
G.l.	---	---	1,000	0,135
M.j.	---	---	---	1,000

**Tab. 12:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus dem Alignment der Tot4p Aminosäuren-Sequenzen der **Abb. 42 & 43** angefertigt. H.s. = *Homo sapiens*, M.m. = *Mus musculus*, D.m. = *Drosophila melanogaster*, C.e. = *Caenorhabditis elegans*, A.t. = *Arabidopsis thaliana*, S.p. = *Shizosaccharomyces pombe*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*, D.d. = *Dictyostelium discoideum*, G.l. = *Giardia lamblia*, M.j. = *Methanococcus jannaschii*. Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 (Hall 2001) erstellt.

Standard ORF Name: YKL110c

Synonym: *KTI12*, *TOT4*

Beschreibung: Tot4p besitzt ein P-Loop Motiv und eine Calmodulin Domäne.

Interaktionen: Mit dem Elongator assoziiert.

**Genetik**

Disruption: Die *tot4Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot4Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist TS über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretrierte Wt. Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

**Physikalische Merkmale**

Koordinaten: 229523 - 228582 (C)

Länge: 942 nt

Chromosom: 11

GC Gehalt: 39.8 %

Protein Länge: 313 aa

Isoelektrischer Punkt: 8.12

Molekular Gewicht: 35322.6 Da

**Accession Nummern von Tot4p & Tot4p homologen**

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL P34253

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL Q9P7V4

*Homo sapiens*: TrEMBL Q96EK9

*Mus musculus*: TrEMBL Q9D1R2

*Drosophila melanogaster*: TrEMBL O46079

*Arabidopsis thaliana*: TrEMBL Q8H2D4

*Dictyostelium discoideum*: TrEMBL Q86H29

*Giardia lamblia*: TrEMBL EAA41913

*Methanococcus jannaschii*: TrEMBL Q58933

### 6.1.5 Tot5p Alignment & TOT5 Daten

```

s.c. 1  MASSSHNPVILKRLLSLLESSPFILCLDSIAQTSYKLIQEFVHOSKSKGNEYPIVYISFETVNK--PSYCTQFIDATQMDVFVHLVKQII
s.p. 1  -----MSKFLINRCIRDLIS---PLTVLKNLQOTAKPILNYAKNAASRC--IKVLFISYETLEKEAPEGIDCFLYATSWEKVKSLKELY

s.c. 89  SYLPAATATQARKHMVITDSLNYS---TEYITRFLSEIASPCHTMVATYHKDKDENRTVIPDWNNNYPDKLTLQFMATTIVDIDVV
s.p. 81  EHISSWR--TQGRQHTVMIDTINPLLNTSISSTMFFGSVLALGSI CFLT SFHKDVTLN-----YPSYLPCEVEFLDFSTCTVSLIGM

s.c. 175  LTGTLDTTEVSELLNEFRIPRGLNNDIFQLRLVNKRKSGRSLEYDFIVNSN--THEYELLSTTKQE-----ESSSNGLETPEMLQGLTT
s.p. 164  QHLSVEHDAKMRS L PNP-LLEELQDDKIIISLLG S N C E T A I V L H V E R R K K S G R I I K E S C V L K N G K L E P Y T P F E E T A R G P E P A D N Q I D F N V S

s.c. 258  FNLGTSNKKOKLAKDOVALPFLFAQSFG-----QGCATVVEYEKDDVDEEDPYEDPF--
s.p. 253  FNLNVSEKRRKERKDKVFLPYFSAQMVGSQHSSFVDECTIIVYHADEADDEDEEEDADEDLII

```

**Abb.44:** Alignment der Tot5p Aminosäuresequenz der Organismen von *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

### Accession Nummern von Tot5p & Tot5p homologen

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL P38874

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL O94495

### Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot5p

Seq	S.c.	S.p.
S.c.	1,000	0,225
S.p.	---	1,000

**Tab. 13:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus dem Alignment der Tot5p Aminosäuren-Sequenzen der **Abb. 44** angefertigt. *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 (Hall 2001) erstellt.

Standard ORF Name: YHR187W

Synonym: *IKI1*, *TOT5*, *KTI4*, *ELP5*, *HAP2*

### Genetik

Disruption: *tot5Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot5Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

### Physikalische Merkmale

Koordinaten: 480986 - 481915 (W)

Länge: 930 nt

Chromosom: 8

GC Gehalt: 39.1 %

Protein Länge: 309 aa

Isoelektrischer Punkt: 4.72

Molekular Gewicht: 35219.8 Da

### 6.1.6 TOT6 Daten

Von Tot6p gibt es keine signifikanten homologen Proteine in anderen Organismen.

Standard ORF Name: YMR312W

Synonym: *TOT6*, *ELP6*, *HAP3*

## Genetik

Disruption: *tot6Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot6Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azuracil sensitiv. Zymocin arretierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

## Physikalische Merkmale

Koordinaten: 898405 - 899226 (W)

