



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7304

**Protein-Protein-Interaktionen
der U1snRNP-Komponente
Prp40 und deren FF-Domänen
in *Saccharomyces cerevisiae***

C. Ester

Institut für Toxikologie und Genetik

März 2007

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7304

**Protein-Protein-Interaktionen der U1snRNP-
Komponente Prp40 und deren FF-Domänen
in *Saccharomyces cerevisiae***

Claudia Ester

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität

Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-073040

Protein-Protein-Interaktionen der U1snRNP-Komponente Prp40
und deren FF-Domänen in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Claudia Ester

aus Neustadt a. d. Weinstrasse

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: PD Dr. Jonathan Sleeman
Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2006

ZUSAMMENFASSUNG

Die FF-Domäne ist in allen eukaryotischen Organismen konserviert. Dies deutet darauf hin, dass die Funktion der FF-Domäne von Bedeutung ist. Die meisten FF-Domänen Proteine spielen eine Rolle im RNA-Metabolismus und ihre FF-Domänen erscheinen typischerweise in Serie. Der Hefe-Spleißfaktor Prp40, eine essentielle Komponente des U1snRNP, besitzt vier FF-Domänen und scheint eine wichtige Rolle in der Stabilisation des Hefe Commitment-Komplexes im Spleißosom zu spielen. Die Funktion der FF-Domänen in diesem Prozess ist dabei unklar. FF-Domänen von Prp40 und den menschlichen Proteinen CA150 und HYPA/FBP11 binden bekannter Weise an die phosphorylierte C-terminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II.

Durch genomweite Yeast-2-Hybrid (Y2H)- Screens wurden für die FF-Domänenregion von Prp40 zwei Interaktionspartner Snu71 und Luc7 identifiziert, bekannte Komponenten des U1snRNP. Kartierungsversuche zeigten, dass die FF1-Domäne von Prp40 mit einer C-terminalen Region in Luc7 interagiert, was auch durch *in vitro* Bindeversuche bestätigt wurde, während die FF2-3 Region mit einer C-terminalen Region in Snu71 interagiert.

Peptidarray-Ergebnisse zeigten eine Interaktionsregion in Snu71 (NDVHY), die keine Ähnlichkeit zu einem für Luc7 durch Substitutionsanalysen identifizierten Motiv (Φ [FHL]x[KR]x[GHL]) aufweist.

Mutationen der involvierten Aminosäuren in der Luc7-Sequenz zeigten nicht den erwarteten Effekt in Y2H-Versuchen. Nur eine Mutation von Lysin resultierte in einem Verlust der Bindung mit Prp40, aber nur in einem verlangsamten Wachstum der Hefezellen mit FF1. Auch ein Peptid mit der identifizierten Interaktionsregion von Luc7 blockierte nicht die Bindung der FF1-Domäne mit Luc7 in einem Wettbewerbs-Versuch. Vergleiche des für Luc7 identifizierten Motivs mit zuvor charakterisierten Konsensussequenzen für FF-Domänen, ergab keine Ähnlichkeit, was die Identifikation einer neuen Bindestelle für FF-Domänen bedeuten könnte.

Um einen besseren Einblick in die Wechselwirkungen des Hefe-U1snRNP zu bekommen, wurden alle U1snRNP-assoziierten Proteine in Y2H-Versuchen auf Interaktion getestet. Aber nur die Bindung von Prp40 mit Snu71 und Luc7 wurde erneut detektiert. Wahrscheinlich wird dieser Komplex über RNA-Protein-Interaktionen zusammengehalten.

In vivo FF-Domänen-Deletionen in Prp40 ergaben eine Mutante mit Wachstumsdefekt, der wahrscheinlich auf einem Defekt im Spleißmechanismus beruht. Dies wurde durch einen funktionellen Spleißtest mit zwei repräsentativen Intron-Genen überprüft, zeigte aber keinen Einfluss auf den Spleißvorgang. Um alle Intron-Gene in Hefe zu detektieren, wurde eine Microarray-Spleißtest initiiert, um genomweite Ergebnisse zu bekommen.

Basierend auf allen Interaktionsstudien, wird von uns angenommen, dass die drei U1snRNP-Proteine Prp40, Snu71 und Luc7 einen Subkomplex innerhalb des U1snRNP, vermittelt durch die FF-Domänen von Prp40, bilden, wie die menschlichen U1snRNP-Proteine U1-A, U1-70K und U1-C.

SUMMARY

Protein-protein-interactions of the U1snRNP-component Prp40 and its FF-domains in *Saccharomyces cerevisiae*

The FF domain is conserved in all eukaryotes indicating an important biological role. Many FF domain proteins play a role in RNA metabolism and their FF domains typically occur in tandem arrays. The yeast splicing factor Prp40 an essential component of the U1snRNP contains four FF domains and appears to play a role in stabilization of the yeast commitment complex during spliceosome assembly. The function of the FF domains in this process is unclear. FF domains of Prp40 and the human proteins CA150 and HYPB/FBP11 are known to interact with the phosphorylated C-terminal domain (CTD) of the RNA polymerase II.

By yeast genome-wide two-hybrid screens I found that FF domains of Prp40 specifically interact with Snu71 and Luc7, known components of the U1snRNP. Mapping experiments showed that the FF1 domain of Prp40 interacts with a C-terminal region within Luc7, also confirmed by *in vitro* binding assays, whereas FF2-3 domains interact with a C-terminal region within Snu71.

Peptide array results showed an interaction region within Snu71 (NDVHY) with no similarity to the consensus motif for Luc7 (Φ [FHL] x [KR] x [GHL]) identified via substitution analysis.

Mutations of involved amino acids within the Luc7 sequence showed not the expected effect in Y2H experiments with FF domains. Only a mutation of the lysine resulted in the loss of binding with Prp40, but only in slow growth of yeast cells with FF1. Also a peptide containing the identified interacting region from Luc7 did not block the binding of FF1 and Luc7 in competition assay. Comparison of the identified motif for Luc7 with previous characterised consensus sequences from FF domains revealed no similarity, indicating the identification of a novel binding site for FF-domains.

To get more insight into the yeast U1snRNP interactions also all associated proteins were tested in Y2H experiments. But only the interaction from Prp40 with Snu71 and Luc7 was detected again, concluding that this complex is hold together also through protein-RNA interaction.

In vivo FF-domain deletions in Prp40 produced a mutant with growth defect lacking FF domains four and three, probably due to a defect in splicing. This was tested by a functional splice test with two representative intron containing genes, with no influence on splicing. To achieve all intron containing genes in yeast also microarray-splice experiments were initiated to obtain genome wide results.

Based on all interaction studies, we conclude, that these three U1snRNP proteins Prp40, Snu71 and Luc7 build a sub complex within the U1snRNP via FF-domain interactions, like U1-A, U1-70K and U1-C in the human U1snRNP.

EINLEITUNG	1
<i>Protein-Protein-Interaktionen</i>	1
<i>Proteindomänen in Hefe</i>	1
<i>Prä-mRNA-Spleißen in Saccharomyces cerevisiae</i>	2
<i>Der Spleißosom-Komplex</i>	4
Das U1snRNP	4
<i>Der Spleißfaktor Prp40</i>	7
Bekannte Interaktionspartner von Prp40	8
<i>Die FF-Domäne</i>	9
Kategorien der FF-Domänen-Proteine	11
Struktur der FF-Domäne	13
Bekannte Interaktionen der FF-Domäne	14
<i>Zielsetzung</i>	16
MATERIAL & METHODEN	17
<i>Verwendete Sequenzen</i>	17
Prp40	17
Luc7	18
Snu71	19
<i>Yeast-2-hybrid (Y2H)-System</i>	20
Vektoren	21
Bait und Prey Konstruktion	22
Verwendete Oligonukleotide	23
Verwendete Y2H-Konstrukte	24
Verwendete Hefestämme	25
Verwendete Hefemedien	25
Durchführung der Y2H-Screens	27

<i>Expression von GST-Fusionsproteinen</i>	29
<i>In Vitro-Bindeassay (GST-PULLDOWN)</i>	31
<i>Peptidarrays</i>	34
Verwendete Chemikalien	35
Verwendete Aminosäure-Derivate	35
Herstellung von AS-Aliquots	36
Verwendete Membranen	36
Durchführung der Peptidsynthese	37
Abspaltung der Seitenschutzgruppen	38
GST-Fusionsprotein-Inkubation	39
<i>Luc7-Mutation</i>	40
<i>In vivo FF-Domänen-Deletionen</i>	42
<i>In vivo FF-Domänen-Doppelkonstrukte</i>	43
Wachstumskurve	44
<i>Funktioneller Spleisstest</i>	45
<i>Allgemeine Methoden</i>	47
Anzucht von Bakterien	47
Lagerung von Bakterien	47
Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	47
Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA	48
Aufbewahrung von DNA	48
Restriktionsspaltung	48
Auffüllen überhängender 5'-Enden	48
Agarose-Gelelektrophorese	49
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
Ligation von DNA-Fragmenten	50

Herstellen elektrokompetenter Bakterien	50
Transformation elektrokompetenter Bakterien	51
RNA-Isolation	51
1% MOPS-RNA-Gel	52
Anzucht von Hefen	53
Lagerung von Hefen	53
Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe	53
Transformation bzw. Rekombination	53
Homologe Rekombination in genomische DNA	54
Isolation von genomischer DNA aus Hefe	55
Hefe-Proteinextrakte	55
SDS-PAGE	56
Coomassie-Färbung	57
Bestimmung der Proteinkonzentration	57
Western-Blot	57
Ponceau-S-Färbung	58
ERGEBNISSE	59
<i>Yeast-2-Hybrid (Y2H)- Experimente</i>	59
Interaktionspartner der Prp40 FF-Region	59
U1snRNP-Protein-Interaktionen	63
<i>In vitro Bindungsassay (GST-Pulldown)</i>	64
GST- Pulldown Snu71	64
GST- Pulldown Luc7	65
Kompetitions-Versuch	66
<i>Peptidarrays</i>	68
Snu71- und Luc7- Interaktionsregion	68

Luc7-Peptidarray-Mutationsanalysen	78
Bioinformatische Auswertung der Peptidarrayergebnisse	84
<i>Luc7-Mutation</i>	87
<i>In vivo Prp40FF-Deletionen</i>	88
<i>Funktioneller Speißtest (RT-PCR)</i>	91
DISKUSSION	93
<i>Interaktionspartner der FF-Domänenregion von Prp40</i>	93
Qualität der Interaktionen	94
Bisherige Interaktionspartner von Prp40	95
Proteinkomplex-Daten von Prp40, Snu71 und Luc7	96
<i>U1snRNP-assoziierte Proteine</i>	98
<i>Kartierung der Protein-Protein-Interaktionen von Prp40 mit Snu71 u. Luc7</i>	99
Y2H-Kartierung	99
Peptidarray-Kartierung	100
Gründe für widersprüchliche Peptidarray-Ergebnisse	101
Motiv-Diskussion mit Luc7-Mutationen	102
Mutationsanalyse	103
<i>Funktion der FF-Domäne in anderen Spezies</i>	104
Interaktion mit der C-terminalen Domäne der RNA PII	104
HYP A/FBP11	105
CA150	107
p190-Rho GTPase	108
<i>Bekannte Interaktionen der Prp40 FF1-Domäne mit crn-TPR von Clf1</i>	108
Zusammenfassung der bekannten FF-Interaktionen	112
Bioinformatische Auswertung der Interaktionsregion	113
<i>Funktion der FF-Domänen</i>	115

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Die Rolle von Prp40 als coupling Protein</i>	116
<i>Offene Fragen, Strategien und Ausblick</i>	117
LITERATUR	119
ABKÜRZUNGEN	133

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Protein-Protein-Interaktionen

Für die funktionelle Charakterisierung des Proteoms sind insbesondere die Interaktionen der Proteine untereinander von Interesse. Viele erfüllen ihre Funktion erst im Verbund mit anderen. Die meisten gehören zu großen Proteinnetzwerken, welche die einzelnen Bestandteile und Prozesse einer Zelle strukturell und dynamisch miteinander verbinden (Schwikowski *et al.* 2000; Tucker *et al.* 2001). Zwischen den 6000 Proteinen von *Saccharomyces cerevisiae* sind mehr als 7000 Interaktionen bekannt. Davon wurden rund tausend von Uetz *et al.* 2000 und mehr als 4000 der anderen Interaktionen von Ito *et al.* 2000, 2001 mit Hilfe des Yeast-2-Hybrid (Y2H)-Systems (Fields & Song 1989) identifiziert. Ito *et al.* betrachten jedoch nur 841 der Interaktionen als wirklich zuverlässig (Kerndaten). Der Rest der 7000 Interaktionen wurde zum allergrößten Teil bei Untersuchungen von einzelnen Proteinen entdeckt und charakterisiert. Diese komplexen Proteinnetzwerke verdeutlichen, dass bis jetzt nur ein Bruchteil aller Proteininteraktionen bekannt ist. Schätzungen zufolge wurden bislang nur 50% aller Proteininteraktionen bei der Hefe identifiziert (Uetz & Grigoriev 2005).

Proteindomänen in Hefe

Eine Proteindomäne ist definiert als kleinste Einheit eines Proteins mit definierter und unabhängig gefalteter Struktur. Da an den Interaktionen zwischen den Proteinen nicht das ganze Protein, sondern meist die einzelnen Domänen oder kurze Sequenzmotive beteiligt sind, ist es wichtig auch die isolierten Domänen auf Interaktion zu testen. Am Beispiel verschiedener Domänen (z. B. SH2, DEP und PX) konnte gezeigt werden, dass mit diesen Interaktionspartner gefunden werden konnten, die mit dem ganzen Protein verborgen blieben (Burchett *et al.* 2002; Vollert & Uetz 2004). Bei Hefe sind ca. 300 Proteindomänen bekannt, wozu ungefähr 20 mit unbekannter oder wenig bekannter Funktion zählen (SMART Datenbank: <http://smart.embl-heidelberg.de>) und bei denen viele vermutlich bei Protein-Protein-

Interaktionen eine Rolle spielen. Protein-Protein-Interaktionsdomänen sind unabhängige Module von 35-150 Aminosäuren, die auch unabhängig von ihrem Protein exprimiert werden können, wobei sie die Fähigkeit ihren physiologischen Partner zu binden, behalten. Die Zelle gebraucht ein limitiertes Sortiment an Interaktionsdomänen mit spezifischen Bindevorlieben (siehe Abb. 1-1).

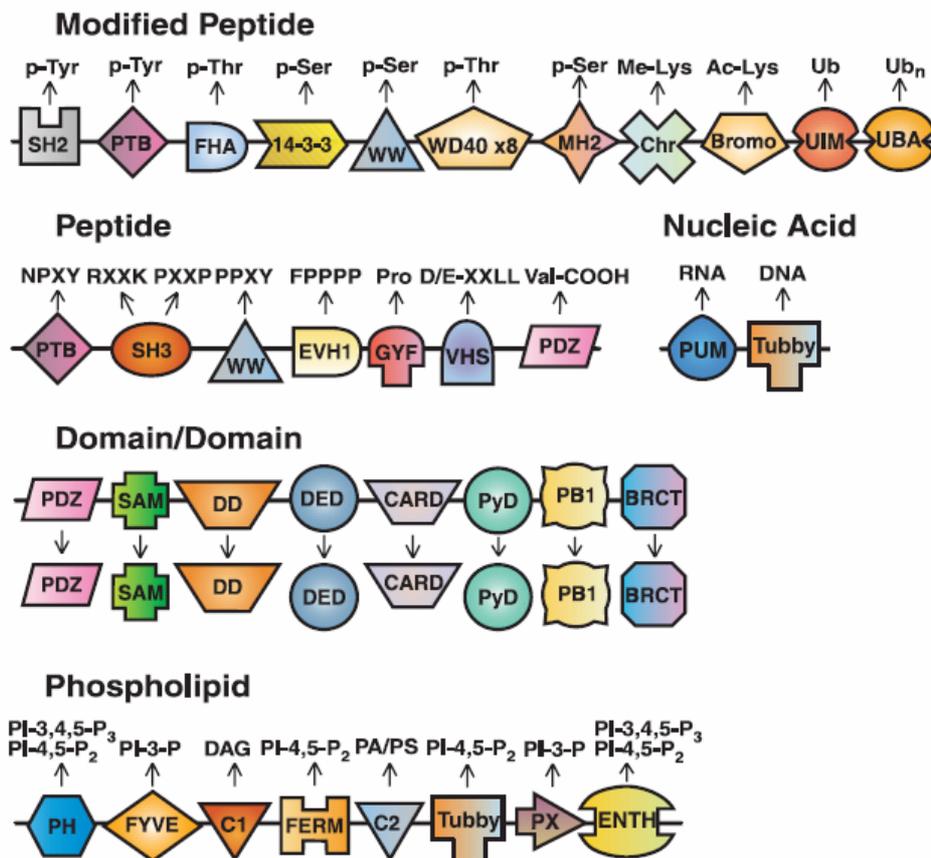


Abb. 1-1: Ausgewählte Interaktionsdomänen mit ihren Bindeeigenschaften (aus Pawson & Nash 2003)

prä-mRNA- Spleißen in *Saccharomyces cerevisiae*

In eukaryotischen Zellen enthält die frisch synthetisierte mRNA (prä-mRNA) Abschnitte nicht-codierender RNA (Introns), welche aus der mRNA heraus getrennt werden muss, bevor sie in ein Protein translatiert wird. Diesen Vorgang nennt man Spleißen. Bald nach der Entdeckung des Spleißens wurde die schon gut charakterisierte Bäckerhefe *S. cerevisiae* zum Wahlorganismus für genetische Studien am Spleißmechanismus. Viele Mutanten, die vorher in Screens für RNA-

Synthese charakterisiert wurden (deshalb *rna*; Hartwell *et al.* 1967; Hutchison *et al.* 1969), zeigten eine Beeinflussung im RNA-Spleißen und wurden daher umbenannt in „precursor of RNA processing“ (prp)- Mutanten (Vijayraghavan *et al.* 1989). Schließlich wurde eine enorme Zahl von PRP-Genen und anderer Spleißfaktoren in Hefe charakterisiert (Burge *et al.* 1998). Die Analyse des Spleißmechanismus blieb nicht beschränkt auf genetische Methoden. Es wurden auch *in vitro* Spleißtests etabliert (Newman *et al.* 1985) und ein neues Gel-System erlaubte die Detektion von verschiedenen Spleißkomplexen (Pikielny *et al.* 1986; Cheng und Abelson 1987; Seraphin und Rosbash 1989). Diese Studien zeigten, dass der generelle Mechanismus des Spleißens von Hefe zum Mensch konserviert ist.

Mit der Entschlüsselung des Genoms von *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.* 1996), als ersten eukaryotischen Organismus, wurde die Suche nach mutmaßlichen Homologen von bekannten Spleißfaktoren anderer Organismen ermöglicht. Ebenso konnten unter der Verwendung von bioinformatischen Methoden alle Introns in Hefegenen detektiert werden, wobei klar ist, dass die Hefe nur eine limitierte Anzahl von Genen mit Introns besitzt. Zurzeit sind unter den 6000 identifizierten Hefegenen 275 bekannte Intron-Gene identifiziert (Davis *et al.* 2000; Spingola *et al.* 1999). Viele prä-mRNA Introns befinden sich in hoch exprimierten Genen, so dass im Durchschnitt jede dritte prä-mRNA zu einer bestimmten Zeit in der Hefezelle ein Intron enthält und gespleißt werden muss (Lopez und Seraphin 1999; Ares *et al.* 1999). Zusätzlich gibt es noch tRNA-Introns und das HAC1-Intron, die durch Protein-Enzyme gespleißt werden. Es existiert ein hohes Maß an Konversation, nicht nur in generellen Signalwegen des prä-mRNA Spleißens, sondern auch zwischen der RNA und Proteinfaktoren, die in diesem Prozess involviert sind (Burge *et al.* 1998).

Außerdem machen einige praktische Aspekte die Hefe, wie die leichte Kultivierung, die Auswahl an selektiven Markern und die Existenz von haploiden und diploiden Zellstadien, zu einem Modellorganismus. Die Benutzung von homologer Rekombination erlaubt es leicht gezielte Mutationen und Modifizierungen vorzunehmen, was auch groß angelegte Genom- und Proteom- Studien erlaubt, aber auch detaillierte funktionale Analysen von individuellen Genen.

Der Spleißosom-Komplex

Der Vorgang des prä-mRNA-Spleißens wird katalysiert durch das Spleißosom, einem großen dynamischen Ribonukleoprotein-Komplex (~4,8 MDa), welcher durch die Bindung von fünf U snRNPs (uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles): U1, U2, U4, U5 und U6, und um die hundert zusätzliche nicht-snRNP Spleißfaktoren, an der prä-mRNA gebildet wird (Burge *et al.* 1999; Will & Lührmann 2001). Der erste definierte Schritt besteht aus der Bildung des Commitment Komplexes bei der Hefe (Seraphin & Rosbash 1989) bzw. des E Komplexes bei Säugetieren (Michaud & Reed 1991, 1993). Dabei bindet als erstes snRNP das U1 an die prä-mRNA (Zhuang & Weiner 1986; Seraphin *et al.* 1988; Siliciano & Guthrie 1988; Ruby & Abelson 1988; Du & Rosbash 2001). In Hefe sind zwei Formen des Commitment Komplexes bekannt, CC1 und CC2 (Seraphin & Rosbash 1989). Beide enthalten U1snRNP, welches mit der 5' Spleißstelle interagiert. CC2 enthält mindestens zwei Proteine, Msl5/BBP (Branchpointprotein) und Mud2, die an die Branchpoint (BP) -Sequenz bzw. an eine Pyrimidin-reiche Stelle (AG) des Introns binden (Seraphin & Rosbash 1991; Abovich *et al.* 1994; Abovich & Rosbash 1997; Berglund *et al.* 1998). mBBP/SF1 und U2AF65 sind Homologe dieser Proteine in Säugetieren und präsent im E Komplex (Ruskin *et al.* 1988; Michaud & Reed 1991, 1993; Krämer 1992; Rain *et al.* 1998). (siehe Abb. 1-3).

Das U1snRNP

Die snRNPs sind die Hauptkomponenten des Spleißosoms, welche einen komplexen Prozess in Aufbau und Reifung durchlaufen, bevor sie ihre Funktion im Spleißmechanismus aufnehmen können. Sie sind verantwortlich für die Erkennung von Spleißstellen und die Definition von Exon- und Intron- Abgrenzungen. Außerdem bilden sie durch die Interaktion untereinander und mit der prä-mRNA das Gerüst des Spleißosoms. Diese Interaktionen sind dynamisch, so dass der Spleißosom-Komplex sich während des Spleißvorgangs verändert.

Der Kern von U snRNPs wird definiert durch eine U snRNA und ein Set von sieben Sm Proteinen (B, D1, D2, D3, E, F und G), die in allen snRNPs gleich sind, mit der Ausnahme des U6 snRNP, das Lsm (like sm)- Proteine enthält. Hefe U1 snRNA ist

mit 569 Nukleotiden (Kretzner *et al.* 1987; Siliciano *et al.* 1987) signifikant größer als Wirbeltier U1 snRNA mit 164 Nukleotiden (Roiha *et al.* 1989) und auch das Hefe U1 snRNP ist komplexer als bei Wirbeltieren. Beide U1 snRNPs enthalten jedoch drei spezifische U1 Proteine, Snp1/ U1-70K, Mud1/ U1-A und Yhc1/ U1-C (siehe Tab. 1-1). Das U1 snRNP der Hefe enthält zusätzlich mehrere spezifische Proteine. Zu manchen wurden Wirbeltier-Homologe gefunden (Neubauer *et al.* 1997; Gottschalk *et al.* 1998; Käufer *et al.* 2000; Stevens *et al.* 2002).

U1snRNP-Proteine	
Hefeproteine	Mensch-Homolog
Mud 1/Luc1	U1-A
Nam8/Luc3	
Snp1	U1-70K
Snu71/Luc5	
Prp39	
Prp40	FBP11
Prp42	
Snu56/Luc4	
Luc7	LUC7
Yhc1	U1-C

Tab. 1-1: Vergleich der U1snRNP-Proteine zwischen Hefe und Mensch (Stevens *et al.* 2000; Käufer *et al.* 2000)

Die U1 RNA besitzt charakteristische Sm-Stellen (Einzelstrangsequenz AAUUUGUGG), an die die Sm Proteine binden um das Sm-Kern-RNP zu formen (Raker *et al.* 1999). Die größeren, Partikel-spezifischen Proteine machen dagegen die spezifische Struktur des snRNP-Partikels aus (Kastner *et al.* 1990; Will & Lührmann 1997). Die zwei größten U1 spezifischen Proteine (U1-70K und U1-A) binden direkt an den U1 RNA stem/ Loop I und II (Nagai & Mattaj 1994). Das kleinere U1-C ist möglicherweise über Protein-Protein-Interaktionen mit dem Kern verbunden (Nelissen *et al.* 1994).

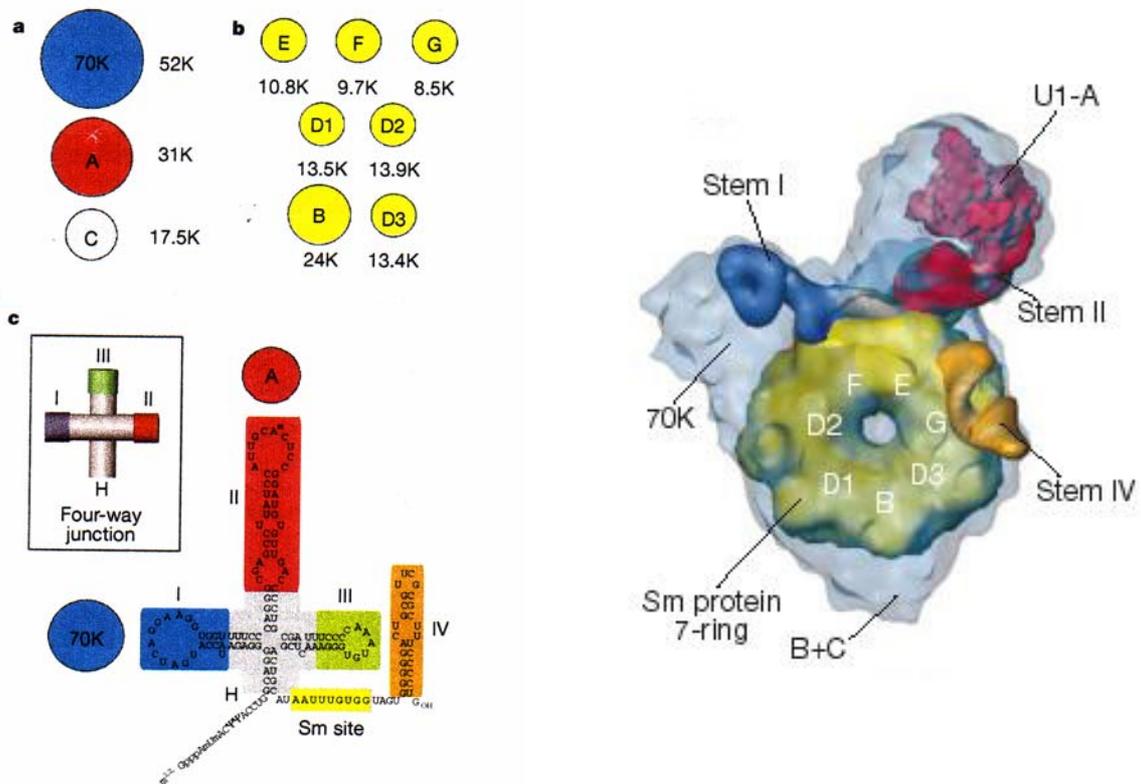


Abb. 1-2: Dreidimensionale Struktur des Mensch U1snRNP (aus Stark *et al.* 2001)

Linke Abbildung: Schematische Darstellung der RNA und Protein-Komponenten des U1snRNP. a, zeigt die drei U1snRNP-spezifischen Proteine. b, zeigt die sieben Sm-Proteine, die in allen snRNPs gleich sind. Die Sm-Proteine binden an die Sm-Stelle (siehe c, gelb) um das Sm-Kern- RNP zu bilden. Zahlen zeigen das relative Molekulargewicht. c, zeigt die Sekundärstruktur der RNA und die Stellen an denen die Proteine U1-70K und U1-A binden. Die Sm-Stelle ist gelb und die Kreuzungsstelle der vier Doppelhelixstränge ist grau dargestellt. Der Kasten zeigt das Schema von RNA-Doppelhelices in der Kreuzungsstelle mit stem I (blau), II (rot), III (grün), IV (orange) und die 5'-3' verbindende Helix H. **Rechte Abbildung:** Gezeigt ist die Integration von biochemischen und strukturellen Informationen in ein drei-dimensionales Modell des U1snRNP durch Cryo-Elektronenmikroskopie bestehend aus Proteinkomponenten U1-70K, U1-A und U1 B+C (Grau). In diese Struktur wurden die 7 SmProteine (B, D1, D2, D3, E, F u. G) als Ring modelliert (Kambach *et al.* 1999; Camasses *et al.* 1998). Integriert ist die modellierte U1snRNA. Die Sm Proteine binden an die Sm-Stelle an die RNA (gelb). Über eine Kreuzungsstelle (Doppelstrang-RNA-Bereich) sind die RNA-Stiele gezeigt: Blau: stem I; Rot: stem II; stem III (nicht zu sehen) und Orange: stem IV U1-70K ist assoziiert mit stem I, U1-A mit stem II.

Der Spleißfaktor Prp40

Prp40 (pre-mRNA processing) ist im Commitment-Komplex als Stabilisierungs- bzw. Brückenprotein beteiligt (siehe Abb.1-3). Es wird angenommen, dass durch die Interaktion von BBP/Msl5 und Prp40 das 5'-Ende (5'ss) und der Branchpoint (BP) in räumliche Nähe gebracht werden, so dass letztendlich das Intron heraus getrennt werden kann (Abovich & Rosbash 1997). Ein weiterer Interaktionspartner von Prp40 im Spleißosom ist der Spleißfaktor Prp8. Prp8 ist die größte Komponente des U5 snRNP und besitzt eine N-terminale Prolin-reiche Region, die an die WW-Domänen von Prp40 bindet (Abovich & Rosbash 1997).