Länge: 822 nt

Chromosom: 13

GC Gehalt: 39.5 %

Protein Länge: 273 aa

Isoelektrischer Punkt: 6.18

Molekular Gewicht: 30573.9 Da

## Accession Nummer von Tot6p

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL Q04868

### 6.1.7 Tot7p Alignment & TOT7 Daten

```

H.s. 1 -----MAAVATCGSVAASTGSAVATASKSNVTSFQRRGPRASVTNDSGPRLVSIAGTRPESVVRNGQLLVSTIGL
M.m. 1 -----MAAADTCGAGTSSRSVASEAGQGGTSSFQRRG-KASGGPGGGPRLLSIAAGTRPESVVRNGQLLVSTIGL
A.t. 1 -----MAAPNVRSSSSFSRNI SVVSSPQ-----IPGLKSGP-NGTAFISSGI
S.p. 1 -----MSFKRKAAPQIAPT-----LPTGVRLSSKDARWITSSGS
S.c. 1 MSFRKRGEILNDRGSGLRGPLLGRPPRTSSTPLRTGNRRAPGNVPLSDTTARLKKLNIADESKTKMGLDSSHVGVRESPATSOPTTSTIGS

H.s. 68 PALDQLLG-GGLAVGTVLLTEEDKYNISPLLPKYFLAEGIVN-----GHTLLVASAKEDP--ANILQELPAE-----
M.m. 67 PALDQLLG-GGLAVGTLLLEEDKYNISPLLPKYFLAEGIVN-----GHTLLVASAKENP--AKILQELPAE-----
A.t. 42 RDLDRILG-GGYPLGSLVMVMEPEAPHMDLLRTYMSQGLVN-----NQPLLYASPSKDP--KGFGLTLPHE-----
S.p. 36 SSFDYYLS-GGIPMKSLLVTEEDS-MDYASVLLKFFAAEGLKQ-----DHVITWLGPSIGEMWFRQLPGDSDRE-----
S.c. 91 ADLDSL LGHMGLPLGNSVLVVEEOSTTEFHSILGKLFACGI VHNRI SDSSADKTRNGDTHVIVLSLNMQFAKELPGIYKGRKQMKKNLI

H.s. 133 LLDKCKKEFDEVDYHNKTPESNIKMKIAWRYQLPKMEIGPVSSSR--FGHYVDASKRMPQELIEASNWHGFFLPEKISSTLKVEPCSL
M.m. 132 LLDNSKKEL-EDVHSAKTPEPNVNMKIAWRYQLPKMEVGPVSSSR--FGHYVDLSKRIPWELLQSSKWHGFFLPEHISPDLKGESCF
A.t. 107 ASSK-----EDKPTAPDPQGESLRIAWQYRKYLENQKNAIDD---YSNDFDMRKPLERQFLSGRPIDCVSLDSSDLSIAQDHCAT
S.p. 102 NKNENSAGEDNHSSPPSKNPQQ-ERMKIAWRYEQVSKTKAPLDMIPPGYTHSFDLSKNIIVKSDMKYAVSFPPLTGTGSPYAPVIESLT
S.c. 181 SEESKVTVQNINETQRSTPSRYKDLKIAWKYKLADEKRLGSPDRDD---IQNSEYKDYNHQFDITTRLMPAPITASELTFIAPTQPVST

H.s. 221 TPGYTKLQFIQNIIEEGFDGNSNPQKKQRNILRIGLQNLGSPPLWGDDICCAENGGNSHSLTKFLYVIRGLLRTSLSACIITMP----TH
M.m. 219 SCGYMRLEFIQKSVYAEFGDGANPQKKQKNILRIGLQNLGSPPLWGDDICCKENCNNHRLTKFLYVIRGLLRRSLSACIITMP----AH
A.t. 185 -----FLSKFPRNS-----SNIASIGRIALQSFCSPLC-----EYSEKESDMLSEIRLLKSMMLMVSNAVAIVTFP----PS
S.p. 191 R-----FLSTLTPGT-----VCRLLVPSILSPAFYS-----IRATHPHQHFIRIHTLSSLIKCTTSVHLICMCSVPSTL
S.c. 267 -----LLSQIEQTIK-----RNDKKLIRIVLPSLLHPAMY-----PKMFESSEIIGLMHGVRSLVKYKVERVLFAS----IFI

H.s. 307 LIQNKAIARVTTLSQVVGLESFIGSERETN-----PLYKDYHGLIHTROIPRLN--NLICDES DVKDLAFKLRKRLFTIEAGVQWHD
M.m. 305 LVQNKSIITRVRNLSDTVVGLESEFIGSERETN-----PLYKDYHGLIHTRQIPRLN--NLTCDSE DVKDLAFKLRKRLFTIER-----
A.t. 248 LLS-PSSSKRLQHMADTLLSTKALPDGDKLEK---LLTGYKDIINGFLNIHKVARIN--TQVPVILEAKTFMSLKKRRFLALECLN---
S.p. 255 FSRDCEQIFWLENLASAVFSIHPFVVKETVNG-----LVTQPLGLFRITKLP LALPFTNHANSNEAGDLSEITVSKRRFTIEPWWLP--
S.c. 334 DIITPPLLVLRLNMFDSVINLEPFPQEMTEFLERVYKSOQPKIQHGLVHILKLPVFT--DRGEMRVLKSEWAFKNGRKKKEIEQWGP--

H.s. 389 LGSRRPRLGSGGSPASASLVAGITGAHHHAQLIFVFLVEMGFHHVQAGLELLTSGDSSASASQSAAGIAGMSYRARPRALYFKENKSKV
M.m. 380 -----LHLPPDLS-----DTVGRS-----SKQDLAASTARLG--AGCQSSMAE-----
A.t. 328 -----QAPVDGSSGTSYGTSGCQSSKSG-----PLDDEQKDKISNTNPQKQPVK-----
S.p. 335 -----VDDAEGSAASEQSHSHSHSDEISHN-----

H.s. 479 GARQLEETREEHLSRLLILTQAERLCMGRFFTAHFHIFNELPCKGDCICLQTCQTQ
M.m. 415 -----GKKHLDF-----
A.t. 351 -----ALDF-----
S.p. 357 -----SLDF-----
S.c. 444 ---IPAKKTKISLDY

```

**Abb. 45:** Alignment der Tot7p Aminosäuresequenzen der Organismen von *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche sind hellgrau unterlegt. Für das Protein-Alignment wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson et al. 1994).

**Sequenz-Identitäts-Matrix von Tot 7p**

Seq->	H.s.	M.m.	A.t.	S.p.	S.c.
H.s.	1,000	0,575	0,150	0,139	0,133
M.m.	---	1,000	0,211	0,179	0,156
A.t.	---	---	1,000	0,186	0,140
S.p.	---	---	---	1,000	0,176
S.c.	---	---	---	---	1,000

**Tab. 14:** Die Sequenz-Identitäts-Matrix wurde aus den Alignment der Tot7p Aminosäuren-Sequenzen der **Abb. 45** angefertigt. *H.s.* = *Homo sapiens*, *M.m.* = *Mus musculus*, *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S.p.* = *Shizosaccharomyces pombe*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz Identitäts-Matrix wurde mit dem Programm BioEdit 5.0.9 erstellt (Hall 2001).