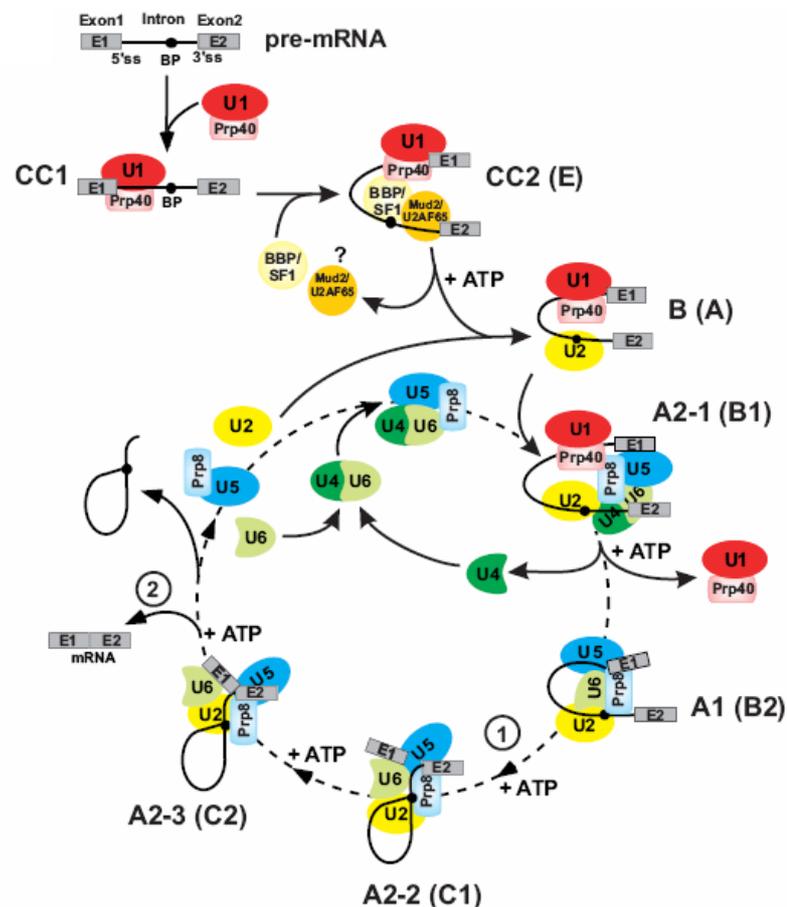


Abb. 1-3: Schematische Darstellung des Spleißosom-Komplexes in Hefe (aus Dissertation Silke Wiesner, FU Berlin). Gezeigt ist die Funktion des Spleißfaktors Prp40 (hellrot) assoziiert mit dem U1snRNP (rot) innerhalb des Spleißosoms. Mindestens sieben Spleißosom-Komplexe sind in Hefe bekannt: Die Commitment-Komplexe CC1 und CC2, der prä-Spleißosom-Komplex B und die Haupt-Spleißosom-Komplexe A2-1, A1, A2-2 und A2-3. Säuger-Komplexe sind in Klammern angegeben. Ellipsen zeigen snRNPs, abgerundete Rechtecke die snRNP assoziierten Spleißfaktoren Prp40 (hellrot) und Prp8 (hellblau), während Kreise die Spleißfaktoren BBP (gelb) und Mud2 (orange) in räumlicher Nähe zu Prp40 markieren. Es ist unklar, wann Mud2 das Spleißosom verlässt (?).

Prp40 wurde erstmals als essentieller Hefe-Spleißfaktor, assoziiert mit dem U1 snRNP, identifiziert (Kao *et al.* 1996). Auffallend war, dass das Protein kein bekanntes RNA-Bindemotiv besitzt. Prp40 ist ein so genanntes Mosaikprotein, das aus zwei N-terminalen WW-Domänen und vier in Serie auftretenden FF-Domänen besteht (Bedford & Leder, 1999). Außer Prp40 ist nur noch ein weiteres Hefe-Protein mit FF-Domäne bekannt, nämlich Ypr152c mit einer N-terminalen WW-Domäne und einer FF-Domäne. Dieses Protein besitzt keine bekannte Funktion (siehe Tab. 1-5).

Bekannte Interaktionspartner von Prp40

Von Prp40 sind einige Interaktionspartner bekannt. Bei den meisten Interaktionen ist jedoch die WW-Domäne beteiligt oder die Binderegion wurde noch nicht definiert.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht:

Interaktionspartner	Interaktionsregion	Interaktionsregion Prp40	Methode	Autor
ADA2	-	-	Y2H(high-throughput)	Ito 2001
CLF1	TPR	FF Region FF1	Y2H NMR	Chung 1999 Gasch 2006
MSL5	Prolin-reiche Region	WW1+2	Y2H Affinitätssäule	Abovich 1997 Abovich 1997
MUD2	-	-	Affinitätssäule	Abovich 1997
PRP8	Prolin-reiche Region	WW1+2	Y2H	Abovich 1997
RPO21	pCTD pCTD	2WW (schwach) 2WWFF1FF2 (stark)	Far Western Far Western	Morris 2000 Morris 2000
SIN4	-	-	Y2H (high-throughput)	Uetz 2000
SNU71	-	-	Y2H (high-throughput)	Ito 2001

Tab. 1-2: Bekannte Interaktionspartner von Prp40 (Daten entnommen aus SGD Datenbank)

Proteine	Funktionsbeschreibung
ADA2	Komponente von zwei nukleosomalen Histon-Acetyltransferase-Komplexen
CLF1	prä-mRNA Spleißfaktor mit Ähnlichkeit zu Drosophila Crn Protein; besitzt Tetratricopeptide (TPR) Wiederholungssequenzen
MLS5	Komponente des Spleiß-Commitment-Komplexes; involviert in Erkennung der Branchpoint- Sequenz und in Brückenbildung der beiden Enden des Introns
MUD2	involviert in frühes Stadium des prä-mRNA Spleißens, besitzt degenerierte RNA-Erkennungsdomäne
PRP8	U5snRNA assoziierter Spleißfaktor; involviert in Assoziation von U5snRNP mi U4/U6snRNP; fördert beide katalytischen Schritte des Spleißprozesses
RPO21	größte Untereinheit der RNA Polymerase II
SIN4	Komponente des RNA Polymerase II Holoenzym und des Kornberg Subkomplexes; hat positive und negative Effekte auf Transkription für individuelle Gene
SNU71	U1snRNP assoziiertes Protein

Tab. 1-3: **Beschreibung der bekannten Interaktionspartner von Prp40** (Daten entnommen aus SGD Datenbank)

Die FF-Domäne

Die FF-Domäne wurde erstmals 1999 von Bedford & Leder beschrieben. Sie entdeckten die Domäne durch Sequenzvergleich mehrerer Proteine in dem Mensch/Maus Protein FBP11 (Formin binding protein). Bei der Suche nach weiteren Proteinen mit dieser neuen Domäne, wurden weitere Proteine mit einzelnen oder mehreren Kopien der FF-Domäne identifiziert, konserviert in allen eukaryotischen Organismen bis zum Menschen. Die Namensgebung der Domäne erfolgte aufgrund der zwei hochkonservierten Phenylalaninreste in der Aminosäure-Sequenz (siehe Abb. 1-4). Die Länge einer FF-Domäne ist durchschnittlich 50-60 Aminosäuren.

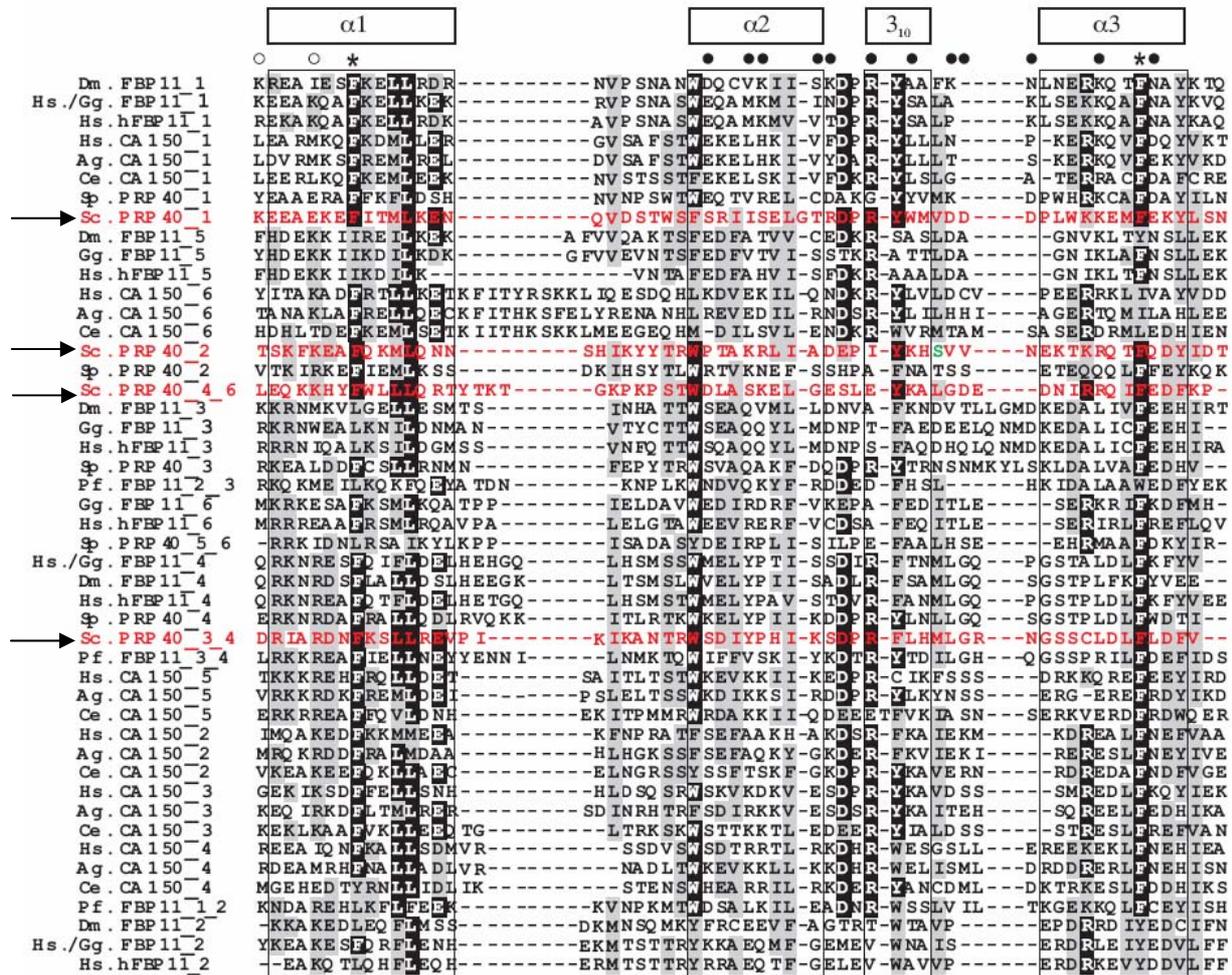


Abb. 1-4: Multiples Sequenz-Alignment von FF-Domänen der drei verwandten Proteinfamilien Prp40, FBP11 und CA150 (Gasch *et al.* 2006). Boxen in und oberhalb der Sequenzen markieren Sekundärstruktur-Elemente. Die vier FF-Domänen von Prp40 sind in rot gezeigt. Hochkonservierte Aminosäuren sind schwarz dargestellt, während semikonservierte Aminosäuren grau gezeigt sind. Zeilen zeigen die Proteinnummern, Domänen-Nummer und Spezies (Ag.: *Anopheles gambiae*, Ce.: *Caenorhabditis elegans*, Dm.: *Drosophila melanogaster*, Gg.: *Gallus gallus*, Hs.: *Homo sapiens*, Pf.: *Plasmodium falciparum*, Sc.: *Saccharomyces cerevisiae* und Sp.: *Schizosaccharomyces pombe*). FF-Domänen von Proteinen mit weniger als sechs FF-Domänen können zwei Nummern haben: Die erste Nummer entspricht der Position der FF-Domäne in der Protein-Sequenz (z.B. Prp40 FF4), während die zweite Nummer die Ähnlichkeit zu anderen FF-Domänen basierend auf deren phylogenetischen Verwandtschaft (z.B. Prp40FF4_6) angibt (siehe Abb. 4-4). Sterne am oberen Ende des Alignments markieren die zwei konservierten Phenylalanine (F), auf der die Namensgebung der Domäne basiert. Verfügbare Aminosäuren auf der Bindeoberfläche von HYP/FA11 FF1 sind durch leere Kreise und verfügbare Aminosäuren auf der Bindeoberfläche von Prp40 FF1 sind durch gefüllte Kreise dargestellt.

Kategorien der FF- Domänen- Proteine

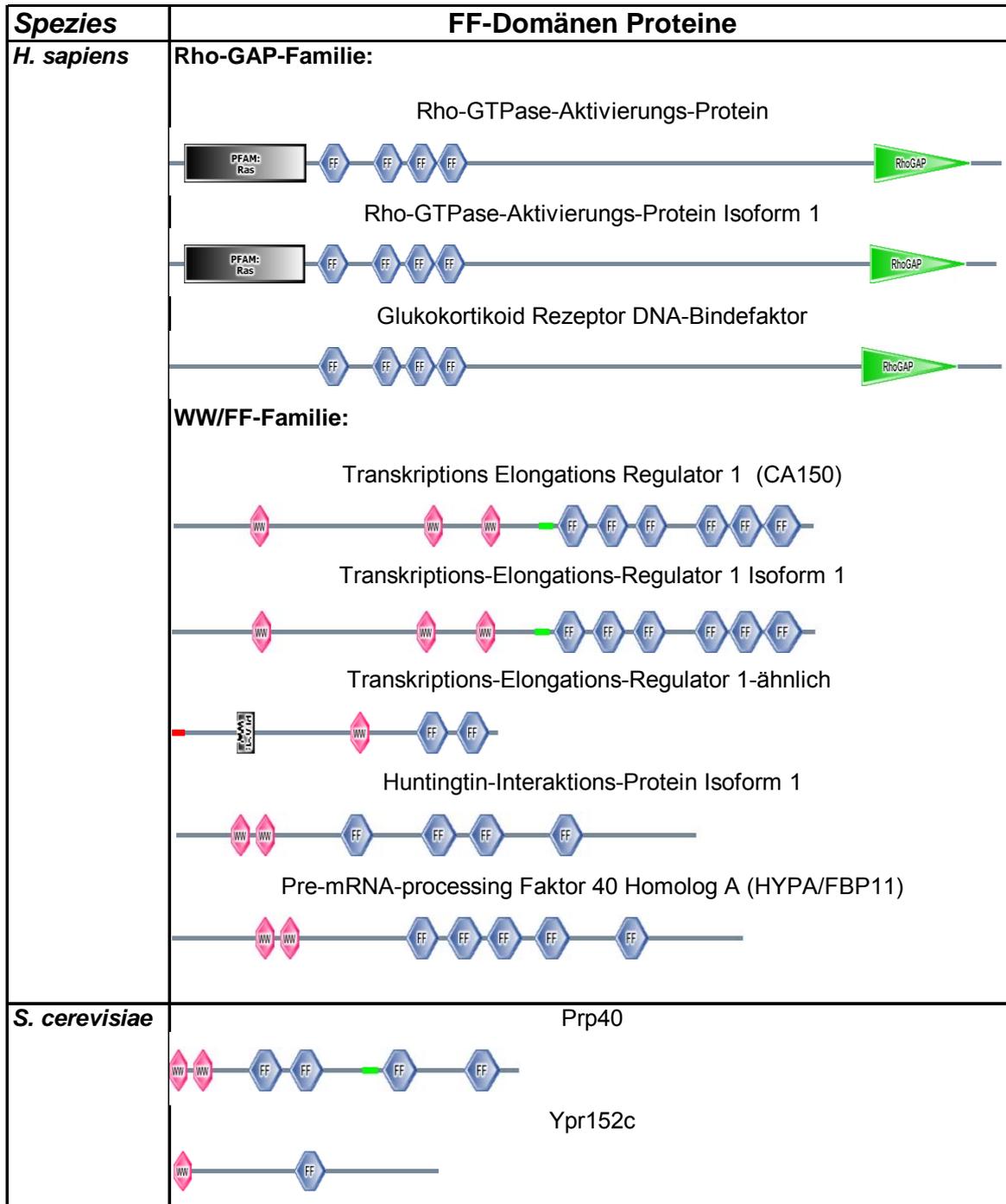
Bis jetzt wurden in allen eukaryotischen Modellorganismen FF-Domänen-Proteine gefunden. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick:

Spezies	Anzahl der FF-Domänen Proteine	Anzahl der FF-Domänen
<i>H. sapiens</i>	8	35
<i>M. musculus</i>	7	31
<i>D. melanogaster</i>	3	9
<i>C. elegans</i>	3	16
<i>A. thaliana</i>	6	26
<i>S. cerevisiae</i>	2	5
<i>S. pombe</i>	2	6

Tab. 1-4: Anzahl der FF-Domänen Proteine in Modellorganismen (aus SMART-Datenbank)

Bisher bekannte FF-Domänen-Proteine können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Erstens, die FF-Domänen der Säugetier p190 Rho GAP- Familie sind unterschiedlich in der Sequenz zu den anderen FF-Domänen und beinhalten unterschiedliche Muster an konservierten Aminosäuren. Die Proteine dieser Familie regulieren die Aktivität der kleinen GTPase Rho und sind beteiligt an der Regulation der Actin-Wiederherstellung als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Signale (Settleman *et al.* 1992; Jiang *et al.* 2005).

Zweitens, Proteine, die nach einer oder mehreren N-terminalen WW-Domänen (Name aufgrund zweier konservierter Tryptophan-Reste) meist eine Serie von FF-Domänen besitzen, wurden in allen eukaryotischen Genomen gefunden, die bis jetzt sequenziert wurden. Die Mitglieder dieser Familie, die bisher charakterisiert wurden, haben eine Rolle im RNA-Metabolismus.



Tab. 1-5: Überblick über die FF-Domänen Proteine in Mensch und Hefe (aus SMART-Datenbank)
 WW-Domänen (rot); FF-Domänen (blau); Rho GAP (grüne Dreiecke); coiled-coil Motive (grüne Rechtecke);
 zusätzliche Domänen aus Pfam Datenbank (schwarze Rechtecke).

Struktur der FF-Domäne

Die Struktur der FF1-Domäne des menschlichen Proteins HYP A/FBP11 (Allen *et al.* 2002) als auch der FF1-Domäne von Prp40 (Gasch *et al.* 2006) wurde kürzlich durch NMR aufgeklärt. Die Struktur besteht übereinstimmend bei beiden Proteinen aus drei α -Helices mit einer 3_{10} Schleife zwischen der zweiten und der dritten Helix. Das N- und das C-terminale Ende der Domäne befinden sich an entgegengesetzten Enden der Struktur, was oft bei in Serie angeordneten Modulen vorkommt. Die zwei konservierten Phenylalaninreste befinden sich in der Mitte der ersten und der dritten Helix und bilden einen Teil des hydrophoben Kernbereichs der Domäne, zusammen mit weiteren Aminosäuren, wie Leucin und Tryptophan. Die Aminosäuren an der Oberfläche der Struktur sind wenig konserviert. Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Domänen liegen in der Orientierung der zweiten Helix ($\alpha 2$). Deren Struktur ist bei HYP A/FBP11 eng an den Kern der Domäne gepackt, während die Struktur bei Prp40 offener ist. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die größere Seitenkette der Aminosäure Tryptophan (W-152) zwischen der ersten und der zweiten Helix, während die korrespondierende Aminosäure in HYP A/FBP11 Alanin (A-409) ist, welche weniger Platz in der Struktur benötigt.

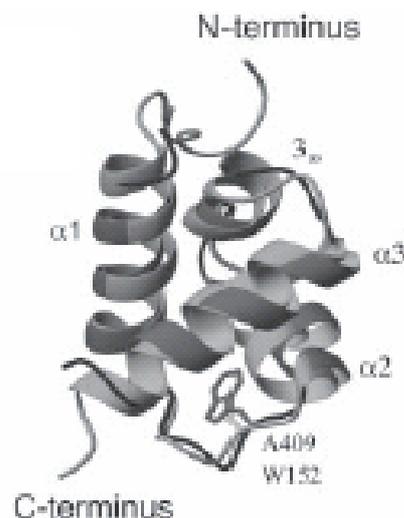


Abb. 1-5: Darstellung Struktur der FF1-Domäne von Prp40 und HYP A/FBP11 (Gasch *et al.* 2006)
Die Prp40FF1-Domäne ist in dunkelgrau und HYP A/FBP11 FF1-Domäne in hellgrau dargestellt.

Bekannte Interaktionen der FF- Domäne

Bei drei FF-Domänen Proteinen, dem Hefeprotein Prp40 und den menschlichen Proteinen CA150 und HYPA/FBP11 konnte eine Interaktion mit der phosphorylierten C-terminalen Domäne (größte Untereinheit der RNA Polymerasell) der RNA Polymerase II unter Beteiligung der FF-Domänen-Region festgestellt werden. Bei Prp40 konnte zwar eine schwache Interaktion allein mit dem WW-Domänen Bereich gezeigt werden. Unter Beteiligung der ersten beiden FF-Domänen fiel die Interaktion jedoch deutlich stärker aus (Morris & Greenleaf 2000). Bei CA150 konnte die Interaktionsregion in der zweiten und die fünften FF- Domäne kartiert werden (Carty *et al.* 2000; Goldstrohm *et al.* 2001). Die erste FF-Domäne von HYPA/FBP11 (Formin-Binde-Protein 11), auch ein Spleißfaktor mit insgesamt vier FF-Domänen, bindet an ein CTD-Peptid, welches an beiden Serinen phosphoryliert ist (Allen *et al.* 2002).

Außerdem assoziieren die FF-Domänen von CA150 mit multiplen Transkriptions- und Spleiß- bezogenen Proteinen, wie Tat-SF1 (Tat-specific factor 1). Tat-SF1 ist essentiell für die Tat-aktivierte Transkription des HIV-1 LTR-Promotors und rekrutiert snRNPs zu aktiven Stellen der Transkription (Zhou *et al.* 1996; Fong *et al.* 2001). Die FF-Domänen von CA150 erkennen multiple schwache Bindestellen in Tat-SF1 und individuelle Domänen in den FF-Serien zeigen äquivalente und nicht kooperative Bindeeigenschaften, anstatt Bindekooperativität, mit einem identifizierten Konsensus-Bindemotiv für nicht phosphorylierte Liganden (Smith *et al.* 2004).

FF-Domänen sind auch präsent in der p190-Familie der cytoplasmatischen Rho GTPase aktivierenden Proteine (GAPs). Der Serum-gesteuerte Transkriptionsregulator TFII-I ist ein spezifischer Interaktionspartner der p190 RhoGAP FF-Domänen. p190 bindet TFII-I im Cytoplasma über die FF-Domänen, aber auf PDGF-Rezeptor vermittelte Phosphorylierung einer FF-Domäne, wird TFII-I von p190 abgegeben und translokalisiert in den Nukleus, wo es die Transkription von Serum-induzierten Genen, wie c-fos, aktivieren kann. Dies deutet auf eine Rolle der FF-Domänen in der Phosphorylierungs- vermittelten Signaltransduktion hin (Jiang *et al.* 2005).

Strukturell wurde die Bindung zwischen der FF1-Domäne von HYPA/FBP11 und einem CTD-Peptid (Allen *et al.* 2002), sowie der FF1-Domäne von Prp40 und einem crn-TPR-Peptid von Clf1 (Gasch *et al.* 2006), durch NMR-Studien charakterisiert (siehe Abb. 1-6). Diese unterscheiden sich sowohl in der Bindestelle, als auch der Charaktereigenschaften der betroffenen Aminosäuren. Die Bindestelle der phospho-CTD in der FF1-Struktur von HYPA/FBP11 liegt im N-Terminus der Helix 1 ($\alpha 1$) und Helix 3 ($\alpha 3$) und ist vorwiegend positiv geladen. Im Gegensatz dazu liegt die Bindestelle für das crn-TPR-Peptid von Clf1 in der Helix 2 ($\alpha 2$), in der Schleife 2, der 3_{10} Helix in der N-terminalen Hälfte der Helix 3 ($\alpha 3$), wobei hier über 50% hydrophobe und einige negativ geladene Aminosäuren betroffen sind.

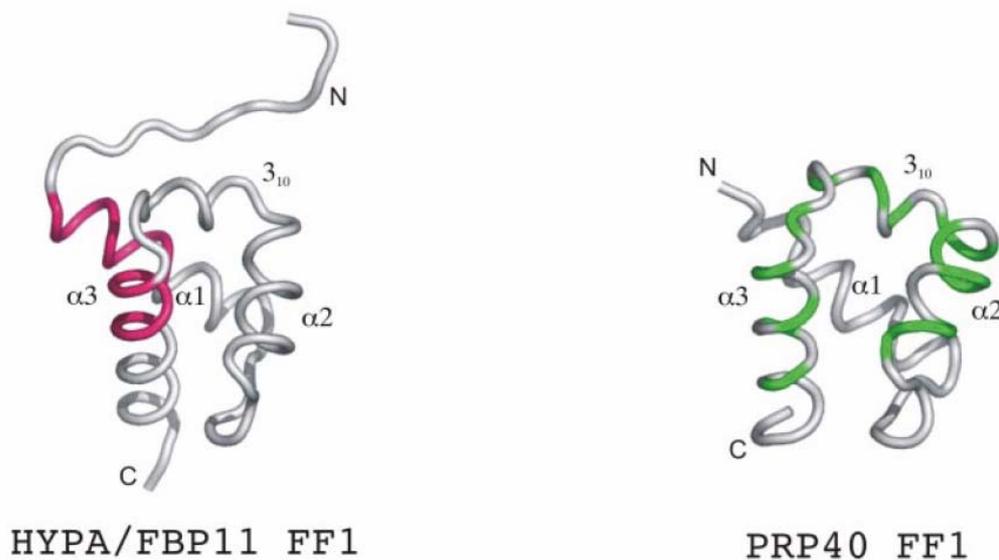


Abb. 1-6: Vergleich der Bindestellen von Prp40FF1-Domäne mit HYPA/FBP11FF1-Domäne (Gasch *et al.* 2006). Rot markiert die Bindestelle für die phospho-CTD der RNAPII in der FF1-Domäne von HYPA/FBP11. Grün markiert die Bindestelle für das crn-TPR-Peptid von Clf1 in der FF1-Domäne von Prp40.

Zielsetzung

Grundlage dieser Arbeit sind die Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit, in der ich die Interaktion des *Saccharomyces cerevisiae* Spleißfaktors Prp40 mit den U1snRNP-Proteinen Snu71 und Luc7, unter Beteiligung der FF-Domänenregion von Prp40, zeigen konnte. Da Prp40 selbst auch U1snRNP-assoziiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese drei Proteine einen Subkomplex innerhalb des U1snRNP-Komplexes bilden, was in dieser Arbeit näher untersucht werden sollte.

Zum einen sollten die Y2H-Ergebnisse durch *in vitro* Bindeversuche bestätigt werden, zum anderen sollte eine genaue Kartierung der Interaktion auf Aminosäure-Ebene durch Peptidarrays erfolgen.

Des Weiteren sollte durch gezielte *in vivo* Deletionen der FF-Domänen in Prp40 die Funktionalität der Domänen analysiert werden.