Standard ORF Name: YPL101W

Synonym: *TOT7*, *KT19*, *ELP4*, *HAP1*

Interaktionen: Mit Tot2p, Tot5p

**Genetik**

Disruption: *tot7Δ* Null-Mutante ist lebensfähig

Phänotypen: Die *tot7Δ* Null-Mutante ist resistent gegen pGKL Killertoxin Zymocin, wächst langsam, ist thermosensitiv über 38°C, Caffein, Calcofluor White und 6-Azauracil sensitiv. Zymocin arretierte Wildtyp Hefezellen zeigen einen G1 Zellzyklus Arrest.

**Physikalische Merkmale**

Koordinaten: 360204 - 361574 (W)

Länge: 1371 nt

Chromosom: 16

GC Gehalt: 42.8 %

Protein Länge: 456 aa

Isoelektrischer Punkt: 9.45

Molekular Gewicht: 51155.7 Da

**Accession Nummern von Tot7p & Tot7p homologen**

*Saccharomyces cerevisiae*: TrEMBL Q02884

*Shizosaccharomyces pombe*: TrEMBL Q9USP1

*Homo sapiens*: TrEMBL Q96EB1

*Mus musculus*: TrEMBL Q8BGM1

*Arabidopsis thaliana*: TrEMBL Q9C778

**Übersichtstabelle**

S. C.	S. P.	H. S.	M. M.	D. M.	C. E.	A. T.	FUNKTION	HOMOLOGIE
<i>TOT1</i>	Q59704	<b>IKAP</b>	AAH52387	Q9VGK7	Q9N595	Q9FNA4	Gerüst?	Ø 25%
<i>TOT2</i>	Q94533	<b>hELP2</b>	Q91WG4	Q9V5N6	Q9NEW7	Q9XIC1	?	Ø 25%
<i>TOT3</i>	O14023	<b>hELP3</b>	Q8C2K2	Q9VQZ6	Q23651	Q93ZR1	HAT	Ø 70%
<i>TOT4</i>	Q9P7V4	Q96EK9	Q9D1R2	O46079	Z99281	<b>DRL1</b>	?	Ø 25%
<i>TOT5</i>	Q94495						?	Ø 22%
<i>TOT6</i>							?	
<i>TOT7</i>	Q9USP1	<b>PAXNEB</b>	Q8BGM1		Q9C778	Q9C778	?	Ø 20%

**Tab. 15:** Übersichtstabelle über die Identifizierten homologen *TOT* Sequenzen (Accession-Nummern) und den bisher Identifizierten und charakterisierten homologen Proteinen.

## 7 Abkürzungen

A	Ampere, elektrischer Strom
aa	amino acid
Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
β- Gal	β- Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Crick Strang
ca	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHS	Chitin Synthase
c-Myc	zelluläres menschliches Myelocytomatose Epitope
Co-Ip	Co-Immunpräzipitierung
CSPD	(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-5'-chloro}Tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)Chenylphosphat, Dinatriumsalt
CTD	c-terminale Domäne der RNA-Polymerase-II
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	DNA Polymerase
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang
DTE	Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELP	Elongator Protein
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
μF	Mikro Farad, elektrische Kapazität
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellen Sortierung
5-FOA	Fluoroorotik Säure
g	Erdbeschleunigung
% GC	GC-Gehalt der DNA Olinukleotid in %
GFP	Green Fluorescent Protein

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GRX	GlutaRedoXin
HA	Influenza Virus Haemagglutinin Epitop
HAP	Histon assoziiertes Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin
IgG	Immunglobulin G
iki	Insensitive to Killertoxin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IR	Inverse Reiteration
Kbp	Kilobasenpaare
KD	Kilo Dalton
kti	Killer Toxin Insensitiv
LB	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Mol
MCS	Klonierungsstelle
min	Minuten
mips	munic information center for proteins
Mk	Multikopie
mM	milli Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTn3	Mini mTn3 Transposon
mU	milli Units
N	Länge der DNA-Sonde in bp
[Na <sup>+</sup> ]	Konzentration der Natriumionen
NBT	Nitro-blau- tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Non-Killer
NLS	Nukleus Lokalisation Sequence
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
$\Omega$	Ohm, elektrischer Widerstand
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PAS-AK	Protein A-Sepharose-Antikörper gekoppelt
PCA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol_
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Synthetisches Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SGD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genome Database

skt	Sensitive to <i>K. lactis</i> Toxin
ss	Einzelstrang
ssb	Einzelstrangbindend
Tab	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Total-Extrakt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIR	Terminale Inverse Repetition
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt von DNA
T <sub>a</sub>	Annealing Temperatur
TOT	Toxin Target
TP	terminales Protein
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit, Einheit der Enzymaktivität
UAS	Upstream Activierungs Sequenz
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt, elektrische Spannung
vol	Volumen
v/v	Volumen zu Volumenverhältnis
W	Watson Strang
WT	Wildtyp
w/v	Gewichts zu Volumenverhältnis
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose Medium
2μ	2μ-Origin of Replikation

Nicht gesondert aufgeführt sind allgemein übliche Abkürzungen und Maßeinheiten.