MATERIAL & METHODEN

VERWENDETE SEQUENZEN:

Prp40:

1/1	31/11	61/21	
ATG TCT ATT TGG AAG GAA GCT AAA GAT GCA AGT GGA AGG ATA TAT TAT TAC AAT ACT TTG ACA AAG AAA TCT ACG TGG GAG AAG CCC AAG	91/31	121/41	WW1
M S I W K E A K D A S G R I Y Y N T L T K K S T W E K P K		151/51	
GAA CTA ATT TCT CAG GAG GAG CTA CTT CTT CGA GAA AAT GGC TGG AAG GCG GCC AAG ACG GCA GAC GGC AAA GTA TAC TAT TAT AAT CCA	181/61	211/71	WW2
E L I S Q E E L L L R E N G W K A A K T A D G K V Y Y Y N P		241/81	
ACA ACA AGA GAA ACC AGC TGG ACT ATT CCG GCC TTC GAG AAG AAA GTA GAA CCC ATC GCA GAA CAA AAA CAT GAT ACA GTA TCC CAT GCA	271/91	301/101	
T T R E T S W T I P A F E K K V E P I A E Q K H D T V S H A		331/111	
CAG GTT AAT GGA AAT AGA ATA GCC CTT ACG GCT GGA GAA AAA CAA GAG CCG GGA CGA ACT ATA AAC GAG GAG GAA AGC CAA TAT GCT AAT	361/121	391/131	
Q V N G N R I A L T A G E K Q E P G R T I N E E E S Q Y A N		421/141	
AAC TCT AAA CTG CTT AAT GTC AGG AGA AGG ACT AAA GAA GAA GCA GAG AAG GAA TTT ATT ACC ATG CTG AAG GAA AAT CAA GTA GAC TCT	451/151	481/161	
N S K L L N V R R R T K E E A E K E F I T M L K E N Q V D S		511/171	
ACT TGG TCA TTC AGT AGA ATT ATT TCA GAA CTG GGG ACC AGA GAT CCA AGG TAT TGG ATG GTC GAT GAT GAC CCC TTA TGG AAG AAA GAA	541/181	571/191	FF1
T W S F S R I I S E L G T R D P R Y W M V D D D P L W K K E		601/201	
ATG TTT GAG AAA TAT CTT TCC AAA AGA TCA GCC GAT CAA CTT CTT AAG GAA CAC AAT GAA ACA AGC AAA TTC AAA GAA GCC TTT GAG AAA	631/211	661/221	
M F E K Y L S N R S A D Q L L K E H N E T S K F K E A F Q K		691/231	
ATG TTG CAA AAC AAT TCT CAT ATA AAA TAT TAC ACC CGT TGG CCT ACC GCA AAG AGA CTA ATT GCC GAC GAA CCA ATA TAC AAA CAC TCC	721/241	751/251	FF2
M L Q N N S H I K Y Y T R W P T A K R L I A D E P I Y K H S		781/261	
GTG GTC AAT GAA AAG ACA AAG AGA CAG ACC TTT CAA GAT TAT ATA GAT ACC CTC ATC GAC ACT CAG AAA GAA TCA AAA AAA AA TTG AAA	811/271	841/281	
V V N E K T K R Q T F Q D Y I D T L I D T Q K E S K K K L K		871/291	
ACA CAG GCC CTA AAA GAA CTA AGA GAG TAT TTA AAC GGT ATT ATA ACA ACA TCA TCC TCT GAA ACT TTC ATA ACC TGG CAG CAG CTT TTA	901/301	931/311	
T Q A L K E L R E Y L N G I I T T S S S E T F I T W Q Q L L		961/321	
AAT CAC TAT GTT TTT GAT AAG AGT AAG AGA TAT ATG GCG AAC CCG CAC TTC AAA GTC TTA ACC CAC GAA GAT GTT TTA AAC GAG TAT CTG	991/331	1021/341	CC
N H Y V F F D R K S K R Y M A N R H F K V L T H E D V L N E Y L		1051/351	
AAA ATA GTA AAT ACG ATT GAA AAC GAT CTT CAA AAC AAA CTA AAT GAG CTC CGA CTG CGC AAT TAT ACC AGA SAC CGT ATT GCT AGA GAT	1081/361	1111/371	
K I V N T I E N D L Q N K L N E L R L R N Y T R D R I A R D		1141/381	
AAC TTT AAA AGC TTA TTA AGA GAA GTG CCA ATC AAA ATC AAA GCA AAT ACT AGA TGG TCA GAT ATT TAT CCT CAT ATA AAG TCT GAT CCG	1171/391	1201/401	FF3
N F K S L L R E V P I K I K A N T R W S D I Y P H I K S D P		1231/411	
CGC TTT TTA CAT ATG CTT GGA AGG AAT GGC TCG TCC TGC CTT GAT TTA TTT TTA GAT TTT GTT GAT GAA CAA AGG ATG TAC ATC TTT GCA	1261/421	1291/431	
R F L H M L G R N G S S C L D L F L D F V D E Q R M Y I F A		1321/441	
CAA AGA TCA ATA GCC CAA CAG ACG TTG ATA GAT CAA AAT TTT GAA TGG AAT GAT GCC GAT AGC GAC GAG ATC ACC AAG CAA AAC ATA GAA	1351/451	1381/461	
Q R S I A Q Q T L I D Q N F E W N D A D S D E I T K Q N I E		1411/471	
AAA GTT CTG GAA AAT GAC CGG AAA TTT GAC AAG GTG GAT AAA GAA GAC ATC AGT TTG ATT GTT GAT GGT TTG ATA AAG CAA AGA AAC GAA	1441/481	1471/491	
K V L E N D R K F D K V D K E D I S L I V D G L I K Q R N E		1501/501	
AAG ATA CAA CAG AAA CTC CAA AAT GAG CGT AGG ATA TTG GAG CAA AAG AAG CAC TAT TTT TGG TTA CTT TTG CAA AGG ACA TAT ACA AAA	1531/511	1561/521	FF4
K I Q Q K L Q N E R R I L E Q K K H Y F W L L Q R T Y T K		1591/531	
ACC GGT AAG CCC AAG CCT AGT ACG TGG GAT TTA GCT TCC AAA GAG CTT GGC GAA TCT CTT GAA TAC AAG GCA CTA GGC GAT GAA GAT AAC	1621/541	1651/551	
T G K P K P S T W D L A S K E L G E S L E Y K A L G D E D N		1681/561	
ATA AGA AGA CAA ATT TTC GAG GAT TTT AAG CCT GAA AGC TCT GCA CCG ACT GCC GAA AGC GCT ACT GCA AAC TTA ACG TTG ACC GCG TCA	1711/571	1741/581	
I R R Q I F E D F K P E S S A P T A E S A T A N L T L T A S			
AAA AAG AGG CAT TTA ACT CCG GCT GTG GAA TTG GAC TAT TGA			
K K R H L T P A V E L D Y *			

Abb. 2-1: Sequenz von Prp40 mit gekennzeichneten Domänen (aus SGD Datenbank)
Gelb markiert WW-Domänen; Rot markiert FF-Domänen; Grün markiert coiled-coil Region.

Luc7:

EcoRI

ATC **GAA TTC** CAG CTG ACC ACC
pOAD

```

1/1                               31/11                               61/21
ATG TCA ACT ATG TCA ACG CCT GCC GCA GAA CAA CGC AAA CTC GTC GAA CAG CTG ATG GGC AGG GAC TTC AGT TTC CGC CAC AAC AGG TAT
M S T M S T P A A E Q R K L V E Q L M G R D F S F R H N R Y
91/31                               121/41                               151/51
TCG CAT CAA AAA AGA GAC CTC GGA CTA CAC GAT CCC AAG ATC TGC AAG TCA TAC CTT GTT GGC GAG TGC CCC TAC GAC CTG TTT CAG GGC
S H Q K R D L G L H D P K I C K S Y L V G E C P Y D L F Q G
181/61                               211/71                               241/81
ACC AAG CAG AGC CTG GGA AAA TGC CCG CAG ATG CAT CTT ACC AAG CAT AAA ATT CAG TAC GAG AGA GAG GTC AAG CAG GGC AAA ACG TTT
T K Q S L G K C P Q M H L T K H K I Q Y E R E V K Q G K T F
271/91 EcoRI                               301/101                               331/111
CCC GAA TTC GAA AGA GAA TAT CTG GCC ATT CTA TCT CGG TTT GTT AAT GAG TGT AAT GGC CAG ATA TCC GTA GCA CTA CAA AAT CTA AAA
P E F E R E Y L A I L S R F V N E C N G Q I S V A L Q N L K
361/121                               391/131                               421/141
CAC ACC GCT GAG GAA CGA ATG AAG ATT CAG CAG GTT ACC GAA GAA CTA GAT GTC TTG GAC GTG CGG ATA GGC CTA ATG GGA CAA GAG ATT CC
coil
H T A E E R M K I Q Q V T E E L D V L D V R I G L M G Q E I
451/151                               481/161                               511/171
GAT TCT TTA ATT CGT GCA GAT GAA GTC AGT ATG GGT ATG CTA CAG TCA GTC AAA TTA CAA GAA CTG ATT AGT AAA AGG AAA GAA GTT GCA
D S L I R A D E V S M G M L Q S V K L Q E L I S K R K E V A
541/181                               571/191                               601/201
AAA CGT GTA CGA AAC ATT ACA GAA AAC GTG GGC CAG AGC GCC CAG CAA AAG TTA CAG GTT TGC GAG GTG TGT GGG GCA TAC CTA TCG CGT
K R V R N I T E N V G Q S A Q Q K L Q V C E V C G A Y L S R
631/211                               661/221                               691/231
TTA GAT ACA GAC AGA AGG CTT GCT GAC CAC TTC TTG GGG AAG ATT CAT CTG GGA TAT GTC AAG ATG AGA GAG GAT TAT GAT CGG CTA ATG
L D T D R R L A D H F L G K I H L G Y V K M R E D Y D R L M
721/241                               751/251                               781/261
AAG AAT AAC CGG ACA ACT AAC GCC AGC AAG ACA GCT ACT ACA CTA CCC GGA AGA CGC TTT GTG TAG AAT TCC CGG GGA TCC
K N N R T T N A S K T A T T L P G R R F V *
pOAD

```

Abb. 2-2: Sequenz von LUC7 (aus SGD Datenbank)
Grün markiert coiled-coil Region; Grau markiert Restriktionsschnittstellen; Blau markiert pOAD Sequenz

Snu71:

```

ATG AGG GAT ATT GTA TTT GTA TCA CCG CAG CTG TAT TTG TCA TCA CAG GAG GGT TGG AAA AGT GAT TCT GCC AAA AGT GGG TTC ATC CCT
M R D I V F V S P Q L Y L S S Q E G W K S D S A K S G F I P
91/31 121/41 151/51
ATC CTC AAA AAT GAT CTA CAA CGT TTT CAG GAC TCA TTA AAA CAT ATA GTT GAC GCC AGA AAC AGC TTA TCA GAG ACA CTG CTA AAT AGC
I L K N D L Q R F Q D S L K H I V D A R N S L S E T L L N S
181/61 211/71 241/81
AAC GAT GAT GGG AGT ATA CAC AAT TCT GAC CAG AAT ACT GGT TTG AAT AAA GAC AAA GAG GCT TCA ATA GCA GAT AAC AAT AGT GCT AAC
N D D G S I H N S D Q N T G L N K D K E A S I A D N N S A N
271/91 301/101 331/111
AAG TGC GCC ACA AGC TCT TCC CGT TAC CAA GAG CTC AAA CAA TTT CTT CCC ATT TCC TTA GAC CAA CAG ATT CAT ACA GTA TCT TTA CAA
K C A T S S S R Y Q E L K Q F L P I S L D Q Q I H T V S L Q
361/121 391/131 421/141
GGT GTC TCT TCA TCA TTT TCT CGC GGA CAG ATA GAA TCA TTG CTA GAC CAC TGT TTG AAT TTA GCG TTG ACT GAA ACT CAA AGC AAT TCC
G V S S S F S R G Q I E S L L D H C L N L A L T E T Q S N S
451/151 481/161 511/171
GCA TTG AAA GTA GAA GCT TGG TCT TCT TTT TCT TCG TTT TTA GAT ACC CAG GAC ATT TTT ATA AGA TTC AGT AAG GTT GAT GAA GAT GAG
A L K V E A W S S F S S F L D T Q D I F I R F S K V D E D E
541/181 571/191 601/201
GCA TTT GTT AAT ACG CTG AAC TAC TGC AAA GCC TTA TTC GCG TTT ATT AGA AAG CTA CAT GAG GAT TTC AAG ATT GAG TTA CAC TTG GAT
A F V N T L N Y C K A L F A F I R K L H E D F K I E L H L D
631/211 661/221 691/231
TTG AAC ACA AAA GAA TAT GTC GAA GAC CGA ACA GGA ACT ATA CCG AGT GTT AAG CCA GAA AAG GCT AGC GAA TTT TAT TCT GTT TTC AAA
L N T K E Y V E D R A T G T I P S V K P E K A S E F Y S V F K K
721/241 751/251 781/261
AAC ATT GAA GAT CAA ACA GAG GAA AGA AAT TCA AAG AAA GAA CAG TTG GAT GAC TCT TCC ACA CAA TAC AAA GTG GAT ACA AAT ACT TTA
N I E D Q T D E R N S K K E Q L D D S S T Q Y K V D T N T L
811/271 841/281 871/291
AGT GAT TTG CCA TCG GAT GCT TTG GAC CAA TTG TGC AAG GAT ATA ATA GAA TTT AGG ACA AAA GTT GTC AGT ATA GAG AAA GAA AAA AAA
S D L P S D A L D Q L C K K D I I E F R T K V V S I E K E K K
901/301 931/311 961/321
ATG AAA AGT ACG TAC GAG GAA AGT AGG CGT CAA AGA CAC CAA ATG CAA AAA GTT TTT GAT CAA ATA AGG AAA AAC CAC TCA GGA GCC AAA
M K S T Y E E S R R Q R H Q M Q K V F D Q I R K N H S G A K
991/331 1021/341 1051/351
GGG AGC GCC AAT ACA GAG GAG GAG GAT ACT AAT ATG GAA GAT GAA GAT GAG GAG GAT GAC ACT GAA GAC GAC CTT GCC TTA GAG AAG AGA CC
G S A N T E E E E D T N M E D E D E D T E D D L A L E K R
1081/361 1111/371 1141/381
AAA GAA GAA AGA GAC CTG GAA GAA TCA AAT CGT AGA TAT GAG GAT ATG TTA CAC CAA TTA CAT TCC AAT ACA GAG CCT AAG ATA AAA TCC
K E E R D L E E S N R R Y E D M L H Q L H S N T E P K I K S
1171/391 1201/401 1231/411
ATT AGG GCT GAT ATC ATG AGT GCT GAA AAC TAT GAG GAA CAT TTG GAG AAA AAT CGC TCA TTA TAT TTG AAG GAG CTA TTA CAC CTT GCC
I R A D I M S A E N Y E E H L E K N R S L Y L L K E L L H L A
1261/421 1291/431 1321/441
AAC GAC GTT CAT TAC GAC CAC CAT AGA TCT TTC AAG GAG CAA GAG EAA AGA AGG GAC GAA GAG GAT AGA GCT AAA AAT GGA AAT GCA AAG
N D V H Y D H H R S F K E Q E R R R D E E D R A K N G N A K
1351/451 1381/461 1411/471
GAA CTG GCG CCT ATA CAA CTA TCG GAT GGT AAG GCC ATA TCT GCA GGG AAG GCT GCC GCC ATC ACC CTT CCT GAA GGC ACT GTG AAG AGC
E L A P I Q L S D G K A I S A G K A A A I T L P E G T V K S
1441/481 1471/491 1501/501
GAG AAC TAT AAC GCG GAC AAG AAT GTG TCT GAG AGC TCA GAA CAC GTC AAG ATC AAA TTC GAC TTT AAG AAG GCT ATT GAT CAC TCA GTT
E N Y N A D K N V S E S S E H V K I K F D F K K A I D H S V
1531/511 1561/521 1591/531
GAA AGC TCT AGC GAA GAC GAG GGA TAC AGA GAG AGC GAG CTA CCT CCA ACA AAA CCC TCC GAG AGA AGC GCG GCA GAG GAC CGT TTG CCA
E S S S E D E G Y R E S E L P P T K P S E R S A A E D R L P
1621/541 1651/551 1681/561
TTT ACA GCA GAT GAA CTG AAC ATA AGA CTA ACT AAT CTG AAG GAA TCG CGC TAC GTG GAC GAA CTG GTG CGT GAA TTC CTC GGC GTC TAC
F T A D E L N I R L T N L K E S R Y V D E L V R E F L G V Y
1711/571 1741/581 1771/591
GAG GAC GAG CTG GTG GAA TAC ATT CTT GAG AAC ATC CGC GTG AAC CAG AGC AAA CAG GCC CTT TTA AAT GAG CTA AGG GAG ACT TTC GAC PWI
E D E L V E Y I L E N I R V N Q S K Q A L L N E L R E T F D
1801/601 1831/611 1861/621
GAG GAC GGG GAA ACG ATA GCT GAT AGA CTG TGG AGT CGT AAA GAA TTT CGC TTG GGG ACC TGA
E D G E T I A D R L W S R K E F R L G T *

```

Abb. 2-3: Sequenz von SNU71 (aus SGD Datenbank)
 Grün markiert coiled-coil Region; Türkis markiert PWI-Domäne; Grau markiert Primersequenzen mit angegebenen Nummern.

YEAST-2-HYBRID (Y2H)-SYSTEM

Das Y2H-System wird häufig angewandt um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Fields & Song 1989). Dabei können zwei Proteine X und Y an die DNA-Bindedomäne (Bait) bzw. an die Aktivierungsdomäne (Prey) des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert werden. Getrennt voneinander sind beiden Fusionsproteine nicht in der Lage die Transkription eines Reportergens (z. B. Histidin) zu aktivieren. Findet aber zwischen den beiden Proteinen eine Interaktion statt, werden die beiden Domänen einander genähert und das Reportergen kann aktiviert werden, wodurch die Hefezelle befähigt ist auf Selektivmedium zu wachsen (siehe Abb. 2-4).

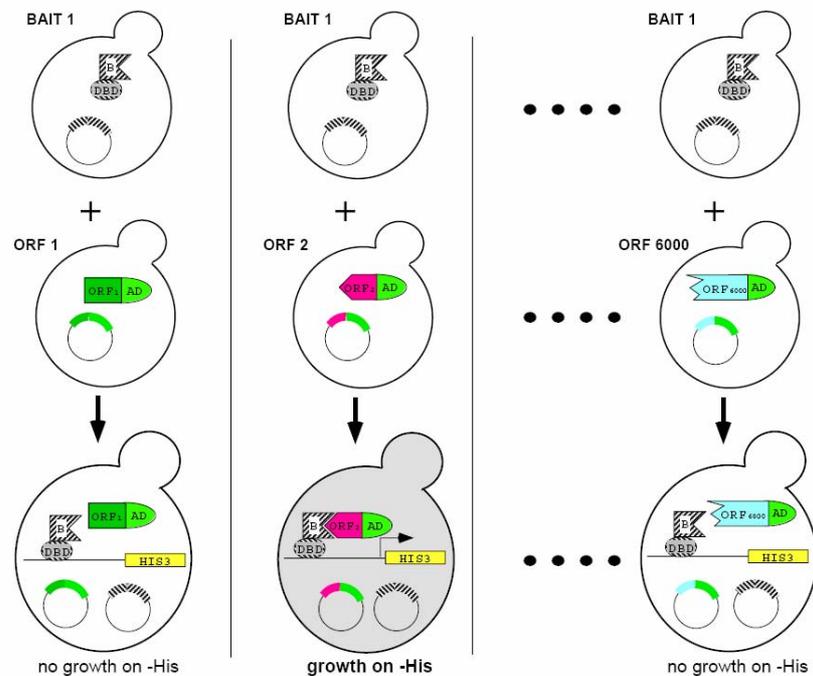


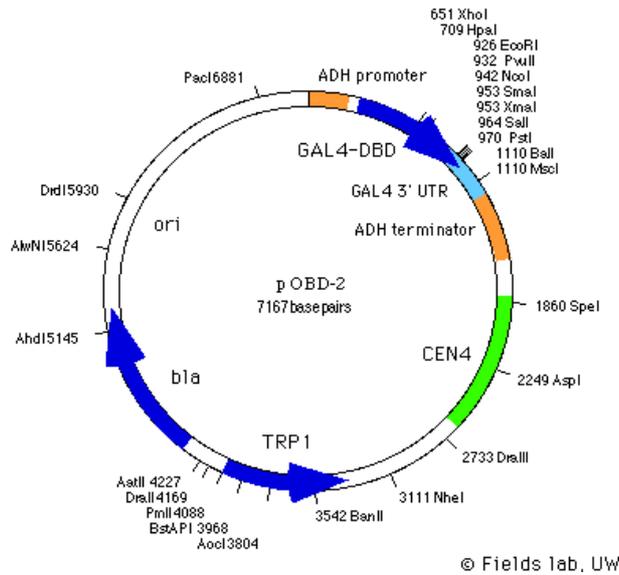
Abb. 2-4: Schematische Darstellung des Y2H-Prinzips (aus Cagney *et al.* 2000)

Der Bait-Stamm (α -Stamm), der die Gal4 DNA-Bindedomänen-Fusionsproteine exprimiert (obere Reihe), wird mit 6000 verschiedenen Hefestämmen (Preys) anderen Paarungstyps (α -Stamm), welche die Hefe-ORFs als Gal4-Aktivierungsdomänen-Fusionsproteine exprimieren (mittlere Reihe), verpaart. Interagieren zwei Proteine, werden die Domänen von Gal4 einander genähert und das Reportergen Histidin (His) kann exprimiert werden, wodurch die diploide Hefezelle befähigt ist auf Mangelmedium zu wachsen (untere Reihe; mittlere Spalte). Findet keine Interaktion statt, kann die Hefezelle nicht wachsen (untere Reihe, linke und rechte Spalte)

Verwendete Vektoren:

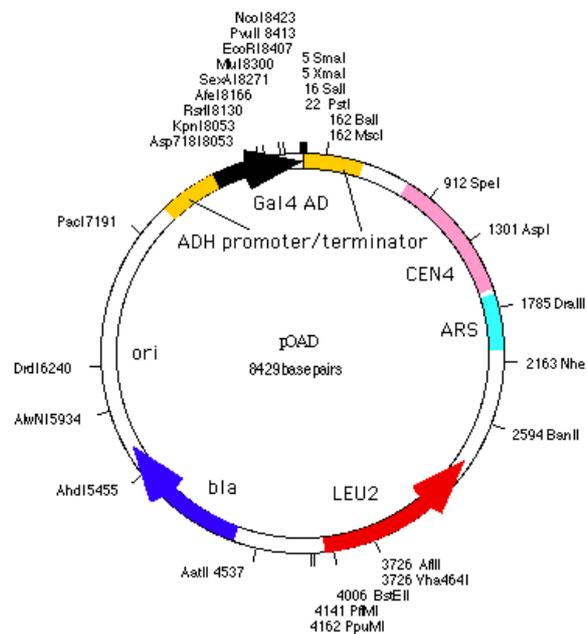
pOBD2-Vektor (Bait-Vektor):

Sequenzeigenschaften unter <http://depts.washington.edu/sfields/protocols/pOBD2.html>



pOAD-Vektor (Prey-Vektor):

Sequenzeigenschaften unter <http://depts.washington.edu/sfields/protocols/pOAD.html>



Bait und Prey Konstruktion:

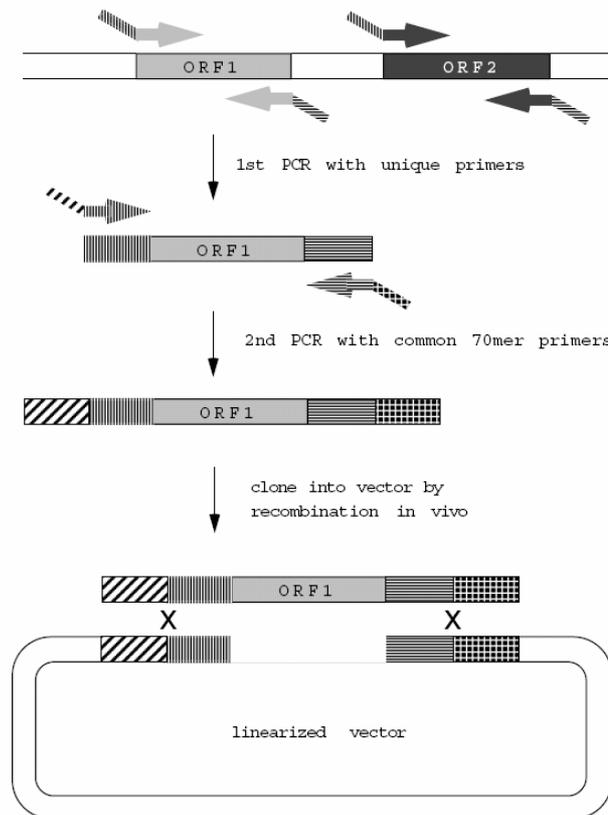


Abb. 2-5: Schematische Darstellung der Bait- und Prey- Konstruktion (aus Cagney *et al.* 2000)

Die verschiedenen Hefe-ORFs wurden mit spezifischen Primern amplifiziert, die Produkte mit gemeinsamen 5' und 3' 20-Nukleotidenden lieferten (1. PCR). In einer zweiten PCR wurden Produkte mit gemeinsamen 5' und 3' ~ 70-Nukleotidenden generiert (2. PCR). Durch die gemeinsamen 70-Nukleotidsequenzen können die ORFs in einen linearisierten Y2H-Vektor rekombiniert werden.

1. PCR:

FPrimer: 5' **AA TTC CAG CTG ACC ACC ATG** xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx 3'

(xxx entspricht ORF-spezifischen Sequenzen; ATG entspricht Startcodon)

RPrimer: 5' **GA TCC CCG GGA ATT GCC ATG** *** xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx 3'

(*** entspricht einem der drei Stopcodons)

2. PCR

FPrimer: 5' C TAT CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG ATC
GAA TTC CAG CTG ACC ACC ATG 3'

RPrimer: 5' C TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG ATT CAT AGA TCT CTG CAG GTC CAG
GGA TCC CCG GGA ATT GCC ATG 3'

Verwendete Oligonukleotide:

Nr.	Name	Sequenz
01	FFF1	5' ATTCCAGCTGACCACCATGAGAAGGACTAAAGAAGAA 3'
02	RFF1	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGTGTTTCATTGTGTTCCCT 3'
03	FFF2	5' ATTCCAGCTGACCACCATGAAGGAACACAATGAAACA 3'
04	RFF2	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGGATTCTTTCTGAGTGTCG 3'
05	FFF3	5' ATTCCAGCTGACCACCATGAATTATAACCAGAGACCGT 3'
06	RFF3	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGACGTCTGTTGGGCTATTG 3'
07	FFF4	5' ATTCCAGCTGACCACCATGCAAAATGAGCGTAGGATA 3'
08	RFF4	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGCGCTTTCGGCAGTCGG 3'
09	FPWI	5' AATCCAGCTGACCACCATGTCCGAGAGAAGCGCGGCAGAG 3'
10	RoPWI	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGCTCTGCCGCGCTTCTCTCGGA 3'
11	FCC	5' AATCCAGCTGACCACCATGGCCAAAGGGAGCGCCAATACA 3'
12	Rr	5' GATCCCCGGGAATTGCCATGTGTATTGGCGCTCCCTTTGGC 3'
13	Fkurz	5' AATCCAGCTGACCACCATG 3'
14	Rkurz	5' GATCCCCGGGAATTGCCATG 3'

Reaktionsansatz für die 1. PCR (50µl):

PCR-Programm: (30 Zyklen)

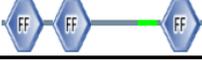
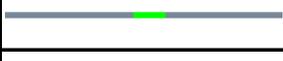
1,0 µl	genom. DNA	5 min	95°C
1,0 µl	dNTP-Mix (10mM)	40 sec	94°C
10 µl	5x Pfu-Puffer	1 min	54°C
1,0 µl	F Primer 20 µM	2 min	72°C
1,0 µl	R Primer 20 µM	10 min	72°C
0,4 µl	Pfu-Polymerase	∞	4°C
1,0 µl	Taq-Polymerase		
34,6 µl	H ₂ O _{Bidest}		

Reaktionsansatz für die 2. PCR (50µl):

PCR-Programm: (30 Zyklen)

10 µl	5x Pfu-Puffer	5 min	95°C
1,0 µl	10 mM dNTP-Mix	40 sec	94°C
1,0 µl	F Primer 20 µM	1 min	54°C
1,0 µl	R Primer 20 µM	2 min	72°C
1,0 µl	Pfu-Polymerase	10 min	72°C
1,0 µl	PCR-Produkt aus 1.PCR	∞	4°C
35 µl	H ₂ O _{Bidest}		

MATERIAL & METHODEN

Y2H-Klone	AS-Pos.		Skizze	Primer/Restriktionsenzyme
BAITS (pOBD₂)				
Prp40 wt	1	583		-
Prp40 WW1-2	1	75		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF1-4	129	560		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF1-3	129	428		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF1-2	129	264		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF2-3	196	428		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF3-4	351	560		keine genauen Primerangaben
Prp40 FF1	129	201		1 & 2
Prp40 FF2	196	264		3 & 4
Prp40 FF3	351	428		5 & 6
Prp40 FF4	487	560		7 & 8
PREYS (pOAD)				
Snu71 wt	1	620		-
Snu71 I	530	620		9 & 14
Snu71 II	329	536		11 & 10
Snu71 III	1	536		13 & 10
Snu71 IV	1	335		13 & 12
Luc7 wt	1	261		-
Luc7 I	1	144		<i>StuI/SmaI</i>
Luc7 II	93	261		<i>EcoRI/EcoRI</i>

Tab. 2-1: Verwendete Y2H-Konstrukte

Konstrukte ohne genaue Primerangaben wurden nicht von mir hergestellt, sondern von Simone Reber (EMBL; HD).

Verwendete Hefestämme

Gal4-DNA-Bindedomäne-Fusionen (Baits) wurden exprimiert in **PJ69-4alpha** (Hudson *et al.* 1997):

MATalpha trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4(deleted) gal80(deleted) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ

Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne-Fusionen (Preys) wurden exprimiert in **PJ69-4a** (James *et al.* 1996):

MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4(deleted) gal80(deleted) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ

Verwendete Hefemedien:

YPD (Vollmedium) 1 l Ansatz:

Hefeextrakt	10g
Pepton	20g
Glucose	20g
(Agar	16g)
mit H ₂ O _{dest} auf 1l auffüllen	
Autoklavieren	
1% Adenin in 0,1M NaOH (steril)	4 ml

Dropout-Mix (-LTH):

Methionin	1g
Arginin	1g
Phenylalanin	2,5g
Lysin	3g
Tyrosin	3g
Isoleucin	4g
Glutaminsäure	5g
Asparaginsäure	5g
Valin	7,5g

Threonin	10g
Serin	20g
Adenin	1g
Uracil	1g

Mediumkonzentrat 1l Ansatz:

Yeast Nitrogen Base	8,5g
Ammoniumsulfat	25g
Glucose	100g
Dropout-Mix	7g

mit H₂O_{dest} auf 1l auffüllen
steril filtrieren

AS-Stocklösungen:

Histidin (His)	2,4g/l
Tryptophan (Trp)	4,8g/l
Leucin (Leu)	7,2g/l

SD-Mangelmedium:

Flüssigmedium 1l Ansatz:

Mediumkonzentrat	200ml
H ₂ O _{dest}	800ml

sterilfiltrieren

Festmedium 1l Ansatz:

Agar	16g
H ₂ O _{dest}	800ml

autoklavieren

Mediumkonzentrat 200ml

je nach Medium entsprechende AS-Lösung zugeben:

- Trp-Medium: 8,3 ml Leucin und 8,3 ml Histidin
- Leu-Medium: 8,3 ml Tryptophan und 8,3 ml Histidin
- LT-Medium: 8,3 ml Histidin
- LTH-Medium: 6 ml 3AT-Lösung (0,5 M Stocklösung)

Durchführung der Y2H-Screens:

Mit dem jeweils im Screen zu testenden Bait wurden 50 ml Tryptophan-Mangelmedium angeimpft und ca. 2 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert, bis es dicht gewachsen war. Dann wurde zuerst die flüssige Bait-Kultur in 384 Spots auf 16 YEPD-Omnitrays pro Screen gestempelt. Anschließend wurden die Preys, die sich auf 16 YEPD-Omnitrays ebenfalls in 384 Spots pro Platte aber als Kolonien befinden, auf die angetrockneten Baits gestempelt. Für die Verpaarung von Bait und Prey wurden die YEPD-Platten 2 Tage im 30°C Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Screen zur Selektion der Diploiden auf –LT Medium Platten gestempelt. Durch die Verpaarung enthält die Hefezelle sowohl den Bait- als auch den Prey- Vektor (pOBD₂ und pOAD) und ist somit befähigt Leucin und Tryptophan zu produzieren und zu wachsen. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation im Brutschrank wird der Screen auf –LTH Medium gestempelt. Jetzt kann nur, wenn eine Protein-Protein-Interaktion stattfindet, das Reportergen Histidin angeschaltet werden und die betroffene Hefezelle ist fähig auf diesem Medium zu wachsen. Die positiven Kolonien sind nach 3-10 Tagen sichtbar. Für die jeweiligen Stempelschritte ist ein Roboter (Biomek 2000) mit einem entsprechendem Stempelwerkzeug (384 High Density Replica [HDR] Tool) notwendig (siehe Abb. 2-6).

Für die Durchführung der Einzeltest in kleinerem Maßstab wurden die Baits und Preys von Vollmedium-Platten abgenommen und in H₂O_{Bidest} verrührt. Zuerst wurden wieder die Baits aufgetragen (5 µl pro Spot), getrocknet und anschließend die Preys (5 µl pro Spot) darauf pipettiert. Die folgenden Schritte verliefen genauso wie bei den Screens, außer dass ein 96 Stempelwerkzeug verwendet wurde.

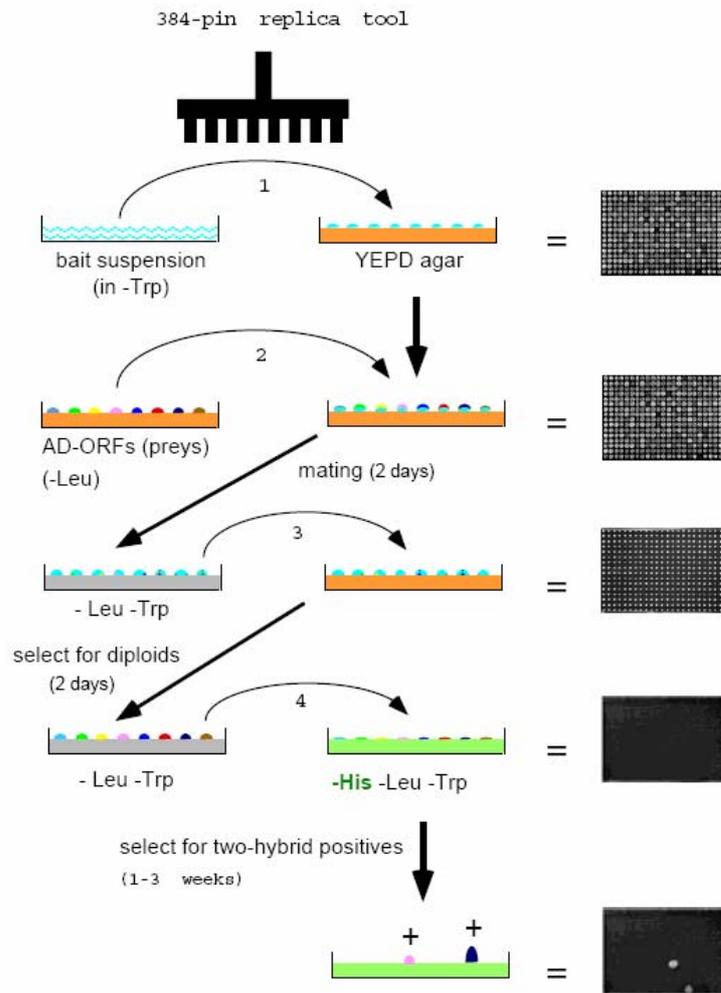


Abb. 2-6: Schematische Darstellung des automatisierten Y2H-Verfahrens (aus Cagney *et al.* 2000).

Zum Mating (1 und 2), der Selektion von Diploiden (3) und zur Detektion von 2H-Positiven (4) wird ein automatisiertes Stempelwerkzeug (384 High Density Replica [HDR] Tool) benutzt (Schritte 1-4). Schritt 1: Das Bait (haploide Hefe, die DNA-Bindedomäne-ORF-Fusionen exprimiert) wird aus einer Flüssigkultur auf Festmedium gestempelt (YEPD). Schritt 2: Haploide Hefezellen aus dem Prey-Set (Aktivierungsdomänen-Fusionen) werden auf die Baits zum Verpaaren gestempelt. Nach zwei Tagen Wachstum werden die Kolonien zur Selektion von Diploiden auf -LT-Medium transferiert (Schritt 3). Nach weiteren 2 Tagen Wachstum werden die diploiden Hefezellen zur Detektion von Positiven auf -LTH Selektivmedium gestempelt, wo die Kolonien nach einigen Tagen sichtbar werden, wobei schwache Interaktionen bis zu drei Wochen brauchen können.

EXPRESSION VON GST-FUSIONSPROTEINEN

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die FF-Domänen-Konstrukte (siehe Tab. 2-1) von Prp40 in den pGEX 4T-1 Vektor kloniert (Restriktionsverdau mit *Sal I* und *EcoR I*) und anschließend in BI21de *E. coli*-Zellen transformiert. Daraus wurde eine 20 ml Übernachtskultur (LB-Amp-Medium) angeimpft, die dann in 1l LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin gegeben wurde. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 geschüttelt und mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) induziert. Nach einer Induktion von 4-6 h wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min 4000 K) und nach einem Waschschrift mit PBS (w/o Ca und Mg) bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Bakterienpellet aus 1 l Kulturvolumen wurde mit 50 ml Lysepuffer resuspendiert und anschließend sonifiziert (Sinifikatoreinstellung: 4/hold/50%). Danach wurde zu 1% Endkonzentration Triton-X-100 zugegeben und für 10 min inkubiert. Das Zellysate wurde dann abzentrifugiert (10 000 rpm; 4°C; 10 min) und der Überstand mit 500 µl 50% Sepharose-Beads 30 min bei 4°C über Kopf gedreht. Die Beads wurden anschließend dreimal mit PBS- 1% Triton-X-100 gewaschen. Sollten die die GST-Fusionsproteine an die Beads gekoppelt sein, wurden sie nach diesem Schritt bei -20°C in 10% Glycerin eingefroren oder gleich weiter verwendet. Zur Elution der Fusionsproteine wurde nach dem Waschschrift 500 µl Glutathion-Elutionspuffer zugegeben und bei Raumtemperatur 10 min bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Der Elutionsschrift wurde zweimal wiederholt. Zur Dialyse wurden die GST-Fusionsproteine in vorbehandelte Schläuche überführt und in 2,5 l PBS (mit Proteaseinhibitoren) über Nacht bei 4°C gerührt. Das PBS wurde am nächsten Tag mehrmals gewechselt. Die Expression wurde auf einem SDS-Gel überprüft und durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford quantifiziert.

Lysepuffer: 50 ml 1x PBS; 1 Tablette Proteaseinhibitoren (Roche) ; 50 mg/ml Lysozym; 1mM DTT
10x PBS w/o Ca u. Mg (Invitrogen)

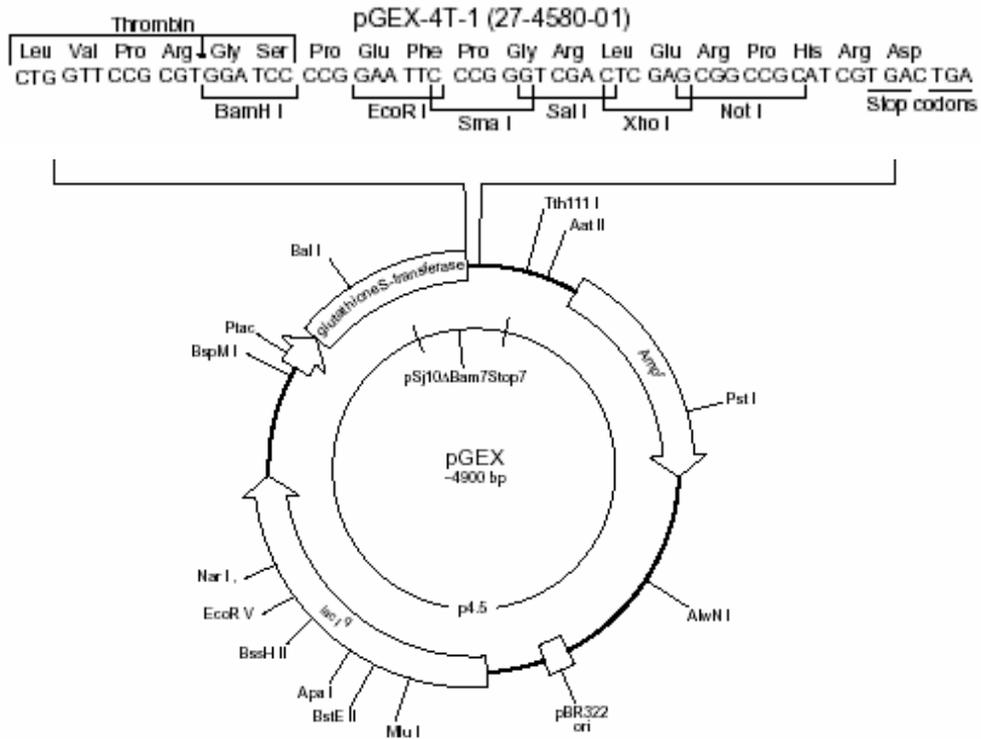
Glutathion Sepharose 4B (Pharmacia Biotech): Äquilibrieren von 75% auf 50% nach Vorschrift

Glutathion-Elutionspuffer: 10 mM red. Glutathion (SIGMA G4251-10G) in 50 mM Tris-HCl pH 8,0

Dialyseschlauchvorbehandlung: 10 min kochen in 2% Na-Bicarbonat/ 0,1 mM EDTA; spülen mit H₂O; Autoklavieren

Verwendeter Vektor:

pGEX 4T-1 (Amersham Pharmacia)



Verwendete Bakterienzellen:

***E. coli* BL21**

Genotyp: F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)

IN VITRO-BINDEASSAY (GST-PULLDOWN)

Zur Durchführung der GST-Pull down Experimente wurden die an Glutathion-Beads gekoppelten GST-Fusionsproteine mit radioaktiv markiertem translatierten Protein (Snu71 oder Luc7) inkubiert. Nach mehrmaligen Waschschrinen wurden die Beads sedimentiert und dann auf einem SDS-Gel aufgetrennt. So kann durch Autoradiographie eine Bindung zwischen zwei Proteinen detektiert werden.

Primerdesign:

Forward Primer:

5' GGATCC TAATACGACTCACTATAGGGA AACAG CCACCATG Gensequenz 3'
Spacer **T7-Promotor** **Spacer** **Startcodon**

Reverse Primer:

5' TCA (Stopcodon)-Gensequenz (20 bp) 3'

Verwendete Oligonukleotide:

Snu71:

FSnu71: 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAAACAGCCACCATGAGGGAT
 ATTGTATTTGTA3'

RSnu71: 5' TCA GGT CCC CAA GCG AAA TTC 3'

Luc7:

FLuc7: 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAAACAGCCACCATGTCAACT
 ATGTCAACGCCT 3'

RLuc7: 5' CTA CAC AAA GCG TCT TCC GGG 3'

PCR-Konditionen:

- 1 µl Plasmid-DNA
- 1 µl dNTP-Mix (10mM)
- 10 µl 5x Pfu-Polymerase Puffer
- 1 µl F Primer (20 µM)
- 1 µl R Primer (20 µM)
- 1 µl Pfu Polymerase
- 35 µl H₂O

TNT PCR-Programm

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
30	94°C	40 sec
	55°C	1 min
	72°C	4 min
	72°C	10 min
	4°C	unendlich

In vitro Translation (Invitro Translations-Kit TNT T7 Quick für PCR-DNA; PROMEGA)

Master Mix	40 µl
[35S] Methionin (1,000 Ci/mmol in 10 mCi/ml)	4 µl
PCR-Produkt	5 µl
Nukleasefreies H ₂ O	1 µl
<hr/> Total Volumen	<hr/> 50 µl

- 90 min 30 °C
- 150 µl pd-Puffer w/o NP40
- 10 min max. zentrifugieren
- Überstand in neues Eppi
- 1 µl auf 12% SDS- Gel (siehe allgemeine Methoden)
- Autoradiographie

Pull down (normale Versuchsbedingungen)

- 10 µg Protein an 20 µl Beads koppeln in PBS
- 10 min RT leicht schütteln
- 30 min bei 4°C drehen
- 2x mit pd-Puffer waschen
- + 500 µl pd-Puffer
- + 4 µl Translationsprodukt
- 5 min RT mischen
- 1 h 4°C drehen
- 3x mit pd-Puffer waschen
- + 40 µl 1x Probenpuffer
- 12 % SDS-Gel (siehe allgemeine Methoden)
- Autoradiographie

pd-Puffer: 40 mM Hepes pH 8.0; 100 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,1mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,2 % Triton-X-100

Pull down (modifizierte Versuchsbedingungen)

- 10 µg Protein an 20 µl Beads koppeln (wie oben)
- 2x mit neuem Pd-Puffer waschen
- + 500 µl Pd-Puffer
- + 16 µl (1:4 mit Pd-Puffer verd. und abzentrifugiertes) Translationsprodukt
- 2 h 4 °C drehen
- 3x Waschen (jeweils für 10 min rotieren)
- 1 x Pd-Puffer 1 % NP40
- 4 x Pd-Puffer mit 0,1 % NP40
- 1 x Pd-Puffer
- + 40 µl 1 x Probenpuffer
- 12 % SDS-Gel (siehe allgemeine Methoden)
- Autoradiographie

Pd-Puffer: 20 mM Tris pH 7.5-8.0; 1mM β-Mercaptoethanol; 3 mM EDTA; 150 mM NaCl

PEPTIDARRAYS

Die SPOT-Methode wurde zur gleichzeitigen Synthese von multiplen Peptiden auf einer homogenen Zellulose-Membran entwickelt (Frank *et al.* 1992). Diese Membran kann dann zur Detektion von Protein-Protein oder Protein-Nukleinsäure-Interaktionen verwendet werden, wobei die Interaktion sogar auf Aminosäure-Ebene charakterisiert werden kann.

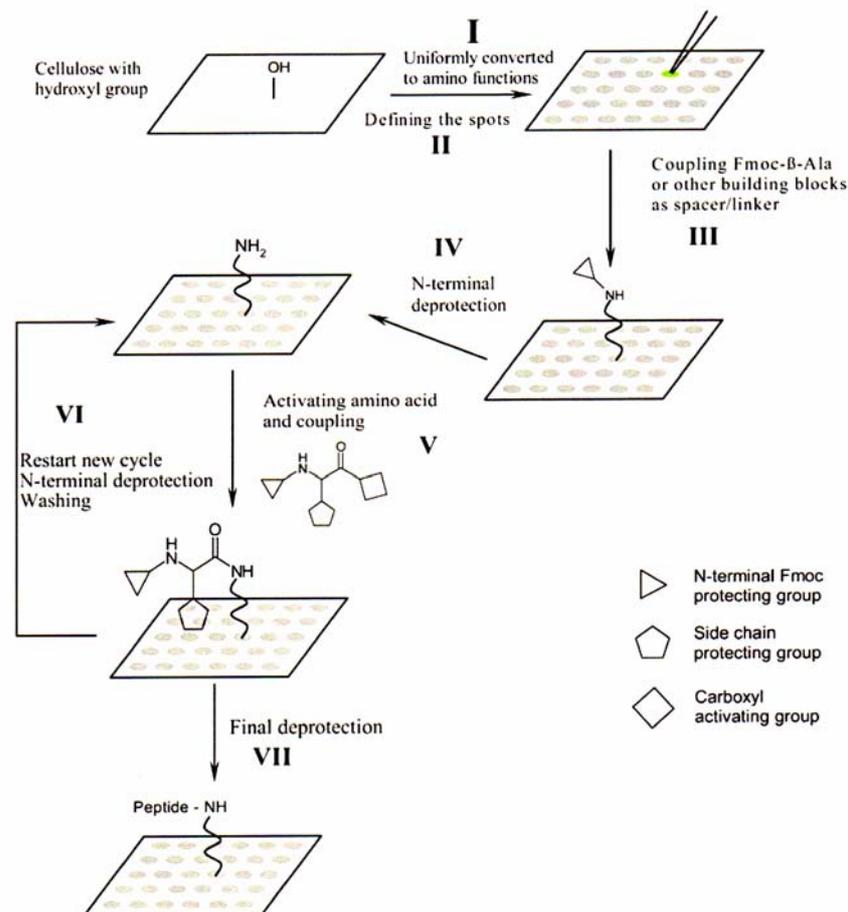


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der SPOT-Methode

I) Ein kommerziell erwerbbarer Zellulosefilter (z. B. Whatman) mit funktioneller Hydroxygruppe wird an Aminofunktionen angepasst. II) Die Spots werden durch einen Roboter (oder auch manuell) definiert, indem aktivierte Fmoc- β -Ala-OH oder andere Spacer in kleinen Tropfen auf die Membran gekoppelt (Coupling) werden (III). IV) Im nächsten Schritt (Deprotection) wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, so dass die nächste aktivierte Fmoc-Aminosäure gekoppelt werden kann (V). Jeder Zyklus beginnt mit der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe bis die gewünschte Peptidlänge erreicht ist (VI). Die Peptidsynthese verläuft vom C-Terminus zum N-Terminus und endet mit einer letzten F-moc-Abspaltung. Außerdem werden die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt, die während der gesamten Synthese geschützt waren, so dass ein reaktives Peptid entsteht (VII).

Verwendete Chemikalien:

DMF/ N, N- Dimethylformamid (Fluka 40255)
 DIC/ Diisopropyl-carbodiimide (Merck 803649)
 NMI/ 1-Methylimidazol (Merck 111348)
 EtOH/ Ethanol
 HOBt/ Hydroxybenzotriazol (Fluka 54802)
 NMP/ 1- methyl-2- Pyrrolidon (Fluka 69116)
 Piperidin (Fluka 33537)
 Acetic Anhydride (Sigma A6404)
 TFA/ Trifluoressigsäure (Fluka 91700)
 TIPS/ Triisopropylsilan (Fluka 92095)
 DCM/ Dichlormethan (Merck 106051)
 Phenol (Merck 822296)
 TIBS/ Triisobutylsilan (Fluka 92037)

Verwendete Aminosäure-Derivate:

AS-Derivat	NOVA-Bestellnummer	MG [g/mol]	0,5 mmol
Fmoc-Ala-OH	04-12-1006	311,3	155,7 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	04-12-1145	648,8	324,4 mg
Fmoc-Asn(Trt)-OH	04-12-1089	596,7	298,4 mg
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	04-12-1013	411,5	205,8 mg
Fmoc-Cys(Trt)-OH	04-12-1018	585,7	292,9 mg
Fmoc-Gln(Trt)-OH	04-12-1090	610,7	305,4 mg
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	04-12-1020	425,5	212,8 mg
Fmoc-Gly-OH	04-12-1001	297,3	148,7 mg
Fmoc-His(Trt)-OH	04-12-1065	619,7	309,9 mg
Fmoc-Ile-OH	04-12-1024	353,4	176,7 mg
Fmoc-Leu-OH	04-12-1025	353,4	176,7 mg
Fmoc-Lys(boc)-OH	04-12-1026	468,5	234,3 mg
Fmoc-Met-OH	04-12-1003	371,5	185,8 mg
Fmoc-Phe-OH	04-12-1030	387,4	193,7 mg
Fmoc-Pro-OH	04-12-1031	337,4	168,7 mg
Fmoc-Ser(tBu)-OH	04-12-1033	383,4	191,7 mg
Fmoc-Thr(tBu)-OH	04-12-1000	397,5	198,8 mg
Fmoc-Trp(Boc)-OH	04-12-1103	526,6	263,3 mg
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	04-12-1037	459,6	229,8 mg
Fmoc-Val-OH	04-12-1039	339,4	169,7 mg
			0,2 mmol
Fmoc-β-Ala-OH	04-12-1044	319,3	128 mg
	BACHEM-Betsellnummer		0,5 mmol
Fmoc-β-Ala-Opfp	B-1765		

Tab. 2-2: Verwendete Aminosäure-Derivate für die Peptidsynthese

Fmoc (9-Fluorenyl-Methoxycarbonyl)- Gruppe blockiert den N-Terminus des Aminosäure-Derivates; Aminosäuren sind im 3-Buchstabencode angegeben; in Klammern sind die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren angegeben.

Verwendeter Roboter:

MultiPep (INTAVIS AG Bioanalytical Instruments; Köln)

Herstellung von AS-Aliquots:

- 0,5 mmol pro AS abwiegen (siehe Tab. 2-2)
- pro 20 AS 2,3 g HOBt in 20 ml NMP ansetzen
- 1 ml davon zu abgewogenen AS zugeben
- lösen und auf 1,5 ml mit NMP auffüllen
- daraus ergeben sich pro AS 4 x 360 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C (~1/2 Jahr haltbar)
- für größere Mengen wurde die 10fache Menge angesetzt

Verwendete Membranen:

CAPE (Cellulose-amino-hydroxypropyl ether)-Membran (in Berlin verwendet)

β-Alanin-Spacer

β-Alanin-Membran- Herstellung

- Whatman 50 Zellulose-Membran (VWR: 1450917) 10 x 15 cm
- AS-Lösung (1,28 g β-Alanin + 20 ml DMF + 748 µl DIC + 635 µl NMI) herstellen und luftblasenfrei auf die Membran geben
- Über Nacht oder mindestens 3 Stunden inkubieren
- Trocknen
- Fmoc-Absplattung: 20% Piperidin für 20 Minuten
- 5x mit DMF waschen
- 2x mit EtOH waschen
- Trocknen
- Bei Verwendung zuerst wieder β-Alanin (Aktivester: Fmoc-β-Alanin-Opfp) als Spacer spotten

Amino-PEG₅₀₀-UC540-Membran (kommerziell erworben über INTAVIS AG Bioanalytical Instruments)
Polyethylenglykol-Spacer

Durchführung der Peptidsynthese

1 Tag vor Synthesestart:

- 1 AS-Aliquot-Set & Membran ü. N. bei RT

Synthesestart (1.Tag):

- Abfallbehälter kontrollieren und ggf. entleeren
- DMF und EtOH ggf. auffüllen
- 240 µl Aktivator- Lösung zu AS geben
- Mischen und 30 min aktivieren
- Zentrifugieren 3 min 4000 rpm
- Aliquots in frische Behälter in speziellen Reihenfolge im Ständer füllen
- evtl. (siehe Synthesereport) mit DMF auf entsprechendes Volumen auffüllen
- 20 %ige Piperidin- Lösung auffüllen
- Capping- Lösung herstellen und einfüllen
- Programm starten (Sequenz-File/ Methoden-File/ Tray-File)
- ggf. kalibrieren
- AS- Aliquots für den nächsten Tag über Nacht auf RT
- ggf. Piperidin- u Capping-Lösung nachfüllen

Aktivator- Lösung: 0, 4 ml DIC + 2, 0 ml NMP + 2, 8 ml DMF (für 1 AS-Set)

Capping- Lösung: 0, 3 ml Acetic Anhydrid + 15 ml DMF

Piperidin- Lösung: 20 % Piperidin in DMF

folgende Synthesetage:

- AS- Aliquots aktivieren (siehe oben) und ersetzen
- Alten Behälter und Inhalt entsorgen (halogenfreier organischer Abfall)
- Capping- und Piperidin- Lösung auffüllen

Letzter Synthesetag:

- nach Synthese Membran gut trocknen (mind. 4 Stunden, am besten über Nacht)
- Abfälle leeren und entsorgen (halogenfreier organischer Abfall)
- TFA- Abspaltung

Abspaltung der Seitenschutzgruppen (TFA-Abspaltung)

TFA- Abspaltung (für Amino- PEG- Membranen INTAVIS):

- Pro Membran: 9 ml TFA + 0,5 ml Triisopropylsilan + 0,5 ml H₂O mischen
- Membran darin 1 h inkubieren; ab und zu leicht schütteln
- 4 x mit Dichlormethan waschen
- 4 x 2 min DMF
- 2 x 2 min EtOH
- Gut trocknen (am besten über Nacht)

TFA-Abspaltung für β -Ala oder CAPE- Membranen

- 30 min 90% TFA (0,5 g Phenol + 1 ml H₂O + 1,5 ml TIBS + 2,5 ml DCM + 45 ml TFA) ohne Schütteln
- 4 x 3 min mit DCM waschen
- 3 x 3 min mit DMF waschen
- 3 x 3 min mit Ethanol waschen
- Trocknen
- 150 min 50 % TFA (0,5 g Phenol + 1 ml H₂O + 1,5 ml TIBS + 22,5 ml DCM + 25 ml TFA) ohne Schütteln
- 4 x 3 min mit DCM waschen
- 3 x 3 min mit DMF waschen
- 3 x 3 min mit Ethanol waschen
- Trocknen

GST- Fusionsprotein- Inkubation:

- 1 x 10 min Methanol
- 3 x 10 min 1x TBS
- 3 h Blockieren in Blockingpuffer
- 1 x 10 min 1x TBS
- GST- Fusionsprotein 10 µg/ ml in Blockingpuffer (- Tween) ü.N. 4 °C drehen
- 3 x 10 min 1x TBS
- 3 h 1. AK (**anti-GST; SIGMA G-1160**) 1: 1000 in Blockingpuffer
- 3 x 10 min 1x TBS
- 1,5 h 2. AK (**anti-Maus; SIGMA A-5906**) 1:5000 in Blockingpuffer
- 3 x 10 min 1x TBS
- ECL- Lösung (Lösung A und Lösung B 1:1 mischen); 1 min inkubieren
- Film ~ 30 sec auflegen

10 x TBS pH 8.0: 24,2 g Tris base + 292,2 g NaCl; auf pH 7,5 mit HCl einstellen

Blockingpuffer: 1g Magermilchpulver + 50 ml TBS + 2, 5 g Saccharose + 0,05% Tween

Luc7- MUTATION

Durchführung mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Protokoll.

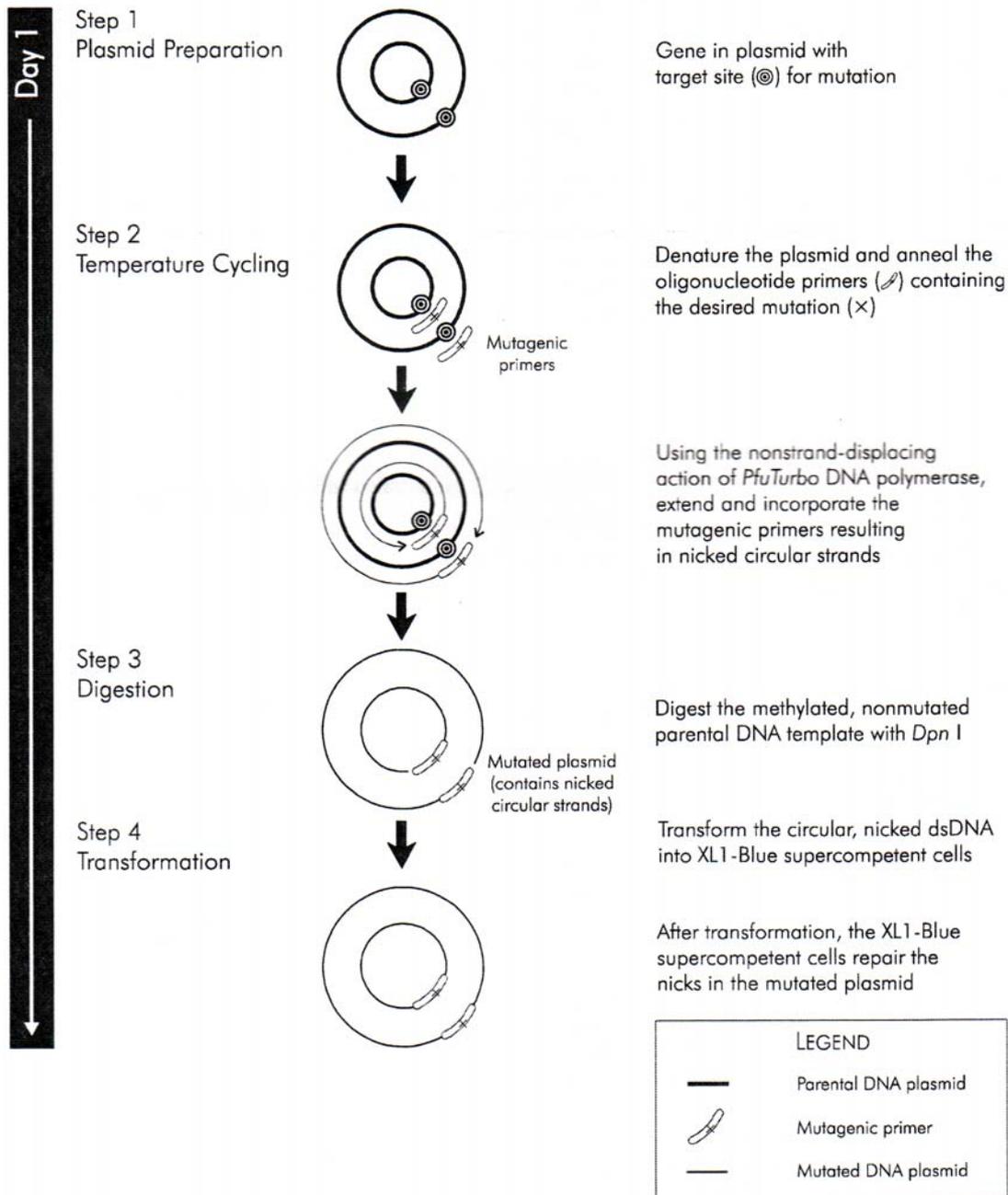


Abb. 2-8: Schematischer Überblick der Mutagenese-Durchführung

Verwendete Oligonukleotide:

Luc7 R216A L217A: **R→A L→A**

F: 5' GAT ACA GAC AGA **GCG GCT** GCT GAC CAC TTC 3'

R: 5' GAA GTG GTC AGC **AGC CGC** TCT GTC TGT ATC 3'

N= 30; Mismatch= 13, 3%; G/C%= 57%; Tm= 69°C

Luc7 F221A L222A: **F→A L→A**

F: 5' G CTT GCT GAC CAC **GCC GCG** GGG AAG ATT CAT C 3'

R: 5' G ATG AAT CTT CCC **CGC GGC** GTG GTC AGC AAG C 3'