**7.1 Buchstaben-Codes der Aminosäuren**

L-Alanin	Ala	A
L-Arginin	Arg	R
L-Asparagin	Asn	N
L-Asparaginsäure	Asp	D
L-Cystein	Cys	C
L-Glutamin	Gln	Q
L-Glutaminsäure	Glu	E
L-Glycin	Gly	G
L-Histidin	His	H
L-Isoleucin	Ile	I
L-Leucin	Leu	L
L-Lysin	Lys	K
L-Methionin	Met	M
L-Phenylalanin	Phe	F
L-Prolin	Pro	P
L-Serin	Ser	S
L-Threonin	Thr	T
L-Tryptophan	Trp	W
L-Tyrosin	Tyr	Y
L-Valin	Val	V

**7.2 Abkürzungen der Basen-Wobbles**

<u>Abkürzung</u>	<u>Basen</u>
N	A, G, C, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	G, C
W	A, T

## 8 Literatur

**Abril OF, Agarwal P, Alexandersson M, Antonarakis SE, Baertsch R, Berry E, Birney E, Bork P, Bray N, Brent MR et al. (2002):** The mouse genome. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520 - 562

**Adams MD, Celnikel SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne J D, Amanatides P G, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RFJ, Venter C et al. (2000):** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.

**Archambault J, Lacroute F, Ruet A, Friesen JD (1992):** Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIIS and RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol* 12: 4142-4152.

**Arndt KT, Styles CA, Fink GR (1989):** A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* 4: 527-537.

**Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) (1989):** Current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates / Massachusetts General Hospital / Harvard Medical School.

**Baudin A, Ozier-Kalogeropolus O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C (1993):** A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res* 21: 3329-3330.

**Becker DM & Guarente L (1991):** High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* 194: 182-187.

**Berben G, Dumont J, Gilliquet V, Bolle PA, Hilger F (1991):** The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 475-477.

**Berger SL & Kimmel AR (ed.) (1987):** Guide to molecular cloning techniques. *Methods in Enzymology* 157: 1-757, Academic Press.

**Birnboim HC & Doly J (1979):** A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.

**Bolen PL, Eastman EM, Cihak PL, Hayman GT (1994):** Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 10: 403-414.

**Bradford MM (1976):** Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 258: 2913-2201.

**Brown CE, Lechner T, Howe L, Workman JL (2000):** The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 25: 15-19.

**Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996):** *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851.

**Bulawa CE (1992):** CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 12:1764-1776.

**Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987):** XL1 blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376.

**Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Adams MD, Woese CR and Venter JC et al. (1996):** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073.

**Burns N, Grimwade B, Ross-Macdonald PB, Choi EY, Finberg K, Roeder G S Snyder M (1994):** Large-scale analysis of gene expression, protein localisation, and gene disruption in of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen Dev* 8: 1087-1105.

**Burns N, Ross-Macdonald PB, Roeder GS, Snyder M (1996):** Generation, screening, and analysis of LacZ fusions in yeast. In *Microbial Genome Methods* Ed. Adolph K. W.; Chapter 4: 63 - 80.

**Butler AR, White JH, Stark MJR (1991a):** Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J General Microbiology* 137: 1749 - 1757.

**Butler AR, Porter M, and Stark MJ (1991b):** Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast* 7: 617-625.

**Butler AR, O'Donnell RW, Martin VJ, Gooday GW, Stark MJR (1991c):** *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* 199: 483 - 488.

**Butler AR, White JH, Folawiyo Y, Edlin A, Gardiner D, Stark MJR (1994):** Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol Cell Biol* 14: 6306-6316

**Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA (1998):** IKAP is a scaffold protein of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* 395: 292-296

**Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C (2000):** A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10120-10125.

**Davis RW, Thomas M, Cameron J, John TP, Scherer S Padget R A (1980):** Rapid DNA Isolations for enzymatic and hybridisation analysis. *Methods Enzymol* 65: 404-411.

**Dingwall C & Laskey RA (1991):** Nuclear targeting sequences – a consensus? *TIBS* 16: 478-481.

**Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V (1998):** Structure of the yeast histone acetyltransferase Hat1: insights into substrate specificity and implications for the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 501-507.

**Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993):** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7: 555-569.

**Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ (2000):** Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* 37: 926 – 940.

**Elango N, Corraera JU, Cabib E (1982):** Secretory character of yeast chitinase. *J Biol. Chem* 257: 1398 – 1400.

**Elorza MV, Rico H, Sentandreu P (1983):** Calcoflour white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* 129: 1577-1582.

**Exinger F & Lacroute F (1992):** 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22: 9-11.

**Fellows J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2000):** The Elp2 subunit of elongator and elongating RNA polymerase II holoenzyme is a WD40 repeat protein. *J Biol Chem* 275: 12896-12899.

**Fichtner L, Frohloff F, Bürkner K, Larsen M, Breunig KD, Schaffrath R (2002a):** Molecular analysis of *KTI12/TOT4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol Microbiol* 43: 783-791

**Fichtner L, Frohloff F, Jablonowski D, Stark MJR, Schaffrath R (2002b):** Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocinicity. *Mol Microbiol* 45: 817-826.

**Fichtner L & Schaffrath R (2002c):** *KTI11* and *KTI13*, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Microbiol* 44: 865-875.

**Fichtner L, Jablonowski D, Schierhorn A, Kitamoto HK, Stark MJ, Schaffrath R (2003):** Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol* 49: 1297 - 1307.

**Frohloff F, Fichtner L, Jablonowski D, Breunig KD, Schaffrath R (2001):** *Saccharomyces cerevisiae* elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *EMBO J* 20: 1993-2003.

**Frohloff F, Jablonowski D, Fichtner L, Schaffrath R (2003):** Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA Polymerase II elongator (gamma -Toxin Target (TOT)) complex. *J.Biol Chem* 2: 956-961.

**Fujimura H, Yamada T; Hishinuma F; Gunge N (1988):** DNA replication in *in vivo* of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 49: 441-445.

**Fukuda K, Maebuchi M, Takata H, Gunge N (1997):** The linear plasmid pDHL1 from *Debaryomyces hansenii* encodes a protein highly homologous to the pGKL1-plasmid DNA polymerase. *Yeast* 13: 613-620.

**Fukuhara H (1987):** The RF1 gene of the killer DNA of yeast may encode a DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 15: 10046.

**Gietz RD & 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.

**Gietz D, St-Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992):** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425.