N= 32; Mismatch= 12, 5%; G/C%= 63%; Tm= 73, 5°C

Luc7 K224A I 225A: **K→A I→A**

F: 5' C CAC TTC TTG GGG **GCG GCT** CAT CTG GGA TAT G 3'

R: 5' C ATA TCC CAG ATG **AGC CGC** CCC CAA GAA GTG G 3'

N= 32; Mismatch= 12, 5%; G/C%= 59%; Tm= 72, 3°C

Ausgangsplasmid: pOAD-Luc7

PCR-Ansatz: nach Protokoll

PCR-Parameter:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 sec
16	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	2 min/kb der Plasmidlänge

IN VIVO FF-DOMÄNEN- DELETIONEN

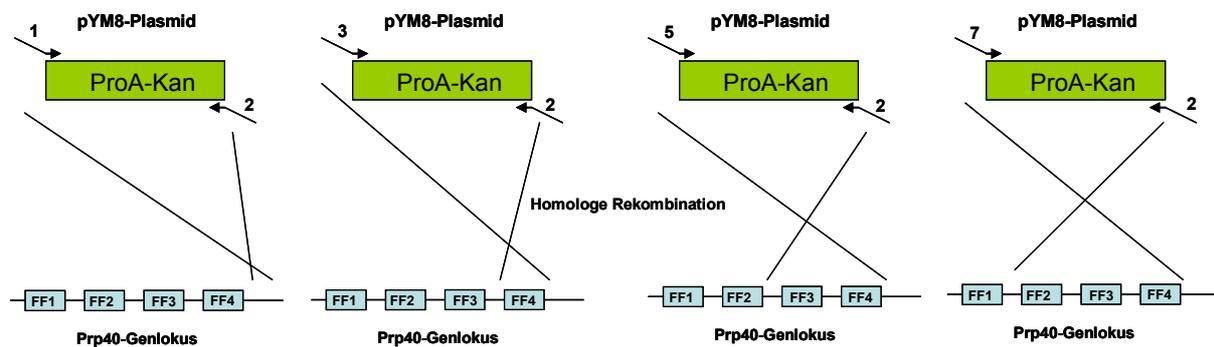


Abb. 2-9: Schematische Darstellung der in vivo FF-Domänen Deletionen in Prp40

Verwendete Oligonukleotide:

Prp40ProA:

1) F: 5' GCG TCA AAA AAG AGG CAT TTA ACT CCG GCT GTG GAA TTG GAC TAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'

2) R: 5' ATA ATT TAT ATA ATG ATT AAC AAG ATA GAG GTC GAC ACG TCA GAA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G 3'

Δ FF4ProA:

3) F: 5' AGA AAC GAA AAG ATA CAA CAG AAA CTC CAA AAT GAG CGT AGG ATA CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'

2) R: 5' ATA ATT TAT ATA ATG ATT AAC AAG ATA GAG GTC GAC ACG TCA GAA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G 3'

Δ FF3-4ProA:

5) F: 5' CTT CAA AAC AAA CTA AAT GAG CTC CGA CTG CGC AAT TAT ACC AGA CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'

2) R: 5' ATA ATT TAT ATA ATG ATT AAC AAG ATA GAG GTC GAC ACG TCA GAA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G 3'

Δ FF2-4ProA:

7) F: 5' CTT TCC AAT AGA TCA GCC GAT CAA CTT CTT AAG GAA CAC AAT GAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'

2) R: 5' ATA ATT TAT ATA ATG ATT AAC AAG ATA GAG GTC GAC ACG TCA GAA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G 3'

IN VIVO FF-DOMÄNEN- DOPPELKONSTRUKTE

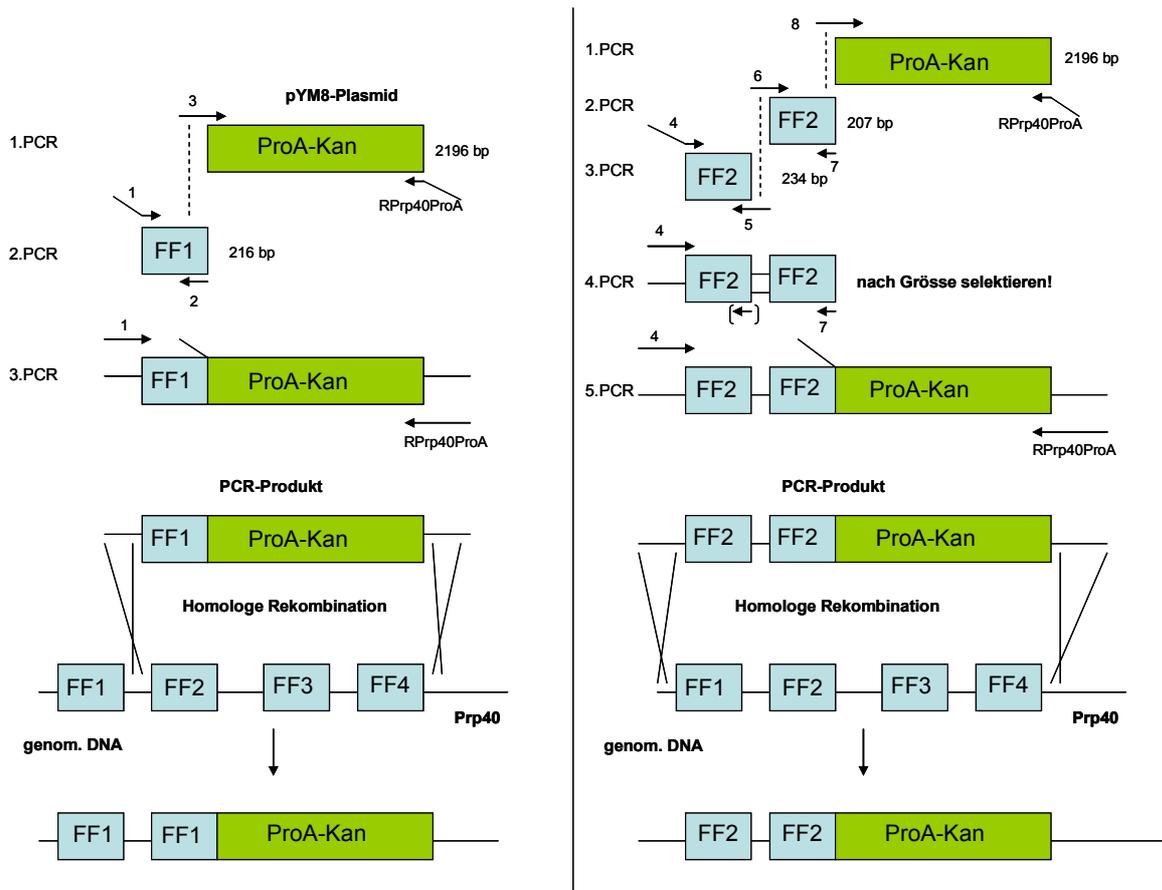


Abb. 2-10: Schematische Darstellung der in vivo Doppeldomänen-Konstrukte in Prp40

Verwendete Oligonukleotide:

- 1) F vFF2/FF1 5' CTT TCC AAT AGA TCA GCC GAT CAA CTT CTT AAG GAA CAC AAT GAA AAA GAA GAA GCA GAG AAG GAA TTT ATT ACC 3'
- 2) R FF1 5' ATT GGA AAG ATA TTT CTC AAA CAT TTC TTT CTT 3'
- 3) F FF1Ende/ProA 5' AAG AAA GAA ATG TTT GAG AAA TAT CTT TCC AAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'
- 4) F vFF1/FF2 5' CAA TAT GCT AAT AAC TCT AAA CTG CTT AAT GTC AGG AGA AGG ACT ACA AGC AAA TTC AAA GAA GCC TTT CAG 3'
- 5) R FF2/zwFF1-FF2 5' AAG TTG ATC GGC TGA TCT GGT ATC TAT ATA ATC TTG AAA GGT CTG TCT 3'
- 6) F zwFF1-FF2/FF2 5' AGA TCA GCC GAT CAA CTT CTT AAG GAA CAC AAT GAA ACA AGC AAA TTC AAA GAA GCC TTT CAG 3'
- 7) R FF2 5' GGT ATC TAT ATA ATC TTG AAA GGT CTG TCT 3'
- 8) F FF2 Ende/ProA 5' AGA CAG ACC TTT CAA GAT TAT ATA GAT ACC CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'
- 9) RPrp40/ProA 5' ATA ATT TAT ATA ATG ATT AAC AAG ATA GAG GTC GAC ACG TCA GAA CGT ACG CTG CAG GTC GAC 3'

Verwendeter Vektor: pYM8-Plasmid (Knop *et al.* 1999) mit ProteinA-*kanMX6*-Kassette; keine Plasmidkarte vorhanden

Verwendeter Hefestamm: PJ 694-alpha

MATalpha *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4(deleted) gal80(deleted)*
LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 *met2::GAL7-lacZ*

Kontroll-PCR aus genomischer DNA

KoF: 5' GGA CGA ACT ATA AAC GAG 3' (Prp40-spezifisch; bp322-339 siehe Abb. 2-1)

S3R: 5' GTC GAC CTG CAG CGT ACG 3' (pYM8-spezifisch)

PCR-Ansatz:

5 µl DMSO
10 µl 10x Taq- Puffer
2,5 µl dNTPs 10 mM
1 µl Ko F 20 µM
1 µl S3 R 20 µM
1 µl genomische DNA (100 ng/µg)
1 µl Taq
68,5 µl H₂O

Kontroll-Western aus Hefeextrakt

Verwendete Antikörper:

1. AK: Rabbit anti Goat (1:5000)

2. AK: Goat anti Rabbit (1:5000)

Wachstumskurve

Zur Bestimmung der Wachstumskurve wurden die jeweiligen Stämme aus einer Übernachtskultur in einer frischen YEPD-Kultur auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ = 0,05 angepasst und 10 Stunden lang jede Stunde die Optische Dichte gemessen.

FUNKTIONELLER SPLEISSTEST

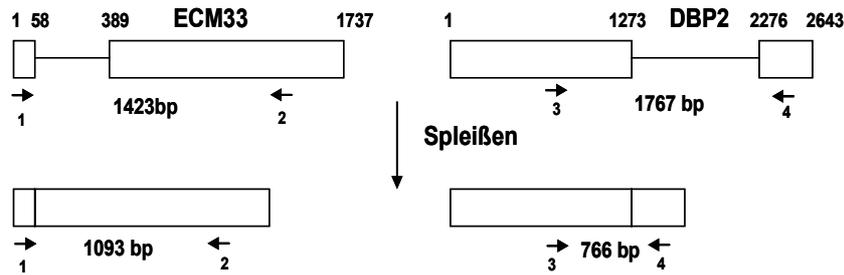


Abb. 2-11: Schematische Darstellung des Spleißtests

Gezeigt sind die beiden Hefe-Intron-Gene ECM33 und DBP2 (Rechtecke markieren Exons; Linien markieren Introns) mit angegebenen PCR-Produkt Größen bei nicht funktionierenden Spleißen (obere Darstellung) und korrektem Spleißvorgang (untere Darstellung). Pfeile markieren die Primer (ECM33: FPrimer 1 und RPrimer 2; DBP2: FPrimer 3 und RPrimer 4) Detektion des korrekten Spleißens in einer PCR benutzt wurden.

Verwendete Oligonukleotide:

ECM33-Oligonukleotide:

- 1) F: 5' AAG TGC CTC CGC TCT AGC TG 3'
- 2) R: 5' AGC GGA AGA TGT AGC AGA GC 3'

DBP2-Oligonukleotide:

- 3) F: 5' AGG TCG ACT AAT TGA TAT GC 3'
- 4) R: 5' ACC ATA AGA TCT CCT GTC G 3'

Verwendete mRNA:

FF1-4ProA (213 ng/μl) → 4,3 μl und ΔFF3-4ProA (351 ng/μl) → 2,8 μl
(total- und mRNA- Isolation siehe allgemeine Methoden)

RT-Reaktion:

- 1 μg mRNA
- + 1 μl Oligo dT-Primer (0,5 μg/μl)
- 10 min bei 70°C
- 5 min auf Eis
- + 5 μl 5x Puffer

- + 1, 25 μ l dNTPs (10mM)
- + 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase
- + 0,5 μ l Ribonuklease Inhibitor
- ad auf 25 μ l H₂O
- 60 min 42°C
- 10 min 70°C
- → cDNA

PCR-Ansatz:

10 μ l 5x Taq-Puffer
1 μ l dNTPs (10 mM)
1 μ l F Primer (ECM33 oder DBP2)
1 μ l R Primer (ECM33 oder DBP2)
1 μ l cDNA
0,5 μ l Taq-Polymerase
35,5 μ l H₂O

ALLGEMEINE METHODEN

Anzucht von Bakterien

E. coli Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher aus einer Glycerol-Langzeitkultur oder von einer LB-Platte (ggf. mit Ampicillin) entnommen und zum Erstellen einer Übernachtskultur in 5ml LB-Amp-Flüssigmedium im sterilen Glasröhrchen angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt. Zur Anzucht größerer Volumina wurde entsprechend mehr in Erlenmeyer-Kolben angesetzt. Die meisten *E. coli* Stämme erreichen so über Nacht ihre stationäre Wachstumsphase. Bakterienkulturen können bei 4°C einige Tage aufbewahrt werden.

LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefextrakt; 0,5% NaCl; 0,1% 1N NaOH (bei Festmedium 1,5% Agar); bei Selektivmedium: Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin

Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen und transformierten Bakterien wurden Glycerol-Langzeitkulturen angelegt. Dazu wurde zu einer Bakterienkulturprobe zu einer Endkonzentration von 15% Glycerol zugegeben. Diese wurden dann bei -80°C eingefroren.

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation)

Miniprep-Kit (Qiagen)

Aus 3-5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml) überführt und in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer 1 (P1, Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 und vorsichtigem Drehen wurde 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben und erneut vorsichtig gedreht. Danach wurde bei 13.000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig entnommen und in eine QIAprep-Säule mit Auffanggefäß überführt. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses erfolgt ein Waschschriff mit 0,75 ml Puffer PE. Nach einer

Trockenzentrifugation wurde die Säule in ein sauberes Eppendorfgefäß gesetzt und mit 30 µl H₂O_{Bidest} nach einer Wartezeit von 3 min durch 1 min Zentrifugation eluiert.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden wässrige DNA-Lösungen spektralphotometrisch untersucht. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei der Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm, entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA. Aromatische Aminosäuren und Phenole besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 280 nm bestimmt, kann der Grad der Verunreinigung durch Proteine und Phenole abgeschätzt werden. Das Verhältnis E_{260}/E_{280} liegt für reine DNA bei 1,8.

Zusätzlich kann über die Fluoreszenz von gebundenem Ethidiumbromid eine Konzentrationsabschätzung gemacht werden, indem die Fluoreszenzintensität der DNA-Fragment-Bande auf dem Agarosegel mit den entsprechenden Banden des Längenstandards verglichen wird.

Aufbewahrung der DNA

Wässrige Plasmid-DNA wurde bei -20°C eingefroren gelagert.

Restriktionsenzyme und Restriktionsspaltung

Für die Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde in der Regel 0,2 µg bis 2 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 5 U Restriktionsenzym und der vom Hersteller empfohlenen Menge Reaktionspuffer wurde mit Bidest auf ein Endvolumen von 10 bis 50 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden bei 37°C bzw. 25°C für 1 h inkubiert, um eine vollständige Spaltung der Plasmid-DNA zu erreichen.

Auffüllen überhängender 5'-Enden

Das Auffüllen geschnittener Plasmid-DNA mit zusätzlichen Nukleotiden durch das Klenow-Enzym wurde durchgeführt, um eine Leserasterverschiebung oder das Zerstören von Restriktionsschnittstellen zu vermeiden. Dazu wurden überstehende

5'-Enden (sticky) mit der Klenow-Untereinheit der E. coli-Polymerase I aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 100 µl, bestehend aus 3-10 µg geschnittener Plasmid-DNA, 4 µl 25 mM Nukleotid-Mix und 1 µl Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde 3 min bei 37°C und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Aufreinigung über eine Säule konnte das Plasmid religiert werden.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit 1%-igen Agarosegelen kann eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,5-5 kb erreicht werden. Es wurde 1% Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und vor dem Gießen Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Die Agaroselösung wurde in die Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden durch Zugabe von 1/6 Volumen Probenpuffer in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung je nach Gelgröße zwischen 80 und 150 Volt. Die DNA-Banden konnten durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 320 nm sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mittels Videosystem (Eagle Eye, Stratagene).

DNA-Standard: 1Kb Leiter (Invitrogen)

1x TAE: 40 mM Tris base; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA pH 8,0

6x Probenpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 50mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau; 50% Glycerol

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung aus einem 1%-igen Agarosegel geschnitten und mit Hilfe des Nucleo-Spin-Extract-Kits (Machery & Nagel) eluiert. Hierzu wurde das ausgeschnittene Gelstück mit entsprechender Bande gewogen, das dreifache Volumen Puffer (NT1) zugegeben und bei 50°C geschmolzen. Anschließend wurde die DNA mit den Puffern NT2 und NT3 an die Säule gebunden und gewaschen und schließlich mit entsprechendem Volumen Elutionspuffer (NE) resuspendiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls müssen der Vektor und das gewünschte DNA-Fragment miteinander verbunden werden. Dieser als Ligation bezeichnete Vorgang wird durch das Enzym Ligase katalysiert. Man unterscheidet hierbei die Ligation von klebrigen Enden (sticky end-Ligation), bei der ein kurzes Stück einzelstängiger und zueinander komplementärer DNA an den Enden zur Verfügung steht, von der Verbindung mit glatten Enden (blunt end-Ligation). Zur Verknüpfung des 3'-Hydroxylendes mit dem 5'-Phosphat-Ende wurde die aus dem Phagen T4 stammende T4-DNA-Ligase eingesetzt.

Um den Einbau des Inserts in den Vektor gegenüber einer Selbstligation wahrscheinlicher zu machen, wurde unter Berücksichtigung der Größe des Vektors bzw. des Inserts, ein Vektor: Insert – Verhältnis zwischen 1:1 und 1:100 im Reaktionsansatz gewählt. Die eingesetzte DNA-Menge lag im Bereich zwischen 50 ng und 300 ng. Die DNA wurde vor der Ligation 5 min bei 65°C inkubiert, um die Wasserstoffbrücken zwischen den kohäsiven Enden zu lösen. Es wurden 4 µl Ligasepuffer zugegeben und mit H₂O_{Bidest} auf ein Endvolumen von 18 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 2µl T4-DNA-Ligase (1U/ µl) zugegeben und mindestens 16 h bei 16°C inkubiert.

Herstellung elektrokompetenter Bakterien

1l 2x YT-Flüssigmedium wurde mit einer Übernachtskultur von 3ml angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 3500 rpm 0°C pelletiert. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis statt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet durch Zugabe von insgesamt 1l eiskaltem Wasser in 50 bis 100 ml Schritten vorsichtig resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (15 min; 3500 rpm; 0°C), der Überstand dekantiert und das Pellet in 500 ml Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen, vorsichtig dekantiert und das Pellet in 40 ml eiskaltem 10%-igen Glycerol aufgenommen, Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 5800 rpm, 0°C) wurde der Überstand

dekantiert und das Pellet in 2 ml 10%-igem Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation elektrokompeter Bakterien durch Elektroporation

Pro Transformationsansatz wurde ein 40 µl Aliquot kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-5 µg DNA wurden die Bakterien für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,8kV und einer Kapazität von 25 µF am Elektroporationsgerät. Anschließend wurden die transformierten Zellen in 800 µl LB-Medium resuspendiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB/ Amp-Platten (10 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

RNA-Isolation (total RNA/ mRNA)

Für 400 µg totale RNA:

- 40 ml Hefekultur bis OD600 = 1,7 wachsen lassen
- Zentrifugieren
- Pellet in flüssigem Stickstoff zermörsern
- 12 ml peqGOLD RNA Pure™ (peqlab) zugeben
- Vortexen
- 5 min RT
- 2,4 ml Chloroform zugeben
- 15 sec kräftig schütteln
- 10 min RT
- Zentrifugieren 5 min 12 000 rpm RT
- Wässrige Phase in frisches Röhrchen geben
- 6 ml Isopropanol zugeben
- Zentrifugieren 12 000 rpm 4°C

- Überstand abziehen
 - Pellet 2x mit 75% EtOH durch vortexen waschen
 - Zentrifugieren 5 min 7500 rpm 4°C
 - Pellet trocknen
 - In 250 µl RNase-freien H₂O lösen
 - Nano-Drop-Konzentrationsmessung und Gelkontrolle
-
- 400 µg RNA in 250 µl RNase-freien H₂O
 - Nach Protokoll mit mRNA-Reinigungskit (MicroPoly(A)Purist™; Ambion)
 - Nano-Drop-Konzentrationsmessung und Gelkontrolle

1% MOPS-RNA-Gel:

- 0,5 g Agarose in 50 ml 1x MOPS aufkochen
- Gelkammer 10 min in RNase ZAP (Sigma) inkubieren
- Mit autoklaviertem H₂O spülen
- 500 ng RNA + 3 µl Ladebuffer (Sigma R-4268) + 3 µl H₂O 10 min auf Eis

20x MOPS-Puffer: 400 mM MOPS, 100mM NaAc, 10 mM EDTA mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Anzucht von Hefen

Aus Glycerol-Langzeitkulturen wurden durch Entnahme mit einem sterilen Zahnstocher Hefe-Zellen auf YPD-Platten bzw. auf selektive SD-Platten ausgestrichen. Die Hefen wurden im Brutschrank bei 30°C ca. zwei Tage inkubiert, bis einzelne Kolonien erkennbar waren. Die Platten konnten bei 4°C ca. vier Wochen aufbewahrt werden. Zum Erstellen von Übernachtkulturen wurden 3-5 ml YPD- oder SD- Flüssigmedium in sterilen Glasröhrchen angeimpft und bei entsprechender Inkubationszeit (1-2 Tage) unter Schütteln bei 30°C inkubiert.

Lagerung von Hefen

Zur langfristigen Lagerung von Hefen wurden Glycerol-Langzeitkulturen angelegt. Hierzu wurden die Hefen in 20% Glycerol bei -80°C eingefroren.

Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe

Aus 3-5 ml Übernachtkultur in SD-Medium wurden die Hefezellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet. Das Pellet wurde in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Dazu wurden 50-100 µl Glasperlen (Sigma G-8772) zugegeben und 10 min gevortext. Alle weiteren Schritte stimmen mit dem Miniprep-Protokoll (Qiagen) überein (siehe Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien).

Transformation bzw. Rekombination

Um eine Transformation bzw. Rekombination in Hefe durchzuführen, musste die Hefe zuerst aufnahmefähig gemacht werden. Dazu wurde der entsprechende Hefestamm (a oder α) in 50 ml Vollmedium (YEPD) für eine Übernachtkultur (Minimum 15 h; Maximum 24 h) bei 30°C angeimpft. Die Kultur wurde dann bei 3500 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Pellet wurde in 2 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in einem Totalvolumen von 1,8 ml (inklusive Hefe) 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen.

Transformationsansatz:

2 ml	96 PEG
262 µl	DMSO
180 µl	Hefezellen (kompetent)

Rekombinatioansatz:

2 ml	96 PEG
58 µl	ssDNA (gekocht)
5 µl	Linearisierter Vektor (125 ng)
262 µl	DMSO
180 µl	Hefezellen (kompetent)

Aus diesen Ansätzen werden jeweils 245 µl zu jeweils 2-3 µl Miniprep-DNA (Transformation) bzw. rePCR-Produkt (Rekombination) gegeben und für 4 min gevortext. Anschließend wird für 30 min bei 42°C inkubiert. Danach werden die Hefen durch Zentrifugation pelletiert und entsprechend nach Stamm auf –Leucin (a Stamm) oder –Tryptophan (α Stamm) Medium ausplattiert. Die Platten werden 1-3 Tage bei 30°C inkubiert bis einzelne Kolonien sichtbar sind.

96 PEG (100ml): 45,6 g PEG (Sigma P3640); 6,1 ml 2 M Lithiumacetat; 1,14 ml 1M Tris pH 7.5; 232 µl 0,5 M EDTA

Homologe Rekombination in genomische DNA in Hefe

- 5 ml α- Stamm in YEPD-Übernachtskultur
- 5 ml ÜK in 100 ml YEPD (10 Ansätze!)
- OD 0,6-0,9
- zentrifugieren 3500 rpm 5 min
- mit H₂O waschen
- zentrifugieren 3500 rpm 5 min
- 1x LiAcetat (0,1 M) 1 ml
- aliquot 100 µl in Eppis
- zentrifugieren Überstand verwerfen
- zum Pellet:
 - + 240 µl 50 % PEG
 - + 36 µl 10x LiAcetat (1 M)
 - + 10 µl ssDNA (gekocht)
 - + 50 µl PCR- Produkt (plus Negativkontrolle! ohne PCR- Produkt)
- vortex

- 30°C 30 min
- 42°C 20 min
- zentrifugieren Überstand verwerfen
- + YEPD 30°C 1 Stunde (nur bei Genitacin)
- ausplattieren auf YEPD- Genitacin (200 mg/l) Platten (2-4 Tage)
- wenn positive Kolonien sichtbar noch mal auf frische Platten ausplattieren
- in 10 ml YEPD animpfen für Präparation der genomischen DNA

Isolation genomische DNA aus Hefe

- 1,3 ml Hefe-Übernachtskultur bei 3500 rpm für 3 min abzentrifugieren
- Pellet waschen in 1 ml H₂O; 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- 0,2 ml Lysepuffer, 0,2 ml Phenol und 0,3 g Glas Beads (Sigma G-9268) zu den Zellen geben
- 3 min vortexen
- 200 µl TE zugeben, mischen und 5 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- 400 µl Chloroform/ Isoamylalkohol in Eppendorfgefäße vorlegen
- Den Überstand (wässrige Phase) dazu geben, mischen
- 5 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- 800 µl Ethanol in Eppendorfgefäße vorlegen
- Den Überstand (wässrige Phase) zugeben, mischen
- Zentrifugieren 15 min 13000 rpm
- Überstand abnehmen
- Pellet mit 1 ml 70% EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 50 µl TE aufnehmen

Lysepuffer : 1% SDS ; 2% Triton-X-100 ; 0,1 M NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1mM EDTA

TE-Puffer : Tris-EDTA pH 7,6

Hefe-Proteinextrakte

- 4 ml Hefe-Übernachtskultur in YEPD bei 3500 rpm für 5 min zentrifugieren
- Zellen mit H₂O waschen

- Resuspendieren der Zellen in 200 µl 2x Protein-Probepuffer
 - 3 min 95°C
 - 45 sec vortexen
 - Sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren
 - 5 µl auf SDS-Gel laden oder bei -70°C einfrieren
- } 4x wiederholen

Probenpuffer (2x): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 20% SDS; 87% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE lagert sich das SDS (Sodiumdodecylsulfat) reversibel an die Proteine und verleiht allen Proteinen eine negative Ladung, so dass die Auftrennung der Proteine hauptsächlich nach der Größe erfolgt. Die Trennung läuft unter diskontinuierlichen Bedingungen, was das Puffersystem betrifft, ab. In der oberen Schicht des Gels befindet sich das weitporige Sammelgel, wo die Proteine konzentriert werden. Anschließend folgt das kleinporige Trenngel, wo die Trennung nach der Größe erfolgt, gekoppelt mit einer Schärfung der Proteinzonen. Die Porenweite des Gels wird bestimmt durch den Anteil an Acrylamid und Bis-Acrylamid, das als Crosslinker fungiert. TEMED wirkt als Katalysator für die Gelbildung. Für die Molekulargewichtsbestimmung der verschiedenen Proteine lässt man Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht mitlaufen. Vor dem Gelauftrag werden die Proteinproben 3 min bei 100°C erhitzt. Der Gellauf erfolgte entweder für ca. 5h bei einer konstanten Spannung von 220 Volt oder über Nacht bei einer konstanten Spannung von 50-70 Volt.

12% Gel Ansatz:

Trenngel:

5 ml	H ₂ O
3,8 ml	1,5 M Tris pH 8,8
75 µl	20% SDS
6 ml	30% Acrylamidlösung
75 µl	20% APS
20 µl	TEMED

Sammelgel:

5,8 ml	H ₂ O
1 ml	1M Tris pH 6,8
40 µl	20% SDS
1,2 ml	30% Acrylamidlösung
40 µl	20% APS
15 µl	TEMED

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker: Low Range (161-0304; BIO-RAD)

2x Probenpuffer: 2% SDS; 10% Glycerol; 60 mM Tris pH 6,8; 0,001% Bromphenolblau; 100 mM DTT

10x SDS-Laufpuffer: 0,5 M Tris; 2M Glycin; 1% SDS

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel je 20 min in Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Gelrockner 2h bei 70°C getrocknet.

Färbelösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 10% Essigsäure

Entfärbelösung: 10% Essigsäure; 30% Methanol;

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bradford-Methode wird die Bindung des Farbstoffs Coomassie an Proteine photometrisch bei 595 nm gemessen. Die Intensität der Blaufärbung ist proportional zum Proteingehalt in der Lösung. Um aus der gemessenen Extinktion die Proteinmenge ermitteln zu können, wird eine Eichgerade mit verschiedenen BSA-Mengen erstellt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden die Aliquots der zu analysierenden Proben bzw. die verschiedenen BSA-Standards für die Eichkurve mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionmessung bei 595 nm:

BSA-Standard (10 mg/ml): 1:10 verdünnt und daraus verschiedene Mengen für Erstellung der Eichkurve eingesetzt

Western-Blot

Nach der SDS-PAGE konnten die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Die Membran wurde vor Gebrauch in Wasser gelegt und anschließend mit Transfer-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde ebenfalls mit Transfer-Puffer gespült und auf die Membran gelegt. Jeweils drei Lagen in Transfer-Puffer getränktes Whatman-Papier wurden unter und über das Gel mit Membran gelegt, so dass die Membran auf der Anodenseite lag. Der Transfer der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem Semi-Dry-Blotgerät. Der Blot erfolgte bei ca. 1h bei 250mA je nach Membran (cm^2 Membran $\times 1$, 8 mA/ cm^2). Die Qualität des

Transfers konnte anschließend durch Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Die Membran konnte dann für immunologische Nachweise der Proteine verwendet werden. Dazu wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 30 min in Blockpuffer geschüttelt und anschließend für 1-2 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 10 ml Blockpuffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal in Blockpuffer gewaschen und dann 45 min mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 10 ml Blockpuffer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit Blockpuffer wurde die Membran in PBS gewaschen. Zur Detektion der nachzuweisenden Proteine wurde hier aufgrund des Sekundärantikörpers (Meerrettichperoxidase-konjugiert) die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2ml pro dm² Membranfläche) benetzt. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf der Membran ein Röntgenfilm exponiert.

10x Western Puffer: 0,4M Tris base; 2M Gycin; 1% SDS

Transfer-Puffer: 192 mM Gycin; 20 mM Tris; 0,01% SDS; 20% Methanol

Blockpuffer: 4% Milchpulver; 0,5% Tween 20; in PBS

Ponceau-S-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Zum Feststellen, ob der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgreich war, kann die Nitrozellulose-Membran für ca. 10 min in Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und danach mit Wasser abgewaschen werden, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden.

Ponceau-S-Lösung: 40% Methanol; 15% Essigsäure; 0,25% Ponceau-S

ERGEBNISSE

Grundlage für diese Arbeit sind die Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit, in der ich die Interaktion der FF-Domänenregion des *Saccharomyces cerevisiae* Spleißfaktors Prp40, selbst auch U1snRNP-assoziiert, mit den U1snRNP-Proteinen Snu71 und Luc7 mittels Yeast-2-Hybrid- Experimenten nachweisen konnte. Die Beziehung dieser drei Proteine innerhalb des U1snRNP, mit Schwerpunkt auf die Interaktionen, vermittelt durch die FF-Domänen von Prp40, soll in dieser Doktorarbeit näher untersucht werden.

Yeast-2-Hybrid (Y2H)- Experimente

Interaktionspartner der Prp40 FF-Region

Durch einen Y2H-Screen gegen das *Saccharomyces cerevisiae*- Genom, welcher die meisten ORFs als Gal4-Aktivierungsdomäne-Fusionen (Preys) enthält (Uetz *et al.* 2000), konnten die zwei Interaktionspartner **Snu71** und **Luc7** der FF-Domänenregion von Prp40 (Bait) identifiziert werden (Tab. 3-2). Diese wurden auch zusammen mit Prp40 in einem Komplex gefunden (Gavin *et al.* 2002; Stevens *et al.* 2002). Von beiden Proteinen wurde durch weitere Kartierungsversuche die grobe Binderegion an die FF-Domänenregion von Prp40 bestimmt. Außerdem wurden durch verschiedene FF-Domänenkonstrukte von Prp40 (Tab. 3-1) die zur Interaktion nötigen FF-Domänen bestimmt. Durch Teilung der gefundenen Interaktionspartner in verschiedene Fragmente (Tab. 3-1) konnte gezeigt werden, dass Luc7 an die erste FF-Domäne (**FF1**) von Prp40 bindet, und zwar mit einem Fragment (**Luc7 II**), das als einziges bekanntes Motiv ein coiled-coil-Motiv enthält. Snu71 zeigt mit einem Konstrukt von Prp40 eine positive Interaktion, das die FF- Domänen 1-3 (**FF1-3**) enthält, und zwar auch mit einem Fragment (**Snu71 II**), das ein coiled-coil-Motiv enthält (Tab. 3-2).

Da Y2H-Daten nicht immer hundertprozentig zuverlässig sind, was die Reproduzierbarkeit und Falsch-Positive angeht, wurden alle Versuche mehrfach

ERGEBNISSE

durchgeführt, um sicher zu gehen, dass kein Interaktionspartner durch zufällige Aktivierungsereignisse positiv erscheint.

Y2H- Konstrukte	Start (AS)	Ende (AS)	Skizze
BAITS			
Prp40 wt	1	583	
Prp40 WW1-2	1	75	
Prp40 FF1-4	129	560	
Prp40 FF1-3	129	428	
Prp40 FF1-2	129	264	
Prp40 FF2-3	196	428	
Prp40 FF3-4	351	560	
Prp40 FF1	129	201	
Prp40 FF2	196	264	
Prp40 FF3	351	428	
Prp40 FF4	487	560	
PREYS			
Snu71 wt	1	620	
Snu71 I	530	620	
Snu71 II	329	536	
Luc7 wt	1	261	
Luc7 I	1	144	
Luc7 II	93	261	

Tab. 3-1: Verwendete Y2H-Konstrukte von Prp40 als Bait und Snu71, Luc7 als Prey

Rot: WW-Domäne; Blaue Sechsecke: FF-Domäne; Grün: coiled coil-Motiv; Blaues Fünfeck: PWI-Domäne

		BAITS																						
		<i>Prp40 wt</i>	<i>Prp40 WW</i>	<i>Prp40 FF1-4</i>	<i>Prp40 FF1-3</i>	<i>Prp40 FF2-3</i>	<i>Prp40FF3-4</i>	<i>Prp40FF1-2</i>	<i>Prp40FF1</i>	<i>Prp40FF2</i>	<i>Prp40FF3</i>	<i>Prp40FF4</i>												
PREYS	Snu71 wt	S1 S2	+	+	-	-	+	+		+		-												
		E1 E2	+	+	-	-		+		+		-												
		E3 E4	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-										
		D1 D2						+	+	+		+	-	-										
		D3 D4						+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Snu71 I	S1 S2																						
		E1 E2																						
		E3 E4																						
		D1 D2							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D3 D4							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Snu71 II	S1 S2																						
		E1 E2																						
		E3 E4																						
		D1 D2							+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D3 D4							+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Luc7 wt	S1 S2	+	-	-	-	+	+																
		E1 E2	+	+	-	-		+																
		E3 E4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-										
		D1 D2								+				+				+						
		D3 D4							+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Luc7 I	S1 S2																						
		E1 E2																						
		E3 E4																						
		D1 D2							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3 D4								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Luc7 II	S1 S2																							
	E1 E2																							
	E3 E4																							
	D1 D2							+	+	-	-	-	-		+		+							
	D3 D4							+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

- | | |
|---|---|
| S Y2H-Sreen | - negative Kolonie |
| E Y2H-Einzeltest | - negative Kolonie insgesamt positiv |
| D Y2H-Kartierungstest | + positive Kolonie |
| | nicht durchgeführt |

Tab. 3-2: Zusammenfassung der Y2H-Ergebnisse von Prp40 mit Snu71 & Luc7
(Daten aus meiner Diplomarbeit 2002)

Aufgrund der gefundenen Interaktionspartner von Prp40, die beide Spleißfaktoren und U1snRNP-Proteine sind, liegt die Vermutung nahe, dass Prp40, Snu71 und Luc7 einen Subkomplex innerhalb des U1snRNP in *S. cerevisiae* über Protein-Protein-Interaktionen mit Beteiligung der FF-Domänenregion von Prp40, bilden, wie die U1snRNP-Proteine bei Mensch U1-A, U-70K und U-1C, deren Hefe-Homologe Mud1, Snp1 und Yhc1 sind (Abb. 3-1).

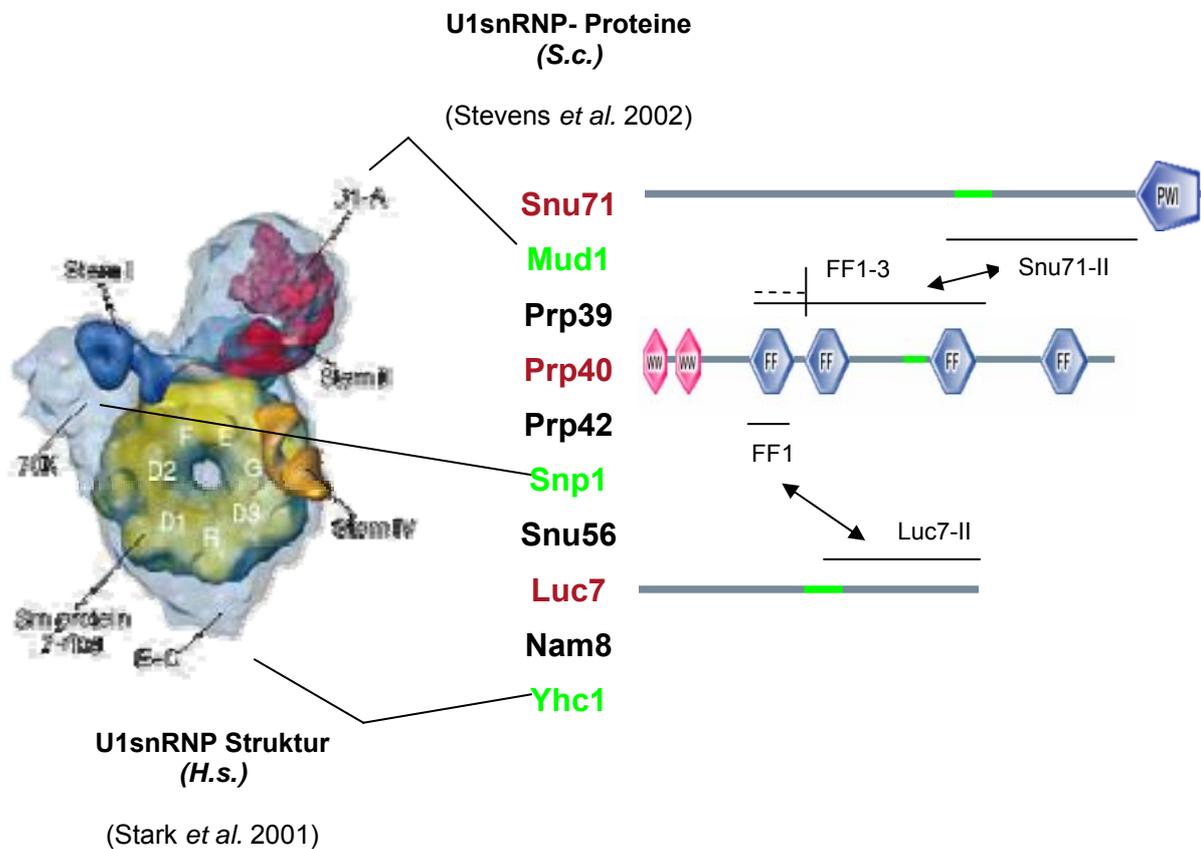


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Y2H-Interaktionen zwischen Prp40, Snu71 und Luc7

Gezeigt sind die *Saccharomyces cerevisiae* U1snRNP-Proteine mit Prp40, Snu71 & Luc7 (Stevens *et al.* 2002). FF1 interagiert mit Luc7-II, FF1-3 interagiert mit Snu71-II, wobei FF2-3 nur mit Snu71 *wt* interagiert (gestrichelte Linie); Für weitere Details zur U1snRNP-Struktur siehe Einleitung; Rot: In meiner Diplomarbeit gefundene Interaktionspartner von Prp40 mit kartierten Protein-Protein-Interaktionen; Grün: *S.c.* Homologe zu U1-A, U-70K & U-1C (*Homo sapiens* U1snRNP; Stark *et al.* 2001).

U1snRNP-Protein- Interaktionen

Um einen besseren Einblick in die Wechselwirkung innerhalb des U1snRNP-Komplexes zu bekommen, zu dem auch Prp40, Sn71 und Luc7 gehören, wurden die Interaktionen aller U1snRNP-assoziierten Proteine (Stevens *et al.* 2002) untereinander in einem gesonderten Y2H-Versuch getestet. Da es vorkommen kann, dass in einem Screen nicht alle potentiellen Interaktionspartner erfasst werden, wurden alle U1snRNP-Proteine aus dem Array isoliert und auf Richtigkeit überprüft und sowohl als Bait als auch als Prey eingesetzt. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurde in Quadruplikaten getestet.

		PREYS									
		U1snRNP- Proteine									
		Luc7	Mud1	Nam8	Prp39	Prp40	Prp42	Snp1	Snu56	Snu71	Yhc1
BAITS	U1snRNP- Proteine	Luc7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mud1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nam8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Prp39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Prp40	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Prp42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Snp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Snu56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Snu71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Yhc1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 3-3: Zusammenfassung der Y2H-Ergebnisse aller U1snRNP-Protein-Interaktionen

Gezeigt sind alle U1snRNP-Proteine die im Y2H-Versuch sowohl als Bait als auch als Prey getestet wurden.

+ entspricht einer positiven Interaktion; – entspricht einer negativen Interaktion.

Allerdings konnten keine weiteren Interaktionen, außer den schon bekannten (Prp40 mit Snu71 und Luc7) gefunden werden (Tab. 3-3 & Abb. 3-2), was darauf schließen lässt, dass andere Wechselwirkungen nicht mit dem Y2H-System detektiert werden können. Möglicherweise ist für diese Interaktionen die Anwesenheit von RNA nötig.

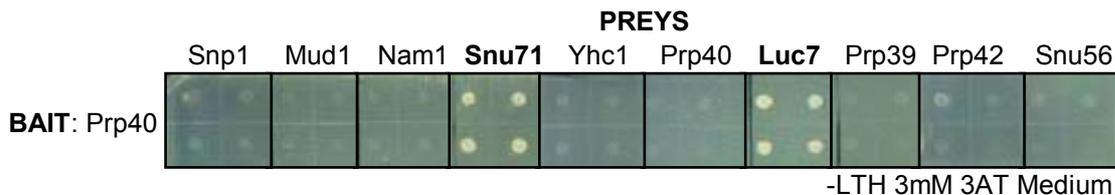


Abb. 3-2: Y2H-U1snRNP-Protein-Interaktion mit Prp40 als Bait in Quadruplikaten auf –LTH-Mangelmedium
Positive Interaktionspartner von Prp40 als Bait sind **Snu71** & **Luc7**.

***In vitro* Bindungsassay (GST- Pulldown)**

Um die Y2H-Experimente mit einer unabhängigen Methode und auch *in vitro* zu bestätigen, wurden zusätzlich *in vitro* Bindeversuche durchgeführt. Die beiden gefundenen Interaktionspartner (**Snu71** und **Luc7**) wurden in voller Länge *in vitro* translatiert und gleichzeitig mit ³⁵S-Methionin markiert, um dann auf Interaktion mit verschiedenen in *E. coli* exprimierten GST-Prp40FF-Konstrukten getestet zu werden, wobei das jeweilige GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und die Bindung zu den Interaktionspartnern mit Autoradiographie detektiert wurde. Zu bemerken ist, dass die Konstrukte GST-FF3, GST-FF2-3, GST-FF1-3, GST-FF1-4 und GST-Prp40 instabil oder unlöslich waren (siehe Diplomarbeit 2002). Die Experimente wurden mehrfach und mit gleichen Mengen an GST-Fusionsprotein (10 µg) durchgeführt. Die gleichmäßige Beladung mit GST-Fusionsprotein wurde durch Coomassie-Färbung überprüft. Als Negativkontrolle diente GST alleine.

GST- Pulldown Snu71

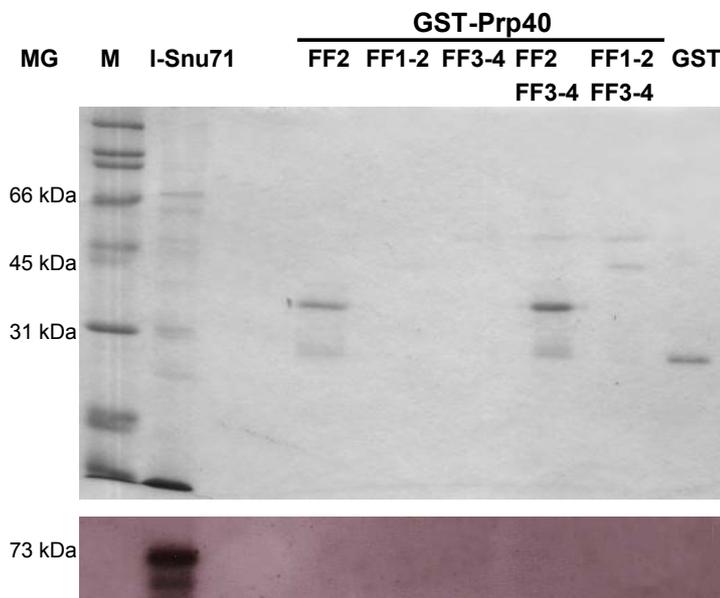


Abb. 3-3: *In vitro* Bindungsassay von Snu71 mit GST-Prp40FF-Konstrukten

Snu71 zeigt keine Bindung mit den GST-Prp40FF-Konstrukten. Obere Abbildung: Coomassie gefärbtes 12% SDS-Gel mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen einzeln (FF2; FF1-2; FF3-4) und als 1:1 Gemisch (FF2 und FF3-4; FF1-2 und FF3-4) und GST als Kontrolle; Untere Abbildung: Autoradiographie von nicht gebundenem Snu71; I = Input (1 µl *in vitro* translatiertes Protein); M = Marker; MG = Molekulargewicht.

Die GST-Pulldowns mit Snu71 blieben trotz mehrfacher Wiederholung erfolglos (Abb. 3-3). Allerdings fehlen für einen funktionierenden Pulldown vermutlich die entsprechenden GST-Fusionsproteine, denn laut Y2H-Daten sollte Snu71 nur an FF2-3 oder zumindest FF1-3 binden, die beide instabil oder unlöslich sind.

GST- Pulldown Luc7

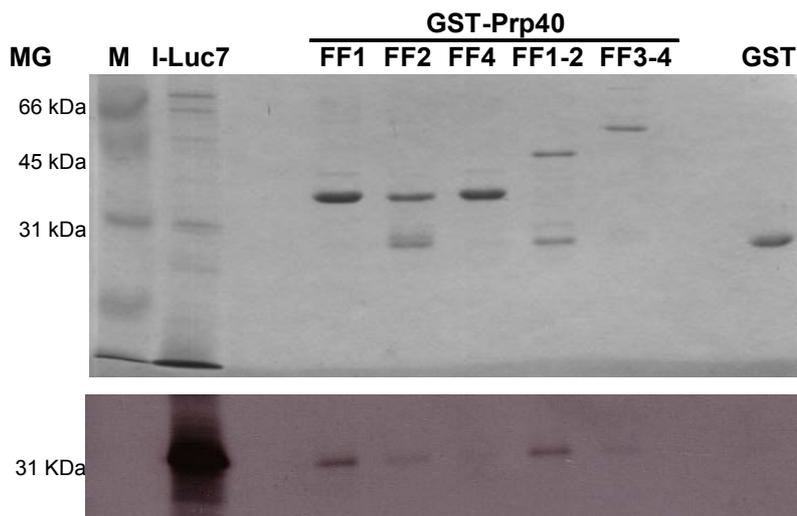


Abb. 3-4: *In vitro* Bindungsassay von Luc7 mit GST-Prp40FF-Konstrukten

Luc7 bindet an GST-FF1 und GST-FF1-2; Obere Abbildung: Coomassie gefärbtes 12% SDS-Gel mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen & GST als Kontrolle; Untere Abbildung: Autoradiographie von gebundenem Luc7; I = Input (1 μ l *in vitro* translatiertes Protein); M = Marker; MG = Molekulargewicht.

Luc7 zeigt, in Übereinstimmung mit den Y2H-Daten, erneut eine Interaktion mit der ersten FF-Domäne (**GST-FF1**) und einem GST-Fusionsprotein (**GST-FF1-2**), das die erste FF-Domäne enthält (Abb. 3-4 & Abb. 3-5). Allerdings tritt mit einem Standard-Pulldown-Protokoll, auch bei den anderen getesteten GST-FF-Konstrukte (GST-FF2; GST-FF4 und GST-FF3-4), immer ein schwaches Hintergrundsignal. Deshalb wurden die Versuchsbedingungen modifiziert (genaue Durchführung siehe Methoden), so dass die Bindung von Luc7 an FF1 und FF1-2 nachweisbar war. Die Bindung ließ sich jedoch nur sehr schwach detektieren (Abb. 3-5).

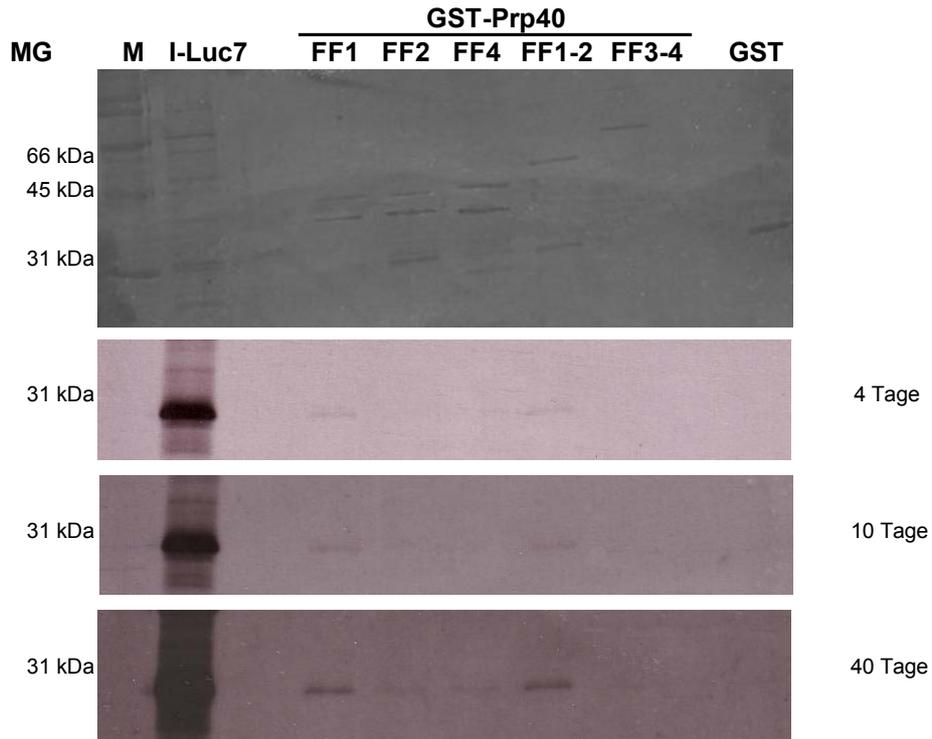


Abb. 3-5: *In vitro* Bindungsassay von Luc7 mit GST-Prp40FF-Konstrukten (modifizierte Versuchsbedingungen) Luc7 bindet an GST-FF1 und GST-FF1-2; Obere Abbildung: Coomassie gefärbtes 12% SDS-Gel mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen & GST als Kontrolle; Unteren Abbildungen: Autoradiographie von gebundenem Luc7 in verschiedenen Exponatstadien (4, 10 & 40 Tage); I = Input (1 μ l *in vitro* translatiertes Protein); M = Marker; MG = Molekulargewicht.

Kompetitions-Versuch

Aufgrund der Peptidarray-Versuche wurde ein 26mer Peptid mit der Sequenz LSRLDTRRLADHFLGKIHLGYVKMR synthetisch hergestellt (NMI; Reutlingen), das in einem GST-Pulldown mit *in vitro* translatiertem Luc7 und GST-FF1-2, bei Zugabe im Überschuss, die Bindung zu Luc7 unterbinden sollte. Dieses Peptid enthält die Bindesequenz im C-Terminus von Luc7 (siehe Abb. 3-13).

ERGEBNISSE

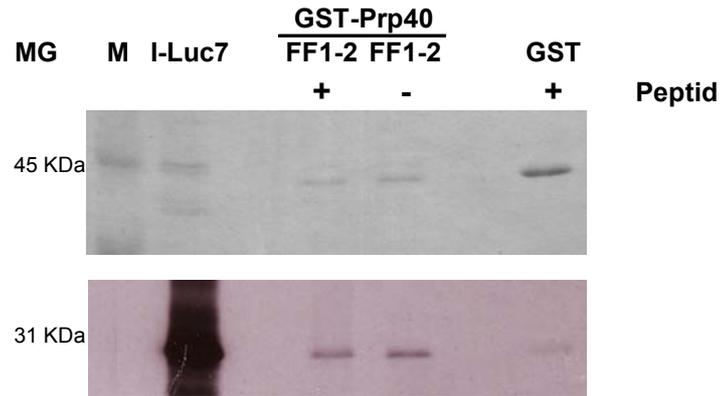


Abb. 3-6: *In vitro* Bindungsassay von Luc7 mit GST-Prp40FF1-2 im Wettbewerbsversuch

Das zugegebene Peptid beeinflusst die Bindung von Luc7 zu FF1-2 nicht; Obere Abbildung: Coomassie gefärbtes 12% SDS-Gel mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen und GST als Kontrolle; Untere Abbildung: Autoradiographie von gebundenem Luc7; I = Input (1 μ l *in vitro* translatiertes Protein); M = Marker; MG = Molekulargewicht; + Zugabe von Peptid mit der Sequenz LSRLDTRRLADHFLGKIHLGYVKMR (Konzentration 300 μ M).

Jedoch konnte kein Unterschied bei der Bindung zwischen GST-FF1-2 und Luc7 mit und ohne Zugabe von Peptid festgestellt werden (Abb.3-6).

Peptidarrays

Ein Teil meiner Doktorarbeit bestand darin, die Peptidarray-Methode zu etablieren, so dass diese jetzt für das gesamte Institut zur Verfügung steht. Mit dieser Methode kann die genaue Interaktionsregion auf Aminosäure-Ebene in einem Protein bestimmt werden (Frank *et al.* 1992 & 2002; Kramer *et al.* 1999; Landgraf *et al.* 2004).

Snu71- und Luc7- Interaktionsregion

Aus den Y2H-Tests sind Snu71 und Luc7 eindeutig als Interaktionspartner von Prp40 bestimmt worden. Um diese Ergebnisse mit einer weiteren *in vitro* Methode zu bestätigen, wurden Peptidarrays hergestellt. Außerdem sollte die zuvor in den Y2H-Deletionsexperimenten grob bestimmte Binderegion der Interaktionspartner genauer analysiert werden. Dazu wurden zunächst in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Rudolf Volkmer-Engert in Berlin die im Y2H-Deletionsversuch positiv getesteten Fragmente Snu71-II und Luc7-II (siehe Tab. 3-1 und Tab. 3-2) in überlappenden Peptiden (20mere mit 3AS-Verschiebung) auf eine Membran (CAPE-Membran) synthetisiert (Peptidspotter ASP222; Abimed). Da von der FF-Domäne bekannt ist an die phosphorylierte C-terminale Domäne der RNA Polymerase II zu binden (Morris & Greenleaf 2000; Carty *et al.* 2000), wurde jeweils ein Array mit Phospho-Serin (p) und ein Array ohne Phospho-Serin (u) hergestellt. Dies sollte zeigen, ob die Phosphorylierung bei der Interaktion der FF-Domäne eine Rolle spielt. Die Membran wurde dann mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen GST-FF1; GST-FF2; GST-FF4; GST-FF1-2 & GST-FF3-4 (siehe Tab. 3-1), sowie GST alleine als Kontrolle, inkubiert. Die Detektion der positiven Peptide erfolgte über einen HRP-gekoppelten GST-Antikörper und Chemolumineszenz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 gezeigt. Nach Herausfiltern der Spots, die auch in der GST-Kontrolle eine positive Bindung zeigten, verblieben mehrere positive Spots (Tab. 3-4), wobei besonderes Augenmerk auf in Reihe auftretende positive Peptide gelegt wurde, da diese überlappenden Peptiden entsprechen. Snu71-II lieferte mit FF2, FF1-2 und FF3-4 (mit FF1 schwach & mit FF4 nur 26) eine Peptidfolge von drei Peptiden (21-23 & 26). Dies stimmt mit den Y2H-Ergebnissen überein, bei denen die FF2-3-Konstrukte (FF1-3) and der

Interaktion beteiligt sind (siehe Tab. 3-2). Da die phosphorylierten Peptidsequenzen weniger konsistente Ergebnisse ergaben als die unphosphorylierten, wurden diese außer Acht gelassen. Snu71-I (PWI-Domäne) ergab nach Streichen der in der GST-Kontrolle positiven Spots, keine Ergebnisse. Bei Luc7-II wurden die Peptide 23, 25 & 27 mit FF1 und FF1-2 positiv getestet, was den Y2H-Ergebnissen entspricht (siehe Tab. 3-1). Allerdings wurde das Peptid 23 auch detektiert bei FF2 und FF3-4. Auch hier ergaben die phosphorylierten Peptide keine zusätzlichen Ergebnisse und wurden daher nicht berücksichtigt.