**Gietz RD & Woods RA (1998):** Transformation of yeast by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method. *Meth Microbiol* 26: 53-66.

**Gilbert C, Kristjuhan A, Winkler GS, Svejstrup JQ (2004):** Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell* 14: 457-464

**Glover DM (ed.) (1987):** DNA Cloning. A Practical Approach. IRL Press Oxford, Washington.

**Goffeau A, Barrel BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H et al. (1996):** Life with 6000 genes. *Science* 274: 5287: 563-567.

**Goffeau A et al. (1997):** The yeast genome directory. *Nature* 387: 3- 105

**Grant CM (2001):** Role of the glutathion/Glutharedoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 39: 533-541

**Gunge N, Tamaru A, Ozawa F, Sakaguchi K (1981):** Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol* 145: 382-390.

**Guthrie C & Fink GR (ed.) (1991):** Guide to yeast genetics and molekular biologie; *Methods in Enzymology* Volume 194; Academic Press 1991.

- Hall T (2001):** BioEdit 5.0.9. Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology, North Carolina State University. ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html))
- Hampsey M (1997):** A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1099-1133.
- Hanahan D (1985):** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Glover, D. M. (ed.) DNA Cloning. IRL Press.
- Hartzog GA, Wada T, Handa H, Winston F (1998):** Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 12: 357-369.
- Hawkes NA, Otero G, Winkler GS, Marshall N, Dahmus ME, Krappmann D, Scheidereit C, Thomas CL, Schiavo G, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002):** Purification and characterization of the human Elongator complex. *J Biol Chem* 277: 3047-3052.
- Hayman GT & Bolen BL (1991):** Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet* 19: 389 – 393.
- Hendzel MJ, Kruhlak MJ, MacLean NAB, Boisvert FM, Lever MA, Bazett-Jones DP (2001):** Compartmentalization of regulatory proteins in the cell nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76: 9-21.
- Hishinuma F & Hirai K (1991):** Genome organization of the linear plasmid, pSKL, isolated from *Saccharomyces kluyveri*. *Mol Gen Genet* 226: 97-106.
- Jablonowski D (2000):** Molekulare Analyse chitin-defizienter (chs) *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten auf die Wirkung des Zymotoxins von *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit.
- Jablonowski D, Fichtner L, Martin VJ, Klassen R, Meinhardt F, Stark MJR, Schaffrath R (2001a):** *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zymocin receptor. *Yeast* 18: 1285-1299
- Jablonowski D, Frohloff F, Fichtner L, Stark MJR, Schaffrath R (2001b):** *Kluyveromyces lactis* zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator. *Mol Microbiol* 42: 1095-1106.
- Jablonowski D, Butler AR, Fichtner L, Gardiner D, Schaffrath R, Stark MJR (2001c):** Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Genetics* 159: 1479-1489.
- Jablonowski D & Schaffrath R (2002):** *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II is affected by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *J Biol Chem* 29: 26276-26280.

**Jablonowski D, Fichtner L, Stark MJ, Schaffrath R (2004):** The yeast elongator histone acetylase requires Sit4-dependent dephosphorylation for toxin-target capacity. *Mol Biol Cell* 15: 1459-1469.

**Kämper J, Esser K, Gunge N, Meinhardt F (1991):** Heterologous expression on the linear DNA killer plasmid from *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 19: 109-118.

**Kawamoto S, Arai N, Kobayashi M, Kawahara K, Iwaheshi H, Tanabe C, Hatori H, Ohno T, Nakamura T (1990):** Isolation and characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *J Ferment Bioeng* 4: 222-227.

**Kawamoto S, Sasaki T, Itahashi S, Hatsuyama Y, Ohno T (1993):** A mutant allele *skt5* affecting protoplast regeneration and killer toxin resistance has double mutations in its wild-type structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol Biochem* 57: 1391-1393.

**Kim JH, Lane, WS, Reinberg D (2002):** Human elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1241-1246.

**Kirkpatrick D & Solomon F (1994):** Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class  $\alpha$ -tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics* 137: 381-392.

**Kishida M, Tokunaga M, Katayose Y, Yajima H, Kawamura-Watabe A, Hishinuma F (1996):** Isolation and genetic characterization of pGKL killer-insensitive mutants (*iki*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Biochem* 60: 798 - 801.

**Kishida M, Tokunaga M, Nakayama-Murayama A, Hishinuma F (1997):** Characterization of IKI1 and IKI3 genes conferring pGKL killer sensitivity on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 704-709.

**Kitada K & Gunge N (1988):** Palindrome-hairpin linear plasmids possessing only part of the ORF1 gene of the yeast killer plasmid pGKL1. *Mol Gen Genet* 215: 46-52.

**Kitamoto HK, Jablonowski D, Nagase J, Schaffrath R (2002):** Defects in yeast RNA polymerase II transcription elicit hypersensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Gen Genet* 268: 49-55.

**Klassen R, Tontsidou L, Larsen M, Meinhardt F (2001):** Genome organization of the linear cytoplasmic element pPE1B from *Pichia etchellsii*. *Yeast* 18: 953-961.

**Klassen R, Jablonowski D, Schaffrath R, Meinhardt F (2002):** Genome organization of the linear *Pichia etchellsii* plasmid pPE1A: evidence for expression of an extracellular chitin-binding protein homologous to the alpha-subunit of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Plasmid* 3: 224-233.

**Klassen R & Meinhardt F (2002):** Linear Plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast *Wingea robertsiae* are associated with a killer phenotype. *Plasmid* 48: 142 – 148.

- Klassen R & Meinhardt F (2003):** Structural and functional analysis of the killer element pPin1-3 from *Pichia inositovora*. *Mol Genet Genomics* 270: 190 – 199.
- Klassen R, Teichert S, Meinhardt F (2004):** Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol* 53: 263 – 273.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R (1995):** Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270: 24674-24677.
- Klekamp MS & Weil PA (1982):** Specific transcription of homologous class III genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* soluble cell-free extract. *J Biol Chem* 257: 8432-8441.
- Knop M, Siegers K, Pereire G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999):** Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15: 963 -972.
- Kopecka M & Gabriel M (1992):** The influence of congo red on the cell wall and (1→3)-β-D-Glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 158: 115-126.
- Krogan NJ & Greenblatt JF (2001):** Characterization of a six-subunit holo-Elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 8203-8212.
- Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF (2002):** RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol* 22: 6979-6992.
- Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Meldrim J et al. (2001):** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860 - 921
- Lane D & Harlow E (1982):** Two different viral transforming proteins bind the same host tumour antigen. *Nature* 298: 517.
- Larsen M, Gunge N, Meinhardt F (1998):** *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: Evidence for a viral-like capping enzyme encoded by *ORF3*. *Plasmid* 40: 243-246.
- Larsen M & Meinhardt F (2000):** *Kluyveromyces lactis* killer system: identification of a new gene encoded by pGKL2. *Curr Genet* 38: 271-275.
- Leis S, Reiter J, Sendzik T, Schmitt MJ, (2004):** Virale Killertoxine der Hefe – Wirkung auf Zellzyklus und DNA Synthese. *Biospectrum* 4: 387 – 388.

**Li Y, Takagi Y, Jiang Y, Tokunaga M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD (2001):** A multiprotein complex that interacts with RNA polymerase II Elongator. *J Biol Chem* 276: 29628-29631.

**Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF (1989):** Molecular cloning: A laboratory manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. USA

**McCracken DA, Martin VJ, Stark MJ and Bolen PL (1994):** The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: Characterisation and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 140: 425 – 431.

**McCracken DA, Martinko JM, Parker J (1997):** Biology of microorganisms. Prentice Hall Int. Inc. 1997

**McNeel DG & Tamanoi F (1991):** Terminal region recognition factor 1, a DNA binding protein recognising the ITRs of the pGKL linear plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11398-11402.

**Mehlgarten C & Schaffrath R (2003):** Mutant casein kinase I (Hrr25p/Kti14p) abrogates the G1 cell cycle arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin in budding yeast. *Mol Genet Genomics* 269: 188-196.

**Mehlgarten C & Schaffrath R (2004):** After chitin docking, toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin requires *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H-ATPase. *Cell Microbiol* 6: 569-580.

**Meijer WJ, Horcajadas JA, Salas M (2001):** Phi29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 261-287

**Meilhoc E, Masson JM, Teissie J (1990):** High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *BioTechnology* 8: 223-227.

**Meinhardt F, Kemken F, Kämpfer J, Esser K (1990):** Linear plasmids among eucariotes: fundamentals and applications. *Curr Genet* 17: 89-95.

**Meinhardt F, Wodara C, Larsen M, Schickel J (1994):** A novel approach to express a heterologous gene *Kluyveromyces lactis* linear killer plasmids: expression of the bacterial *aph* gene from a cytoplasmic promoter fragment not fused in frame. *Plasmid* 32: 318-327.

**Meinhardt F, Schaffrath R, Larsen M (1997):** Microbial linear plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 47: 329-336.

**Meinhardt F & Schaffrath R (2001):** Extranuclear inheritance: cytoplasmic linear double-stranded DNA killer elements of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis*. *Prog Bot* 62: 51-70.

**Molano J, Bowers B, Cabib E (1980):** Distribution of chitin in the yeast cell wall. An Ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* 85: 199-212.

**Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.

**Murgui A, Elorza MV, Sentandreu R (1985):** Effect of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the cell wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochem Biophys Acta* 841: 215-222.

**Nelissen H, Clarke JH, De Block M, De Block S, Vanderhaeghen R, Zielinski RE, Dyer T, Lust S, Inze D, Van Lijsebettens M (2003):** DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. *The Plant Cell* 15: 639 – 654.

**Niwa O, Sakaguchi K, Gunge N (1981):** Curing of the killer deoxyribonucleic acid plasmids of *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol* 148: 988-990.

**Otero G, Fellows J Li Y, de Bizemont T, Dirac AMG, Gustavson CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (1999):** Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Molecular Cell* 3, 109 -118.

**Petrakis TG, Wittschieben BO, Svejstrup JQ (2004):** Molecular architecture, structure-function relationship, and importance of the Elp3p subunit for the RNA binding of holo-elongator. *J Biol Chem* 279: 32087-32092.

**Pokholok DK, Hannett NM, Young RA (2002):** Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell* 9: 799-809.

**Ponting CP (2002):** Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res* 30: 3643-3652.

**Prelich G (2002):** RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function. *Eukaryotic Cell* 1: 153-162.

**Pring DR, Levings CS, Hu W, Timothy DH (1977):** Unique DNA associated with mitochondria in the S-type cytoplasm of male sterile maize. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:2904-2908.

**Ram AFJ, Wolters A, Ten-Hoopen R, Klis FM (1994):** A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* 10: 1019-1030.

**Reifsnyder C, Lowell J, Clarke A, Pillus L (1996):** Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet* 14: 42-49.

**Robinson MM, Royer JC, Horgen PA (1991):** Homology between mitochondrial DNA of *Agaricus bisporus* and an internal portion of a linear mitochondrial plasmid of *Agaricus bisporus*. *Curr Genet* 21: 173-176.