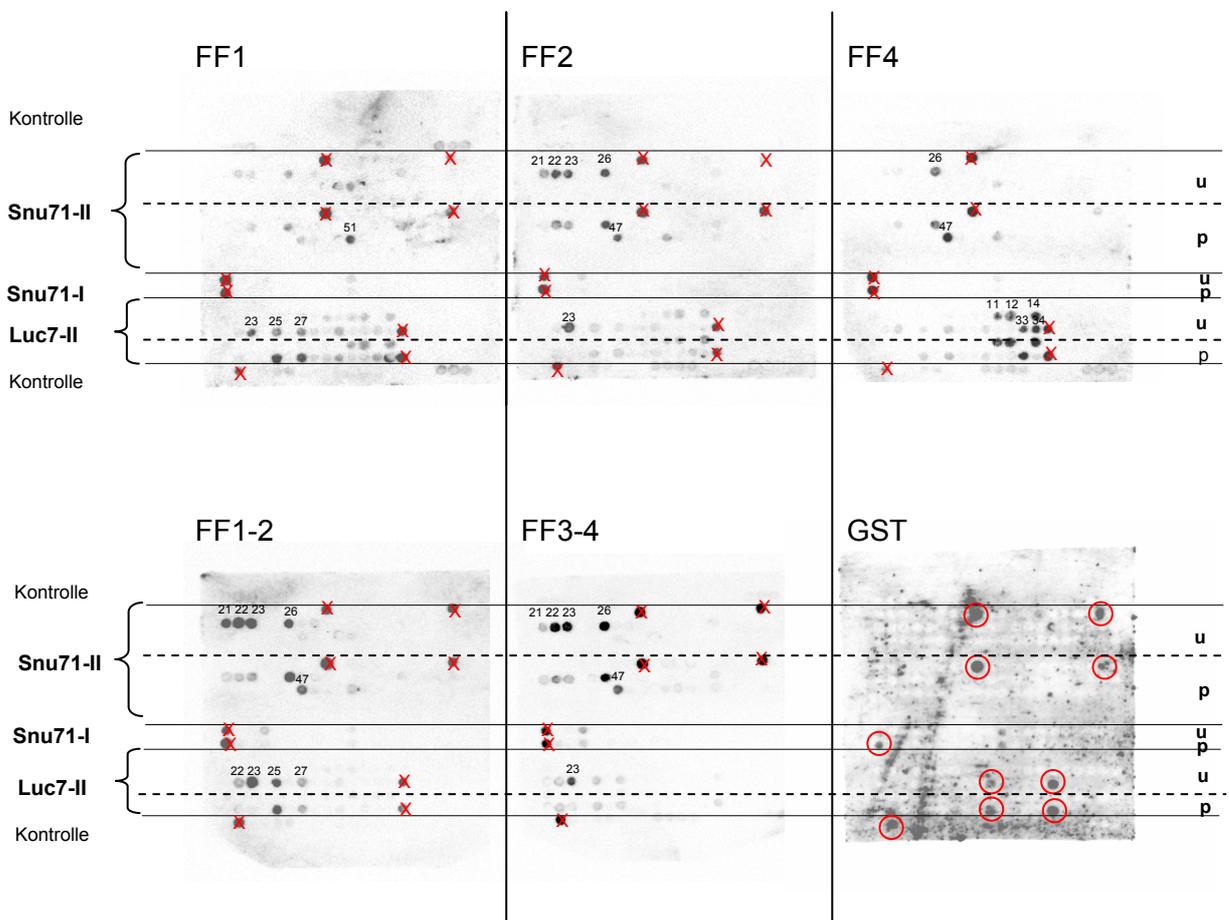


Abb. 3-7: Peptidarray-Ergebnisse für Snu71-II & Luc7-II mit verschiedenen GST-Prp40FF-Konstrukten

Peptidarrays von Snu71-II Sequenz (AS 329-536); Snu71-I Sequenz (AS 530-620) & Luc7-II Sequenz (AS 93-261) synthetisiert auf CAPE-Membran als 20mere mit 3AS-Verschiebung. Austausch von Cystein durch Serin. Sequenz der Kontrollpeptide mir unbekannt. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen (FF1; FF2; FF4; FF1-2 & FF3-4) und GST als Kontrolle. Peptidsynthese jeweils mit Serin (u) oder phospho-Serin (p). Positive Peptidinteraktionen sind mit Nummern gekennzeichnet. X = positive Peptidinteraktionen in GST-Kontrolle. Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. (Durchführung C. Landgraf; Berlin).

ERGEBNISSE

Spot	Snu71-Peptidsequenz	GST- Prp40				
		FF1	FF2	FF4	FF1-2	FF3-4
21	EKNRSLYLKELLHLANDVHY		+		+	+
22	RSLYLKELLHLANDVHYDHH		+		+	+
23	YLKELLHLANDVHYDHHRSF		+		+	+
26	NDVHYDHHRSFKEQEERDE		+	+	+	+
47	NADKNVSESEHVKIKDFDK		(+)p	(+)p	(+)p	(+)p
51	VKIKDFDKKAIDHSVESSE	(+)p				
	Luc7-Peptidsequenz					
11	LISKRKEVAKRVRNITENVG			+		
12	KRKEVAKRVRNITENVGQSA			+		
14	KRVRNITENVGQSAQQKLQV			+		
22	GAYLSRLDTRRLAD HFLGK				+	
23	LSRLDTRRLAD HFLGK IHL	+	+		+	+
25	DRRLAD HFLGK IHLGYVKMR	+			+	
27	HFLGK IHLGYVKMREDYDRL	+			+	
33	RLMKNNRRTNASKTATTLPG			+		
34	KNNRRTNASKTATTLPGRRF			+		

Tab. 3-4: Positive Peptide von Snu71 und Luc7 mit GST-Prp40FF-Konstrukten (aus Abb. 3-7)

+ zeigt positive Peptide; (+)p zeigt positive Peptide mit phospho-Serin, diese wurden weiter nicht berücksichtigt; Fett markiert sind überlappende Peptidsequenzen jeweils der Interaktionsregion von Snu71 und Luc7.

Nach den Kollaborationsversuchen wurden die Versuche von Snu71-II und Luc7-II mit Abweichungen in Membran (β -Ala-Membran anstatt CAPE), Peptidlänge (15mere anstatt 21mere) und Roboter (MULTIPEP anstatt ASP222) in unserem Labor mit GST-Prp40FF1-2 wiederholt. Zunächst wurde die Membran mit β -Alanin als Spacer (siehe Material & Methoden) hergestellt. Darauf wurden die Peptide von Snu71-II und Luc7-II als 15mere mit 3AS-Verschiebung synthetisiert. Nach Inkubation mit GST-Prp40FF1-2 und Detektion mit anti-GST-HRP ergaben sich für Snu71-II die in Abbildung 3-8 gezeigten Peptide. Als Kontroll-Spot wurde ein Peptid (QRALAKDLIVPRRP) mitgespottet, das an den GST-Antikörper bindet (C17 & C19). Bei Vergleich mit den Peptidarray-Ergebnissen aus Berlin, entsprechen die positiven Spots ungefähr der dort detektierten Interaktionsregion (Snu71-II: NDVHY & Luc7-II: HFLGK siehe Tab. 3-4).

ERGEBNISSE

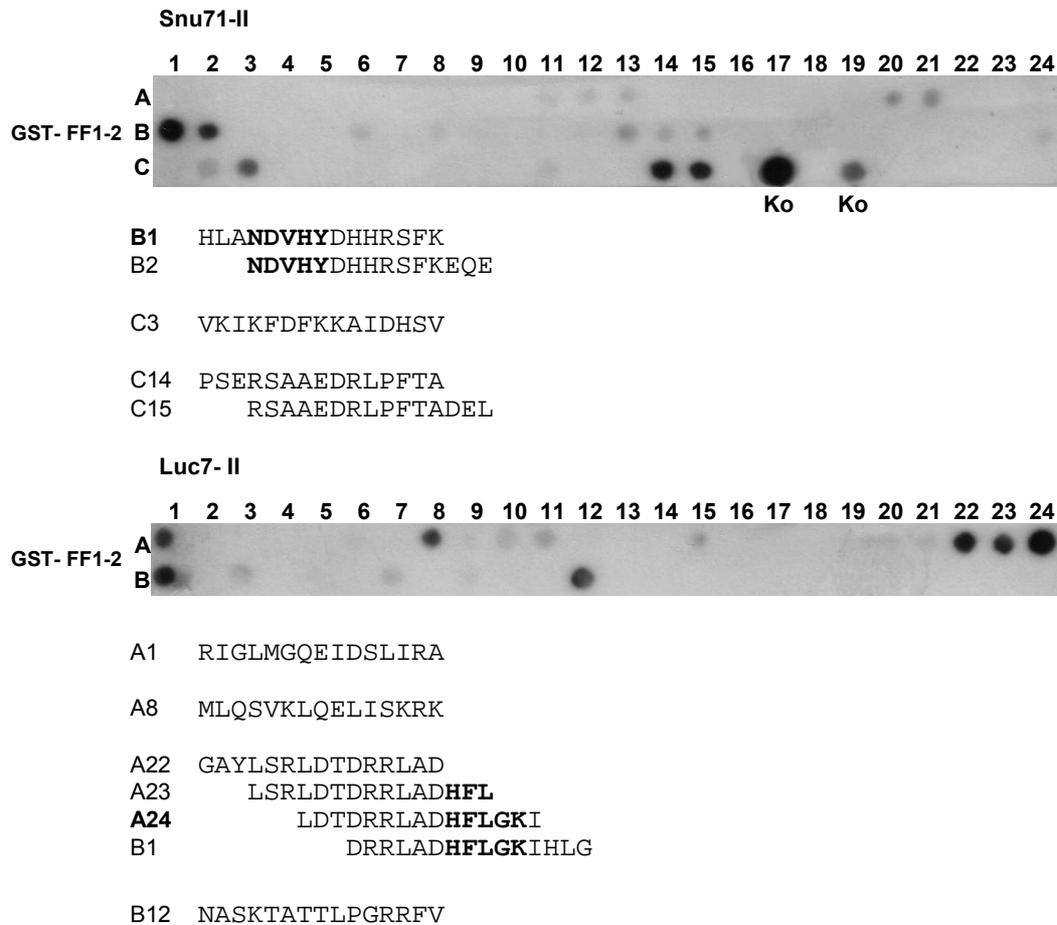


Abb. 3-8 : Peptidarray Snu71-II & Luc7-II mit GST-Prp40 FF1-2

Peptidarrays von Snu71-II Sequenz (AS329-536) & Luc7-II Sequenz (AS93-261) synthetisiert auf β -Ala-Membran als 15mere mit 3AS-Verschiebung. Kontrollpeptid (Ko = QRALAKDLIVPRRP). Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST- FF1-2). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz . B1 und A24 als jeweils stärkste Spots; Fett markiert überlappende Regionen mit vorherigen Tests (Abb. 3-7 und Tab. 3-4).

Zur Etablierung der Methode wurden verschiedene Membranen (β -Ala- & PEG-Membranen) im Vergleich getestet. Letztendlich wurden die meisten Versuche mit den kommerziell erwerbbaaren PEG-Membranen (PEG als Spacer) von INTAVIS durchgeführt.

Als nächstes wurde die ganze Aminosäuresequenz von Luc7 als 15mere in einer 3AS-Verschiebung auf eine PEG-Membran synthetisiert und mit den vorhandenen GST-Prp40FF-Fusionsproteinen getrennt inkubiert. Als Negativkontrolle diente GST allein (Abb. 3-9).

ERGEBNISSE

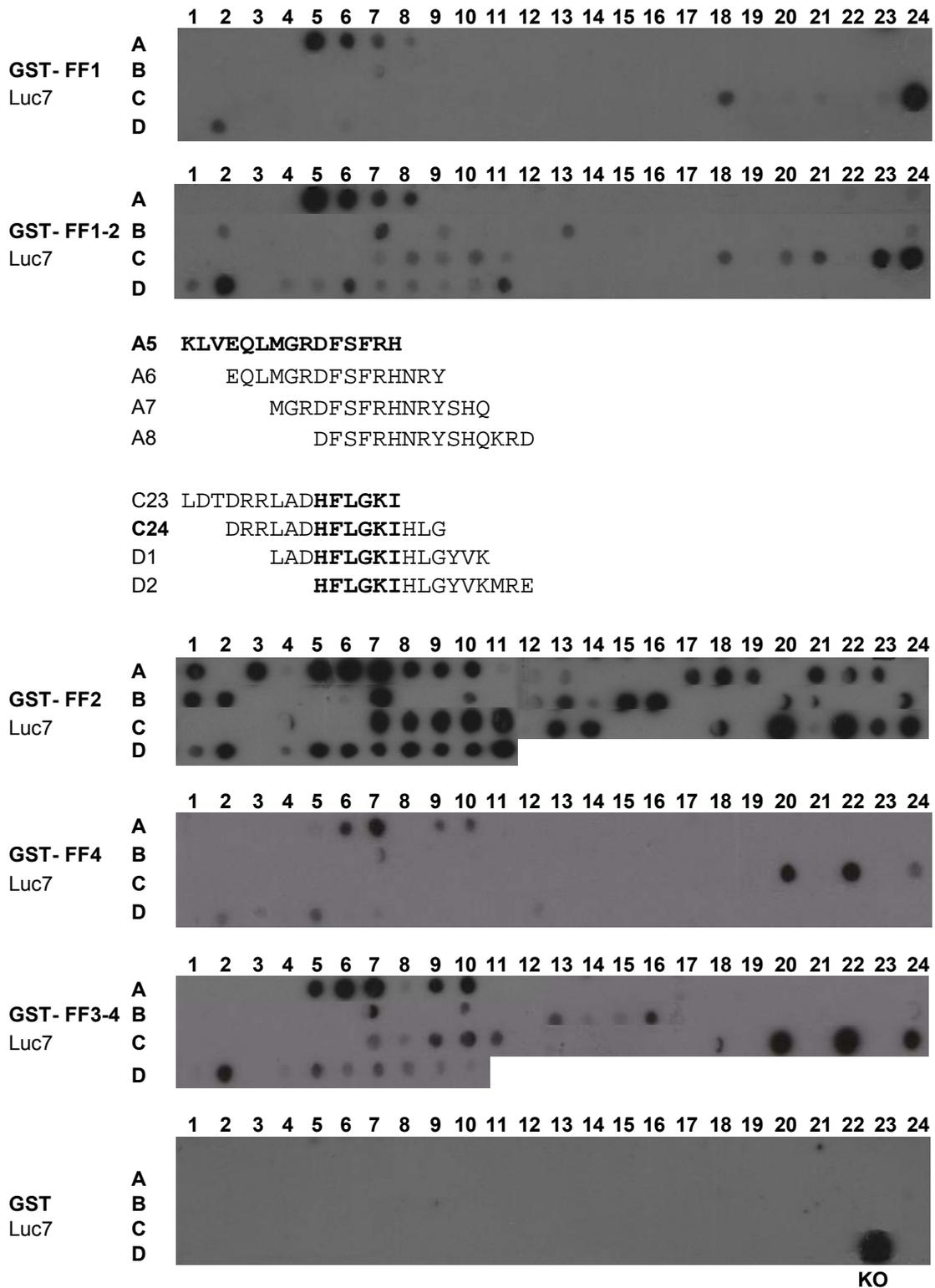


Abb. 3-9: Peptidarray Luc7 mit GST-Prp40FF-Konstrukten

Peptidarrays Luc7 Sequenz (AS1-261) synthetisiert auf PEG-Membran als 15mere mit 3AS-Verschiebung. Kontrollpeptide (Ko = QRALAKDLIVPRRP). Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen (GST-FF1; GST-FF2; GST-FF4; GST-FF1-2 & GST-FF3-4) und GST als Kontrolle. Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. A5 und C24 als jeweils stärkste Spots markiert. Fett markiert überlappende Peptide. Alle positiven Peptide sind in Tabelle 3-5 gezeigt.

ERGEBNISSE

Spot	Luc7-Peptidsequenzen	GST- Prp40				
		FF1	FF2	FF4	FF1-2	FF3-4
A1	MSTMSTPAAEQRLV		++			
A3	PAAEQRLVEQLMGR		++			
A5	KLVEQLMGRDFSFRH	++	+++		+++	++
A6	EQLMGRDFSFRHNRY	+	+++	+	++	++
A7	MGRDFSFRHNRYSHQ	+	+++	++	++	++
A8	DFSFRHNRYSHQKRD	(+)	++		+	
A9	FRHNRYSHQKRDGL		++	(+)		++
A10	NRYSHQKRDGLHDP		++	(+)		++
A17	(LVGECPYDLFQGTKQ)		(++)C			
A18	(ECPYDLFQGTKQSLG)		(++)C			
A19	(YDLFQGTKQSLGKCP)		(++)C			
A21	(TKQSLGKCPQMHLTK)		(+)C			
A22	(SLGKCPQMHLTKHKI)		(+)C			
A23	(KCPQMHLTKHKIQYE)		(+)C			
B1	LTKHKIQYEREVKQG		++			
B2	HKIQYEREVKQGKTF		++		(+)	
B7	PEFEREYLAILSRFV		+++		++	(+)
B10	(ILSRFVNECNGQISV)		(+)C			(+)C
B13	NGQISVALQNLKHTA		(+)		(+)	(+)
B15	ALQNLKHTAEERMKI		++			
B16	NLKHTAEERMKIQQV		++			(+)
B24	RIGLMGQEIDSLIRA		+			
C7	MLQSVKLQELISKRK		+++		(+)	(+)
C8	SVKLQELISKRKEVA		+++		(+)	(+)
C9	LQELISKRKEVAKRV		+++		(+)	(+)
C10	LISKRKEVAKRVRN		+++		(+)	(+)
C11	KRKEVAKRVRNITEN		+++		(+)	(+)
C13	KRVNITENVGQSAQ		++			
C14	RNITENVGQSAQQKL		++			
C18	(QKLQVCEVCGAYLSR)	(+C)	(+)C		(+)C	(+)C
C20	EVCGAYLSRLDTRR		+++	+	(+)	+++
C21	GAYLSRLDTRRLAD				(+)	
C22	LSRLDTRRLADHFL		+++	++		+++
C23	LDTDRRLADHFLGKI	(+)	++		++	
C24	DRRLADHFLGKIHLG	+++	++	(+)	++	++
D1	LADHFLGKIHLGYVK		+		(+)	
D2	HFLGKIHLGYVKMRE	(+)	++	(+)	++	++
D5	YVKMREDYDRMLKNN		++	(+)	(+)	(+)
D6	MREDYDRMLKNNRTT		++		(+)	(+)
D7	DYDRMLKNNRTTNAS		++		(+)	(+)
D8	RLMKNRRTTNASKTA		++		(+)	(+)
D9	KNNRRTTNASKTATTL		++		(+)	(+)
D10	RTTNASKTATTLPGR		++		(+)	(+)
D11	NASKTATTLPGRRFV		++		(+)	

Tab. 3-5: Positive Peptide Luc7 mit GST-Prp40FF-Konstrukten (aus Abb. 3-9)

+++ sehr starke Interaktion; ++ starke Interaktion; + schwache Interaktion; (+) sehr schwache Interaktion; (+)C markiert Cystein-haltige Spots (nicht gewertet); Fett markiert weiter analysierte Peptide; Gelb markiert N- und C-terminale Interaktionsregion in Luc7

Alle GST-Prp40FF-Domänenkonstrukte zeigen wieder ein ähnliches Interaktionsmuster in der Luc7-Peptidsequenz (Vergleich Tab. 3-5 mit Peptidarrays Berlin Tab. 3-4 und Abb. 3-7). Es kommen hauptsächlich zwei Interaktionsregionen vor, die in allen GST-FF-Konstrukten auftreten. Die erste Interaktionsregion liegt im N-Terminus (A5-10), die zweite, welche mit den Y2H-Ergebnissen übereinstimmen würde (Luc7-II), liegt im C-Terminus (C20-24; D1-2) und stimmt auch mit den vorherigen positiv getesteten Peptidregionen überein (Tab. 3-4 & Abb. 3-8). In der Kontrolle mit GST allein, kann keine Bindung festgestellt werden. Auffällig sind eine Reihe Cystein-haltiger positiver Peptide. Bekannter weise reagieren Cystein-haltige Peptide sowohl mit GST als auch mit Glutathion und wurden folglich nicht in der Auswertung berücksichtigt.

Aus den Y2H-Ergebnissen war bekannt, dass die Interaktion in Luc7 im C-terminalen Teil des Proteins stattfinden soll. Deshalb wurde die Region um diesen Spot (C24; stärkster Spot bei GST-FF1) näher untersucht, indem nur eine 1AS-Verschiebung vorgenommen wurde. Außerdem wurden noch Peptide als 21mere gespottet, ebenfalls mit einer 1AS-Verschiebung. Somit kann die Binderegion genauer eingegrenzt werden. Inkubiert wurde der Array mit GST-FF1 oder GST-FF1-2, da hier die deutlichsten und spezifischsten Signale für Luc7 zu erwarten waren (Abb. 3-10).

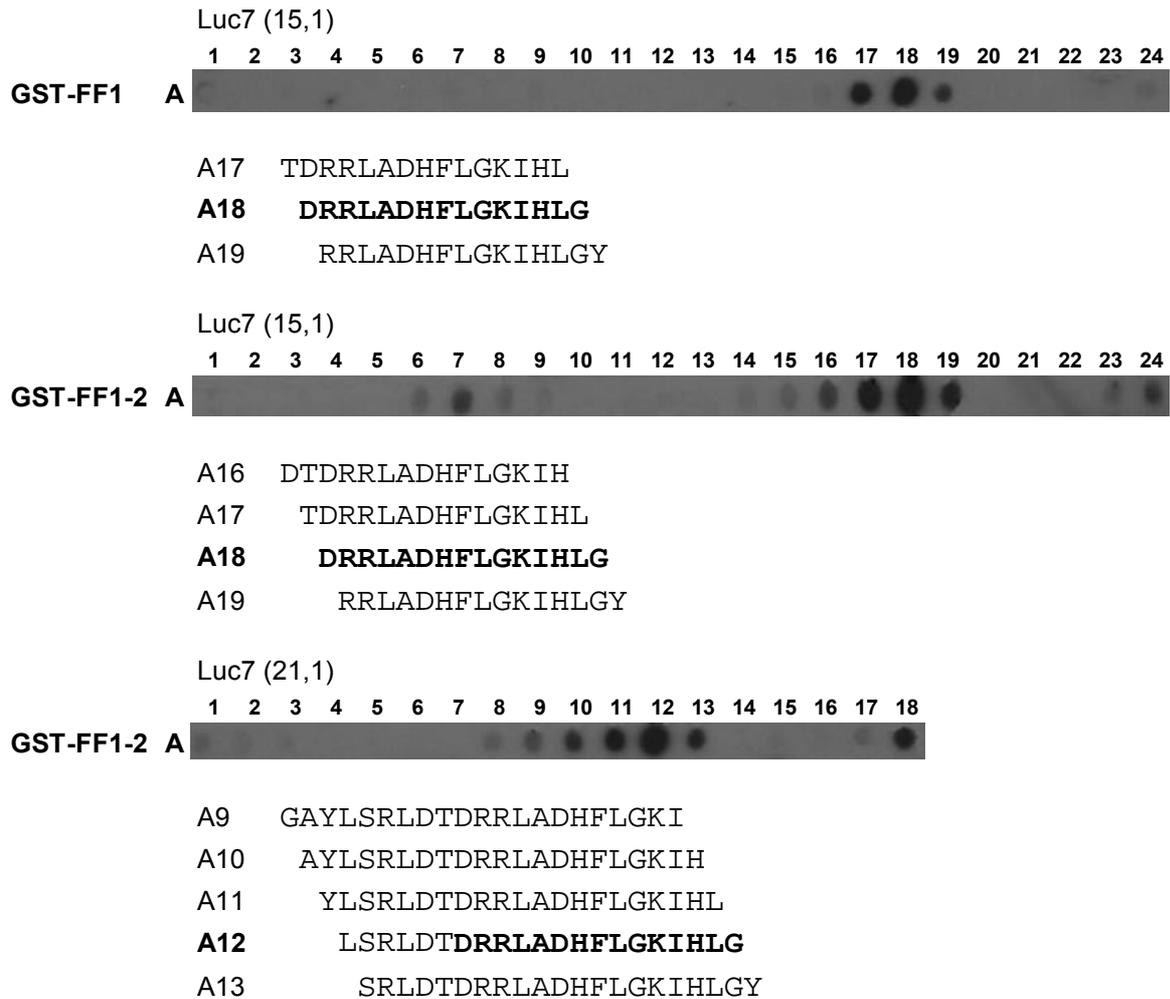


Abb. 3-10: Peptidarray Luc7 1AS Verschiebung

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz synthetisiert auf PEG-Membran als 15mere bzw. 21mere mit 1AS-Verschiebung (15,1 bzw. 21,1). Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen (GST-FF1 & GST-FF1-2). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Fett markiert jeweils stärkster Spot.

Die Peptidsequenz **DRRLADHFLGKIHLG** (A18; 15mer) beziehungsweise **LSRLDTRRLADHFLGKIHLG** (A12 als 21mer) ergibt das stärkste Signal. Außerdem überlappen die Peptide mit den in Berlin durchgeführten unabhängigen Versuchsergebnissen. Deshalb wurden diese Peptide durch Peptidarray-Mutationsanalysen genauer untersucht.

ERGEBNISSE

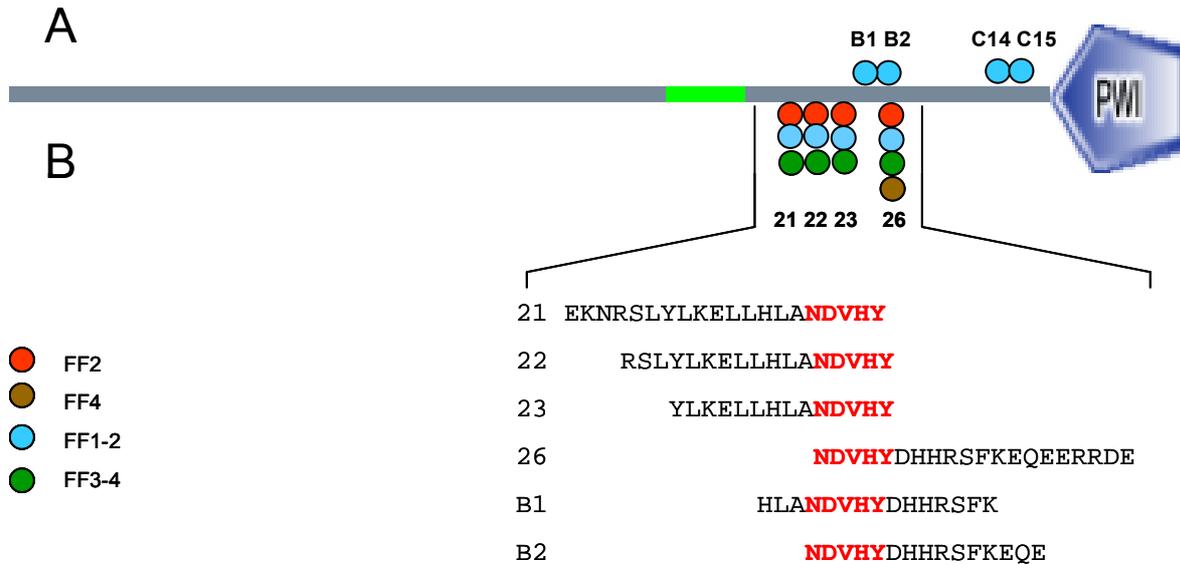


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Binderegionen in Snu71

Zusammenfassung der Ergebnisse der unabhängig durchgeführten Peptidarrays mit verschiedenen GST-Prp40FF-Konstrukten **A**) meine Durchführung mit 15meren in 3AS-Verschiebung auf β -Ala-Membran (Roboter Multiprep, INTAVIS) dargestellt in Abb. 3-8 und **B**) Kollaboration mit Rudolf Volkmer-Engert; Berlin (Durchführung C. Landgraf) mit 20meren in 3AS-Verschiebung auf CAPE-Membran (Roboter Abimed) und Austausch von Cysteinen durch Serin dargestellt in Abb. 3-7 und Tab. 3-4; Zahlen bzw. Buchstaben und Zahl geben Spotposition auf der Membran an.

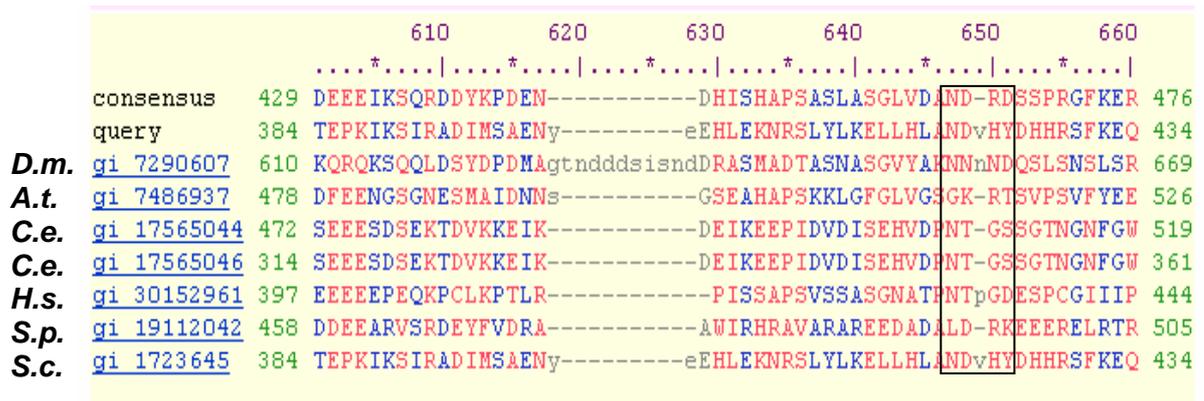


Abb. 3-12: Alignment Snu71-Interaktionsregion in verschiedenen Spezies (Ausschnitt)

D.m. Drosophila melanogaster; *A.t.* Arabidopsis thaliana; *C.e.* Caenorhabditis elegans; *H.s.* Homo sapiens; *S.p.* Schizosaccharomyces pombe; *S.c.* Saccharomyces cerevisiae; Rahmen zeigt Interaktionsregion.

ERGEBNISSE

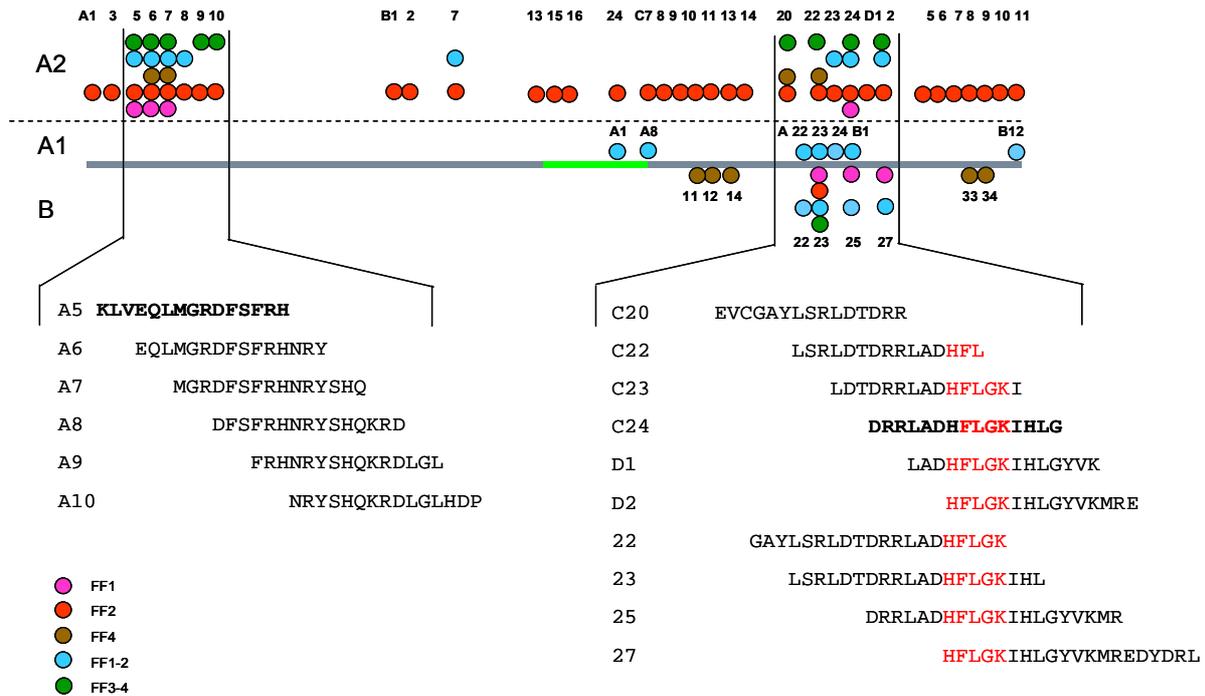


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der Binderegionen in Luc7

Zusammenfassung der Ergebnisse der unabhängig durchgeführten Peptidarrays mit verschiedenen GST-Prp40FF-Konstrukten **A)** meine Durchführung **A1)** mit 15meren in 3AS-Verschiebung auf β -Ala-Membran (Roboter Multipep, INTAVIS) dargestellt in Abb. 3-8 **A2)** mit 15meren in 3AS-Verschiebung auf PEG-Membran (Roboter Multipep, INTAVIS) dargestellt in Abb. 3-9 und Tab. 3-5 (nicht berücksichtigt wurden Cystein-haltige Spots) und **B)** Kollaboration mit Rudolf Volkmer-Engert; Berlin (Durchführung C. Landgraf) mit 20meren in 3AS-Verschiebung auf CAPE-Membran (Roboter Abimed) und Austausch von Cysteinen durch Serin dargestellt in Abb. 3-7 und Tab. 3-4; Zahlen bzw. Buchstaben und Zahl geben Spotposition auf der Membran an.