- Rojas JR, Trievel RC, Zhou J, Mo Y, Li X, Berger SL, Allis CD, Marmorstein R (1999):** Structure of *Tetrahymena* GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* 401: 93-98.
- Romanos MA & Boyd A (1988):** A transcriptional barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid k1 of *Kluyveromyces lactis*: evidence that native k1 has novel promoters. *Nucleic Acids Res* 16: 7333-7350.
- Roncero C & Duran A (1985):** Effect of calcofluor white and congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerisation. *J. Bacteriol.* 163: 1180 – 1185.
- Roncero C, Valdivieso MH, Ribas JC, Duran A (1988):** Isolation and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to calcofluor white. *J Bacteriol* 170: 1950-1954.
- Ross-Macdonald P, Sheehan A, Roeder GS, Snyder M (1997):** A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 190-195.
- Ross-Macdonald P, Sheehan A, Friddle C, Roeder GS, Snyder M (1998):** Transposon tagging I: A novel system for monitoring protein production, function and localization. *Meth Microbiol* 26: 161-179.
- Rothstein RJ (1983):** One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101: 202-210.
- Salas M, Freire R, Soengas MS, Esteban JA, Mendez J, Bravo A, Serrano M, Blasco MA, Lazaro JM, Blanco L et al. (1995):** Protein-nucleic acid interactions in bacteriophage phi 29 DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* 17: 73-82. Review.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):** Molecular cloning: A laboratory manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. USA
- Sandvig K & van Deurs B (2002):** Membrantrafficking exploited by protein toxins. *Ann Rev Cell Dev Biol* 18: 1 – 24.
- Schaffrath R, Stark MJR, Gunge N, Meinhardt F (1992):** *Kluyveromyces lactis* killer system: *ORF1* of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance. *Curr Genet* 21: 357-363.
- Schaffrath R & Meacock PA (1995):** *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: molecular analysis of an essential gene, ORF5. *Yeast* 11: 615-628.
- Schaffrath R, Soond SM, Meacock PA (1995a):** The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology* 141: 2591-2599.
- Schaffrath R, Soond SM, Meacock PA (1995b):** Cytoplasmic gene expression in yeast: A plasmid-encoded transcription system in *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Soc Transactions* 23: 128.

- Schaffrath R & Meacock PA (1996):** A cytoplasmic gene shuffle system in *Kluyveromyces lactis*: use of epitope-tagging to detect a killer plasmid encoded gene product. *Mol Microbiol* 19: 545-554.
- Schaffrath R, Meinhardt F, Meacock PA (1996):** Yeast killer plasmid pGKL2: molecular analysis of *UCS5*, a cytoplasmic promoter element essential for *ORF5* gene function. *Mol. Gen Genet* 250: 286-294.
- Schaffrath R, Stark MJR, Struhl K (1997a):** Toxin-mediated cell cycle arrest in yeast: the killer phenomenon of *Kluyveromyces lactis*. *BIOforum Int* 1: 83-85.
- Schaffrath R, Meinhardt F, Meacock PA (1997b):** *ORF7* of yeast plasmid pGKL2: Analysis of gene expression *in vivo*. *Curr Genet* 31: 190-192.
- Schaffrath R & Meinhardt F (1998):** Das Killersystem von *Kluyveromyces Lactis*: Molekularbiologie und Biotechnik. *Biospektrum* 4: 40-44.
- Schaffrath R, Meinhardt F, Meacock PA (1999):** Genetic manipulation of *Kluyveromyces Lactis* linear DNA plasmids: gene targeting and plasmid shuffles. *FEMS Microbiology Letters* 178: 201-210.
- Schaffrath R & Breunig K D (2000):** Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* 30: 173-190
- Schaffrath R, Sasnauskas K, Meacock P A (2000):** Use of gene shuffles to study the cytoplasmic transcription system operating on *Kluyveromyces lactis* linear DNA plasmids. *Enzyme Microbial Technol* 26: 664-670.
- Schaffrath R & Meacock PA (2001):** An SSB encoded by and operating on linear killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 18: 1239-1247.
- Schaffrath R (2002):** Molekularbiologie des *Kluyveromyces lactis* Killersystems. Habilitationsschrift
- Scherer S & Davis RW (1979):** Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4951-4955.
- Schmitt MJ & Breinig F (2002):** The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26: 257 – 276.
- Sherman F (1991):** Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194: 3-21.
- Sikorski R & Hieter P (1989):** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.
- Slaughaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, Leyne M, Mull J, Cuajungco MP, Liebert CB, Chadwick B, Idelson M, Reznik L, Robbins C, Makalowska I, Brownstein M, Krappmann D, Scheidereit C, Maayan C, Axelrod FB, Gusella JF**

(2001): Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 68: 598-605.

**Stam JC, Kwakman J, Meijer M, Stuitje AR (1986):** Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucleic Acids Res* 14: 6871-6884.

**Stark MJ, Mileham AJ, Romanos MA, Boyd A (1984):** Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res* 12: 6011-6030.

**Stark MJR & Boyd A (1986):** The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J* 5: 1995-2002.

**Stark MJR, Boyd A, Mileham AJ, Romanos MA (1990):** The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast* 6: 1-29

**Staudinger J, Perry M, Elledge SJ, Olson EN. (1993):** Interactions among vertebrate helix-loop-helix proteins in yeast using the two-hybrid system. *J Biol Chem* 268: 4608-4611.

**Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds.) (1981):** The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.

**Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds.) (1982):** The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.

**Takeda M, Hiraishi H, Takesako T, Tanase S, Gunge N (1996):** The terminal protein of the linear DNA plasmid pGKL2 shares an N-terminal domain of the plasmid-encoded DNA polymerase. *Yeast* 12: 241-246.

**Takeoka S, Unoki M, Onouchi Y, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Inoue I, Nakamura Y, Tamari M (2001):** Amino-acid substitutions in the IKAP gene product significantly increase risk for bronchial asthma in children. *J Hum Genet* 46: 57-63.

**Takita MA & Castillo-Valavicus B (1993):** Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces Lactis* killer toxin. *Yeast* 9: 589 - 598.

**The Arabidopsis Genome Initiative (Authorship of this paper should be cited as "The Arabidopsis Initiative") (2000):** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 405: 796 - 815

**The C. elegans Sequencing Consortium (1998):** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994):** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tiggemann M, Jeske S, Larsen M, Meinhardt F (2001):** *Kluyveromyces lactis* cytoplasmic plasmid pGKL2: heterologous expression of Orf3p and proof of guanylyltransferase and mRNA-triphosphatase activities. *Yeast* 18: 815-825.
- Tokunaga M, Wada N, Hishinuma F (1987):** A novel yeast secretion vector utilizing secretion signal of killer toxin encoded on the yeast linear DNA plasmid pGKL1. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 613-619.
- Tokunaga M, Kawamura A, Hishinuma F (1989):** Expression of pGKL killer 28K subunit in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of 28K subunit as a killer protein. *Nucleic Acids Res* 17: 3435-3446.
- Tommasino M (1991):** Killer system of *Kluyveromyces lactis*: the open reading frame 10 of the pGKL2 plasmid encodes a putative DNA binding protein. *Yeast* 7: 245-252.
- Trilla JA, Cos T, Duran A, Roncero C (1997):** Characterization of *CHS4 (CAL2)*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4* *Yeast* 13: 795-807.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD et al (2001):** The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Vogelstein B & Gillespie D (1979):** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615-619.
- Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, Sugimoto S, Yano K, Hartzog GA, Winston F, Buratowski S, Handa H (1998):** DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12: 343-356.
- Walker GM (1998):** Yeast physiology and biotechnology. Wiley, Chichester, New York 1998.
- Weber H (1982):** Zellbiologie und Genetik der Hefen. Methoden und Arbeitstechniken. Akademie-Verlag, Berlin.
- Wickner RB (1992):** Double stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Rev Microbiol* 46: 346-375.
- Wickner RB (1996):** Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 30: 109-139.

- Wilson DW & Meacock PA (1988):** Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure. *Nucleic Acids Res* 16: 8097-8112.
- Winkler GS, Petrakis TG, Ethelberg S, Tokunaga M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2001):** RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes. *J Biol Chem* 276: 32743-32749.
- Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002):** Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3517-3522.
- Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, Li Y, Allis CD, Tempst P, Svejstrup JQ (1999):** A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 4: 123-128.
- Wittschieben BO, Fellows J, Du W, Stillman DJ, Svejstrup JQ (2000):** Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *EMBO J* 19: 3060-3068.
- Wolf K, Breunig DK, Barth G (eds.) (2002):** Nonconventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Lab manual. Springer
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Books K, Brown D, Brown S et al. (2002):** The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe* *Nature* 415: 871 - 880
- Worsham PI & Bolen PI (1990):** Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr Genet* 18: 77-80
- Yajima H, Tokunaga M, Nakayama-Murayama A, Hishinuma F (1997):** Characterization of *IKI1* and *IKI3* genes conferring pGKL killer sensitivity on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 704-709.
- Zachariae W, Shin TH, Galova M, Obermaier B, Nasmyth K (1996):** Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 274: 1201-1204.
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY (1998):** Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J* 17: 3155-3167.

## 8.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung und Betreuung von Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Raffael Schaffrath an der Fakultät für Biologie, im Institut für Genetik in der Abteilung Molekulargenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, das Interesse und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie sowie die andauernde Förderung möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Raffael Schaffrath bedanken. Bei Frau Prof. Dr. Karin D. Breunig möchte ich mich ebenfalls für ihre konstruktive Unterstützung, für ihre Anregungen und für ihre Diskussionsbeiträge bedanken.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schaffrath, bei Daniel Jablonowski, Lars Fichtner und Kleomenis Dardousis für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulargenetik bei Renate Langhammer, Carsten Milkowski, Lutz Kapp, Jorit-Jan Krijger, Konstanze Wiedemuth (geb. Bürkner) und Christian Wiedemuth, Alexander Anders, Thomas Schöninger, Xandra Volkmann, Mark Lörchner bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei den Technischen Angestellten Ulla Klokow, Karin Sorge und Edeltraud Schumacher für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Renate Langhammer, Claudia Engel, Bernd Hölle, Carsten Milkowski, Daniel Jablonowski und Diethelm Zülke möchte ich mich ganz besonders für ihre Freundschaft bedanken.

Bei meinen lieben Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich dafür bedanken, daß sie mir das Abitur und somit mein Biologiestudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen ermöglichten und mich immer unterstützt haben.

## 8.2 Curriculum Vitae

Dipl.-Biol. Frank Frohloff  
 Gerhard Marcks-Str.14  
 06124 Halle/Saale  
 E-Mail: frank.frohloff@genetik.uni-halle.de

20. Sept. 1963                      geboren in Berlin  
 Eltern: Lothar Frohloff  
 Renate Frohloff, geb. Brünig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung & Berufsbildung:

1970 - 1974	Grundschule in Berlin & Reutlingen
1974 - 1979	Friedrich Schiller Schule in Reutlingen
1983 – 1984	Schulzentrum in Nürtingen
1984 - 1987	Gymnasium in Nürtingen
Juni 1987	allgemeines Abitur
1987 - 1989	Grundwehrdienst mit Ausbildung als Rettungssanitäter und im Sanitätsdienst der Bundeswehr tätig
1989 – 1997	Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen. Diplomarbeit in der Abteilung Zellbiologie der Eberhard Karls Universität Tübingen mit dem Thema: <u>„Isolierung und Charakterisierung von homologen Cyclingen Fragmenten aus den hypotrichen Ciliaten <i>Stylonychia lemnae</i>, <i>Stylonychia mytilus</i> und <i>Oxytricha granulifera</i>“.</u>
25. Juli 1997	Zuerkennung des akademischen Grad Diplom-Biologe
Nov. 1998-	Promotion in der Arbeitsgruppe Molekulargenetik im Institut für Genetik an der Martin Luther Universität Halle- Wittenberg mit dem Thema: <u>„Zur Rolle des RNA- Polymerase-II Elongators aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für die Wirkung des <i>Kluyveromyces lactis</i> Toxins“.</u>
15. April 2005	Zuerkennung des akademischen Grad Dr. rer. nat.

Halle/Saale, den 15. 04. 2005

### **8.3 Erklärung**

Hiermit Erkläre ich, daß ich diese Studie selbständig und ohne Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, den 15.04.2005

Frank Frohloff