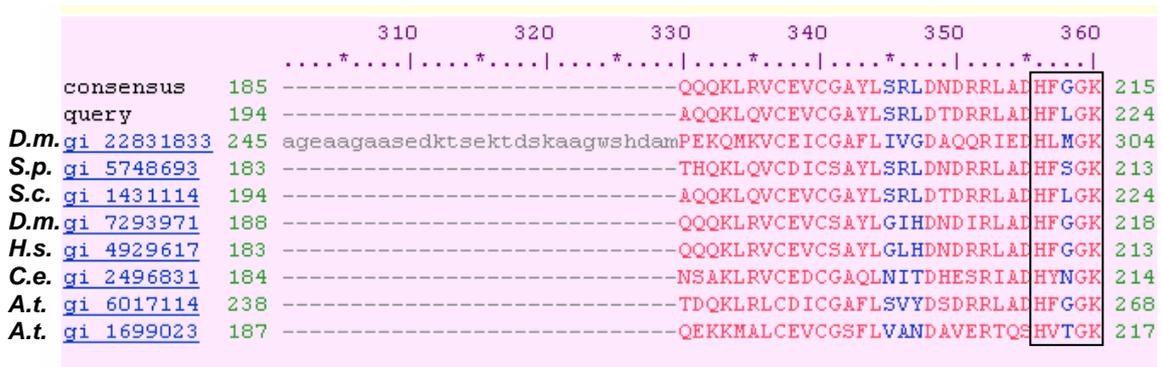


Abb. 3-14: Alignment Luc7-II-Interaktionsregion in verschiedenen Spezies (Ausschnitt) *D.m.* Drosophila melanogaster; *A.t.* Arabidopsis thaliana; *C.e.* Caenorhabditis elegans; *H.s.* Homo sapiens; *S.p.* Schizosaccharomyces pombe; *S.c.* Saccharomyces cerevisiae; Rahmen zeigt Interaktionsregion.

Luc7-Peptidarray-Mutationsanalysen

Um die Interaktion auf Aminosäure-Ebene zu bestimmen wurden Ala-Scans (Liu *et al.* 1999; Bluthner *et al.* 2000) durchgeführt, d. h. jede Aminosäure in der Peptidsequenz wird nacheinander durch Alanin ersetzt. Dabei wird deutlich welche Aminosäuren für die Bindung wirklich essentiell sind, nämlich dort, wo durch einen Aminosäure-Austausch keine Bindung mehr stattfinden kann.

Untersucht wurde vornehmlich die C-terminale Binderegion in Luc7 (Abb. 3-11), aufgrund der Y2H-Ergebnisse (Tab. 3-2).

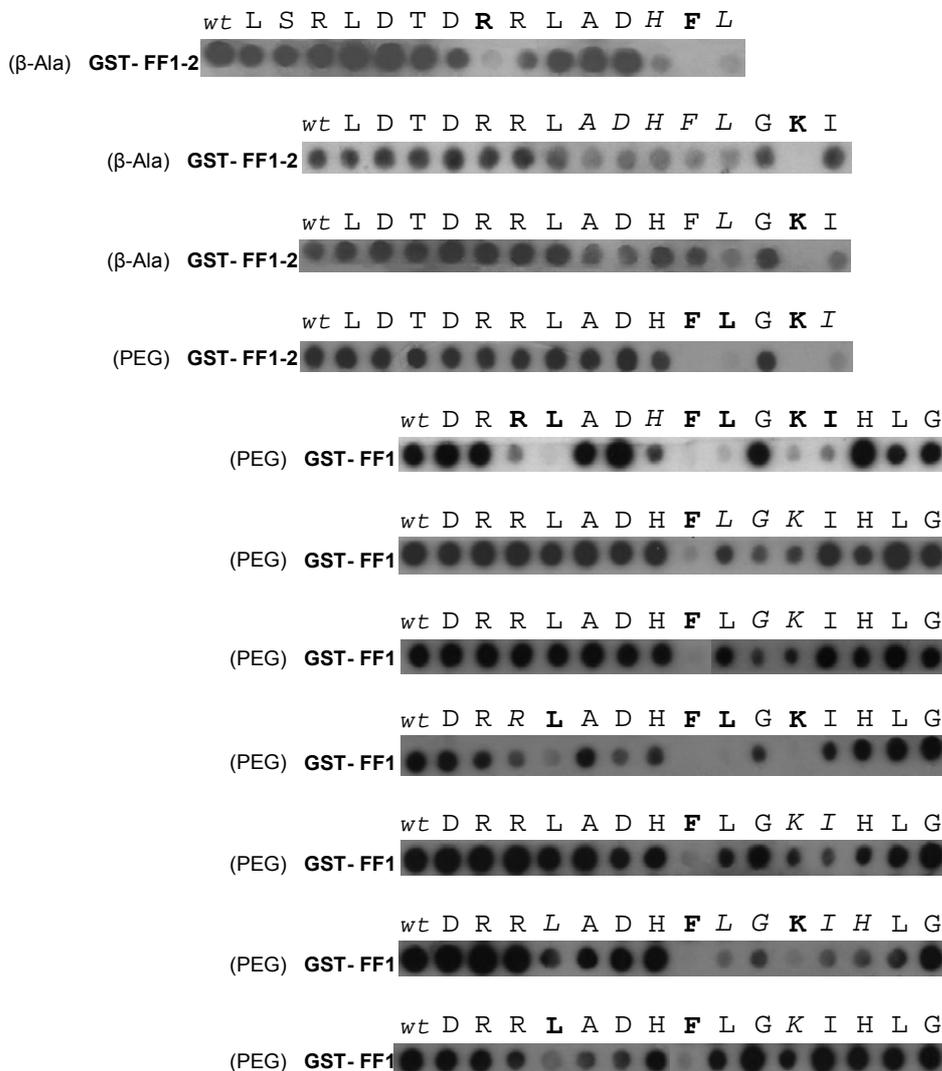


Abb. 3-15: Luc7 Peptidsequenz Ala-Scans mit GST-FF1 & GST-FF1-2

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz (LSRLDTRRLADHFLGKIHLG) synthetisiert auf PEG-Membran (PEG) und β-Ala-Membranen (β-Ala) als 15mere. *wt* kennzeichnet wildtyp-Peptidsequenz. Die über jedem Spot angegebene AS wurde durch Alanin ersetzt. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsproteinen (GST-FF1 & GST-FF1-2). Detektion mit α-GST-HRP und Chemolumineszenz. Fett markiert für Interaktion essentielle AS. *Kursiv* markiert AS mit Einfluss auf die Interaktion.

Die im N-Terminus positiv getestete Peptidregion wurde auch durch einen Ala-Scan näher untersucht und ergab, dass die Aminosäure Arginin in der Luc7-Peptidsequenz für die Bindung zu FF1 wichtig ist (Abb. 3-16).

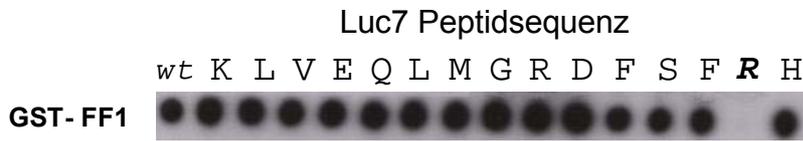


Abb. 3-16: Luc7 Peptidsequenz Ala-Scan mit GST-FF1

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz (KLVEQLMGRDFSFRH)synthetisiert auf PEG-Membran als 15mer. *wt* kennzeichnet wildtyp-Peptidsequenz. Die über dem Spot angegebene AS wurde durch Alanin ersetzt. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST-FF1). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Fett markiert für Interaktion essentielle AS.

Zur Erzielung eines stärkeren Effektes wurden mit der C-terminalen Luc7-Peptidsequenz zusätzlich Doppel-Ala-Scans durchgeführt. Dabei wurden immer zwei hintereinanderliegende Aminosäuren auf einmal in der Sequenz durch Alanin ersetzt.

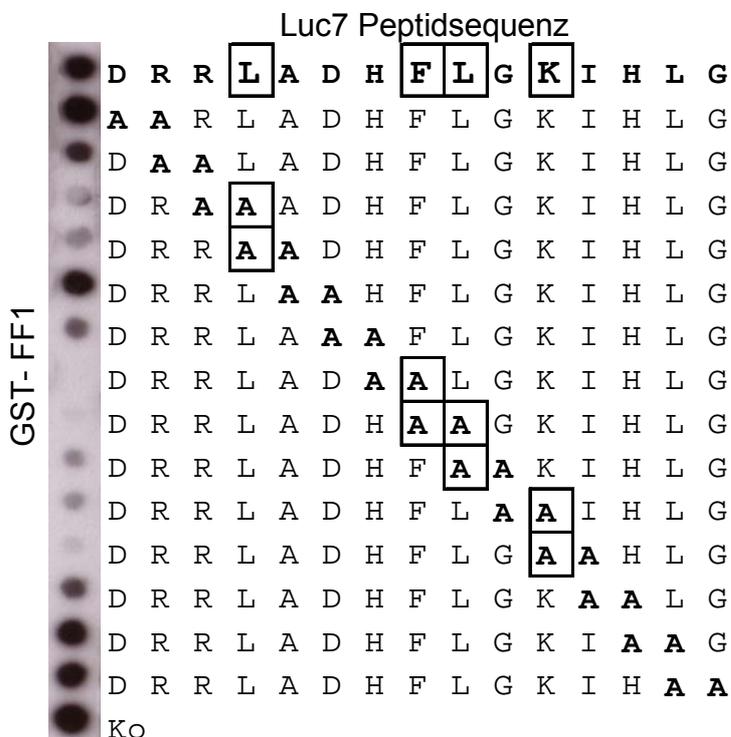


Abb. 3-17: Luc7 Peptidsequenz Doppel-Ala-Scan mit GST-FF1

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz (DRRLADHFLGKIHLG)synthetisiert auf PEG-Membran als 15mere. Kontrollpeptid (Ko = QRALAKDLIVPRRP). 1. Reihe zeigt wildtyp-Peptidsequenz. AA zeigt ersetzte AS durch Alanin in Peptidsequenz. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST-FF1). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Der Rahmen markiert die für die Interaktion essentiellen AS.

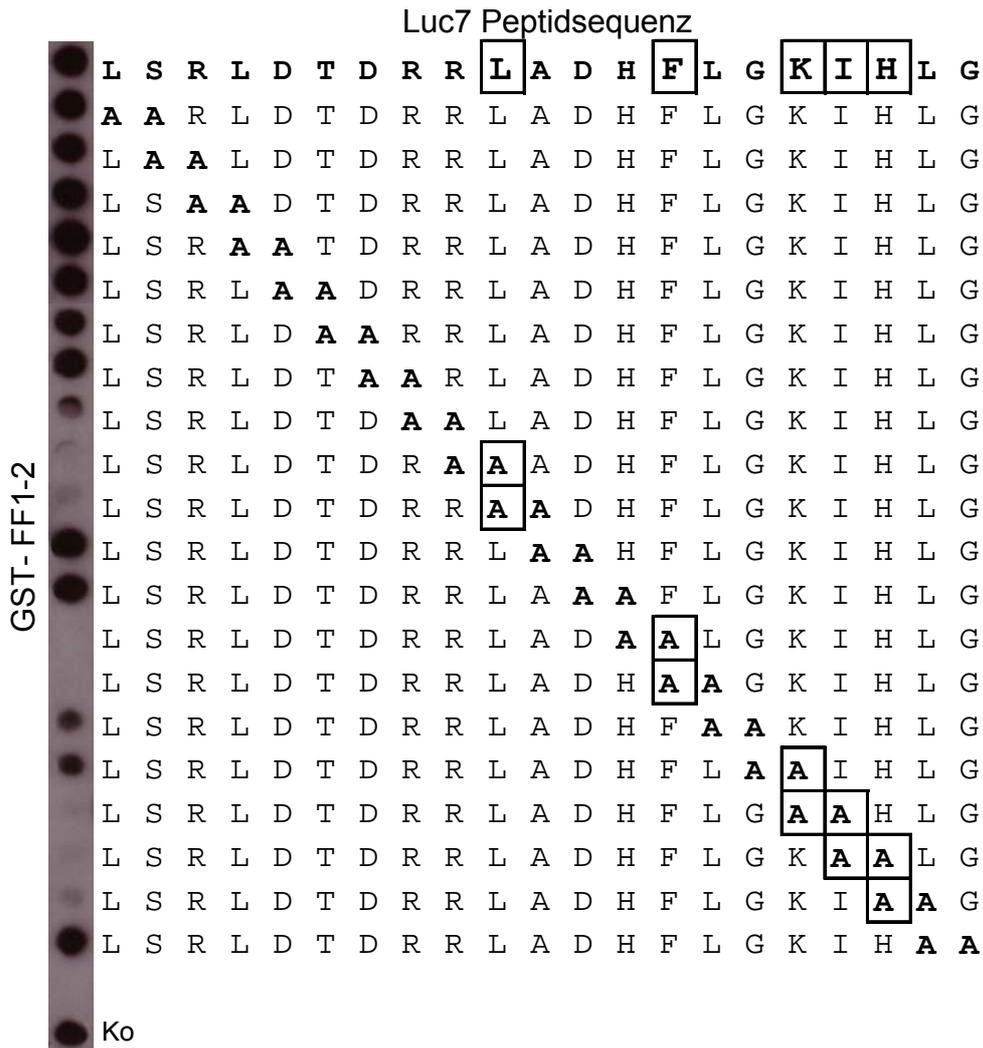


Abb. 3-18: Luc7 Peptidsequenz Doppel-Ala-Scan mit GST-FF1-2

Peptidarrays **Luc7** Peptidsequenz (LSRLDTRRLADHFLGKIHILG) synthetisiert auf PEG-Membran als 21mere. Kontrollpeptid (**Ko** = QRALAKDLIVPRRP). 1. Reihe zeigt wildtyp-Peptidsequenz. **AA** zeigt ersetzte AS durch Alanin in Peptidsequenz. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (**GST-FF1-2**). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Der Rahmen markiert die für die Interaktion essentiellen AS.

Da alle GST-Prp40FF-Konstrukte ähnliche Interaktionsmuster zeigten, wurden die einzelnen FF-Domänen im Ala-Scan verglichen. Gemeinsam für die drei getesteten FF-Domänen (FF1; FF2 und FF4) führt der Verlust der Aminosäure Lysin (K), zu einem Interaktionsausfall (Abb. 3-19).

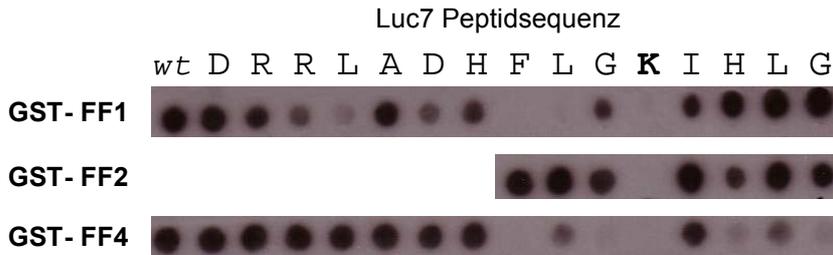
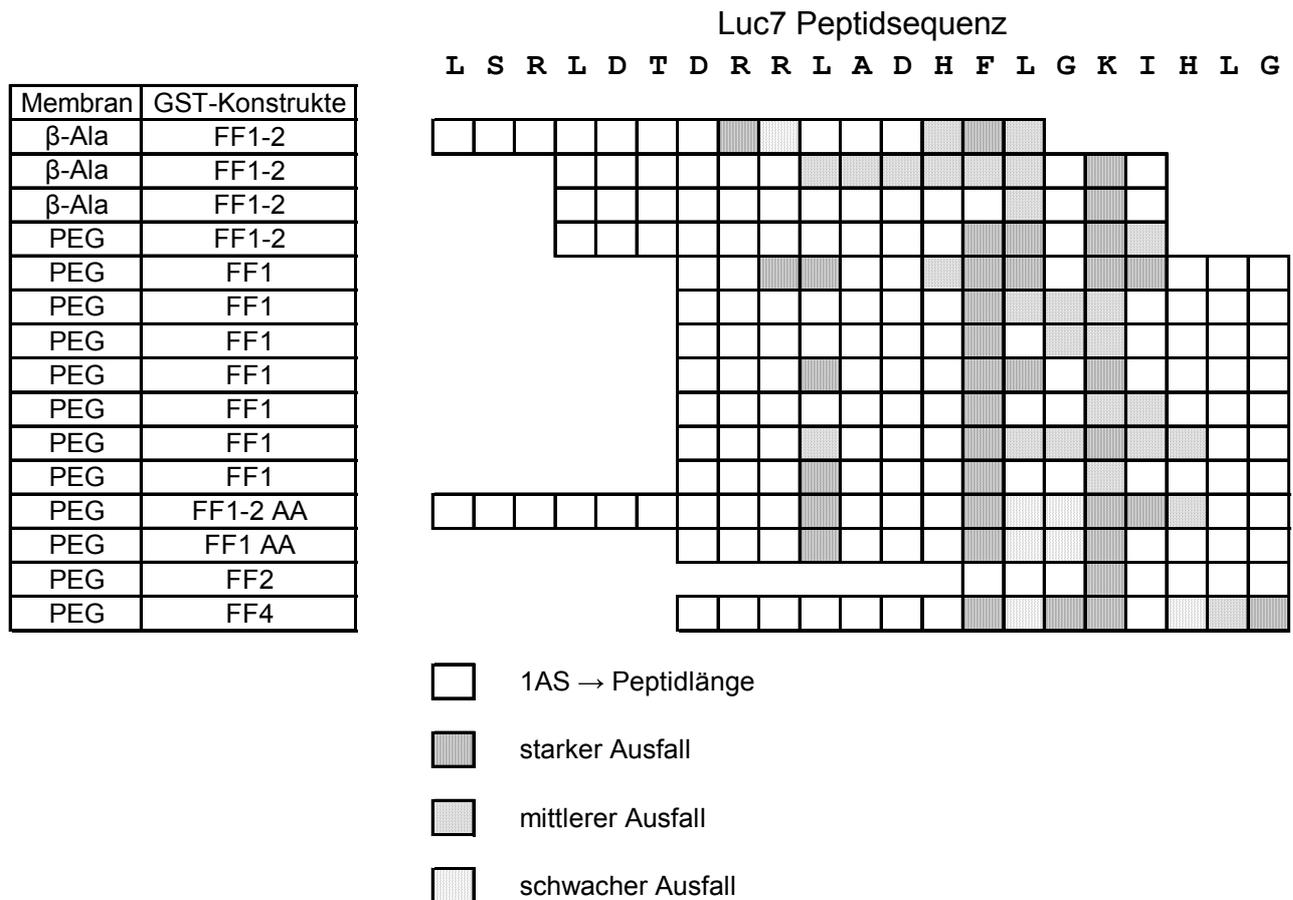


Abb. 3-19: Luc7 Peptidsequenz Ala-Scan Vergleich FF-Domänen

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz (DRRLADHFLGKIHILG) synthetisiert auf PEG-Membran als 15mere. *wt* kennzeichnet wildtyp-Peptidsequenz. Die über dem Spot angegebene AS wurde durch Alanin ersetzt. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST-FF1, GST-FF2 & GST-FF4). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Fett markiert für Interaktion essentielle AS.

In Tabelle 3-6 sind die Ergebnisse aus allen Ala- und Doppel-Ala-Scans noch einmal zusammengestellt. Dabei wird deutlich, dass vor allem Phenylalanin (F) und Lysin (K) für die Interaktion mit der FF-Domäne sehr wichtig zu sein scheinen.



Tab. 3-6: Zusammenfassung Luc7 Peptidsequenz Ala-Scans

Noch deutlicher wird die Signifikanz der Aminosäuren in der Bindesequenz, wenn jede Aminosäure durch alle 20 natürlich existierenden Aminosäuren substituiert wird (Otte *et al.* 2002, Boisguerin *et al.* 2004).

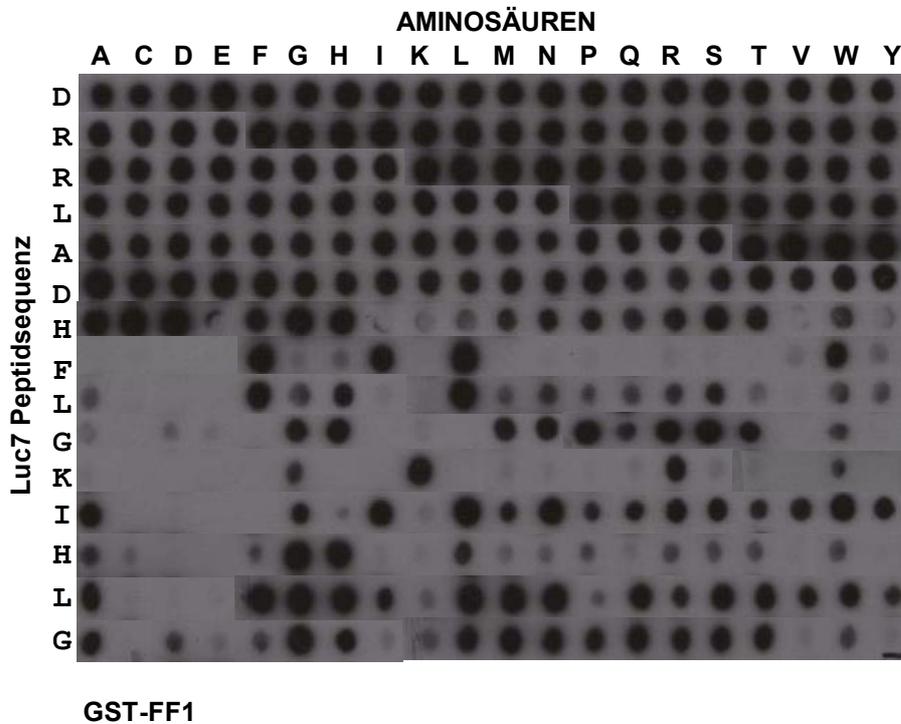


Abb. 3-20: Substitutionsanalyse der Luc7 Peptidsequenz mit GST-FF1

Peptidarrays von Luc7 mit der Peptidsequenz (DRRLADHFLGKIHLLG) synthetisiert auf PEG-Membran als 15mere. Obere Reihe zeigt alle 20 AS im 1-Buchstabencode, die AS in Luc7 Peptidsequenz substituieren. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST-FF1). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz.

Peptidsequenz wurden Cystein (C) und die sauren Aminosäuren Asparaginsäuren (D) und Glutaminsäure (E) akzeptiert. Anscheinend sind zumindest Phenylalanin (F) und Lysin (K) für die Bindung essentiell, da diese sich nur durch sehr ähnliche Aminosäuren ersetzen lassen (F: hydrophob → I:Isoleucin; L:Leucin, W:Tryptophan & K: basisch → R:Arginin). Die umliegenden Aminosäuren scheinen für die Bindung auch von Bedeutung zu sein, so dass man eine deutliche Binderegion in der Sequenz von Luc7 für die FF1- Domänen erkennen kann.

Dies sollte durch Mutation in der Sequenz in erneuten Y2H-Versuchen und *in vitro* Bindungsassays überprüft werden.

Bioinformatische Auswertung der Peptidarrayergebnisse

Die identifizierten Interaktionsregionen von Snu71 und Luc7 wurden in einem BLAST (NCBI BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gegen das Hefegenom nach gleichen oder ähnlichen Sequenzen (*Search for short, nearly exact matches*) durchsucht. Dabei wurde nach Proteinen mit ähnlicher biologischer Funktion, wie die von Prp40, gesucht.

Ein **Snu71-BLAST** mit der Sequenz NDVHY ergab unter anderen zwei interessante Proteine mit einer Funktion im Spleißmechanismus:

Msl5:

```
> gi|6323145|ref|NP\_013217.1  Component of the commitment complex, which defines the first
step in the splicing pathway; essential protein that interacts
with Mud2p and Prp40p, forming a bridge between the intron
ends; also involved in nuclear retention of pre-mRNA; Msl5p
[Saccharomyces cerevisiae]
gi|74645032|sp|Q12186|MSL5\_YEAST  Branchpoint-bridging protein MSL5 (MUD synthesis lethal 5 protein)
(BBP) (Splicing factor 1)
gi|1256857|gb|AAB82363.1  Ylr116wp [Saccharomyces cerevisiae]
gi|1297031|emb|CAA61695.1  L2949 [Saccharomyces cerevisiae]
gi|1360514|emb|CAA97683.1  MSL5 [Saccharomyces cerevisiae]
Length=476

Score = 21.0 bits (42), Expect = 11
Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%), Gaps = 0/5 (0%)

Query 1 NDVHY 5
      NDVHY
Sbjct 337 NDVHY 341
```

Prp6:

```
>  gi|6319529|ref|NP\_009611.1|  Splicing factor, component of the U4/U6-U5 snRNP complex; Prp6p [Saccharomyces cerevisiae]
gi|130807|sp|P19735|PRP6\_YEAST  Pre-mRNA-splicing factor PRP6
gi|4239|emb|CAA37559.1|  unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae]
gi|536291|emb|CAA84998.1|  PRP6 [Saccharomyces cerevisiae]
gi|559951|emb|CAA86398.1|  PRP6 protein, splicing factor [Saccharomyces cerevisiae]
Length=899

Score = 17.6 bits (34), Expect = 120
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%), Gaps = 0/4 (0%)

Query 2 DVHY 5
      DVHY
Sbjct 288 DVHY 291
```

Ein **Luc7-BLAST** mit der Sequenz FLGKIH ergab unter anderen ein interessantes Protein, mit einer Funktion im Spleißmechanismus:

Prp9:

```
>  gi|6320174|ref|NP\_010254.1|  Subunit of the SF3a splicing factor complex, required for spliceosome assembly; acts after the formation of the U1 snRNP-pre-mRNA complex; Prp9p [Saccharomyces cerevisiae]
gi|130808|sp|P19736|PRP9\_YEAST  Pre-mRNA-splicing factor PRP9
gi|4241|emb|CAA37560.1|  unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae]
gi|1279686|emb|CAA96459.1|  unknown [Saccharomyces cerevisiae]
gi|1431008|emb|CAA98589.1|  PRP9 [Saccharomyces cerevisiae]
Length=530

Score = 15.9 bits (30), Expect = 465
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%), Gaps = 0/4 (0%)

Query 3 GKIH 6
      GKIH
Sbjct 301 GKIH 304
```

Außerdem wurde das Hefegenom nach dem in dieser Arbeit charakterisierten Luc7-Motiv durchsucht (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>):

ERGEBNISSE

Luc7-Motiv-Variationen	H	S	BRR2	CWC22	CWC26	HSH49	MSL1	PRP6	PRP8	PRP19	RSE1
[FIL]-[FHL]-X-[KR]-X-[GHL]	L	L	x	x	x	x	x	x	x	x	x
F-[FHL]-X-[KR]-X-[GHL]	498	458	x	-	-	-	x	-	-	-	x
[FIL]-L-X-[KR]-X-[GHL]	L	L	x	-	x	-	-	x	x	-	x
[FIL]-[FHL]-X-K-X-[GHL]	L	L	x	x	-	x	x	-	x	x	x
[FIL]-[FHL]-X-[KR]-X-H	275	264	x	-	-	-	-	-	-	-	x
F-[FHL]-X-K-X-[GHL]	313	295	-	-	-	-	x	-	-	-	x

Abb. 3-21: Luc7-Motiv-Suche im Hefegenom (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>)

Großbuchstaben zeigen die Aminosäuren im Einbuchstabencode; Eckige Klammern zeigen variable AS an dieser Position; Großes X zeigt variable Position für fast alle AS; H steht für x Hits in y Sequenzen (S); L steht für Datenbanklimit; Kleines x zeigt gefundenes Protein mit jeweiligem Motiv-Variation; obere Zeile zeigt ausgewählte Proteine mit einer Funktion im Spleißmechanismus; CWC22 und CWC26 sind Cef1 assoziiert (nach Stevens *et al.* 2002).

Luc7- Mutation

Die aus den Peptidarray-Ergebnissen stammenden AS Daten sollten in Y2H-Tests überprüft werden. Dazu wurden in der Luc7 Aminosäure-Sequenz (Prey) die entsprechenden Aminosäuren in einer Mutagenesereaktion durch Alanin ersetzt (siehe Abb. 3-22) und im Y2H-Versuch die Bindung zu FF1 als Bait überprüft. Keine Bindung sollte bei den Baits FF3-4; FF2; FF3; FF4 und pOBD2 (leerer Bait-Vektor), sowie pOAD (leerer Prey-Vektor), erfolgen. Eine positive Interaktion sollte bei Prp40 *wt*, FF1-4 und FF1 stattfinden.

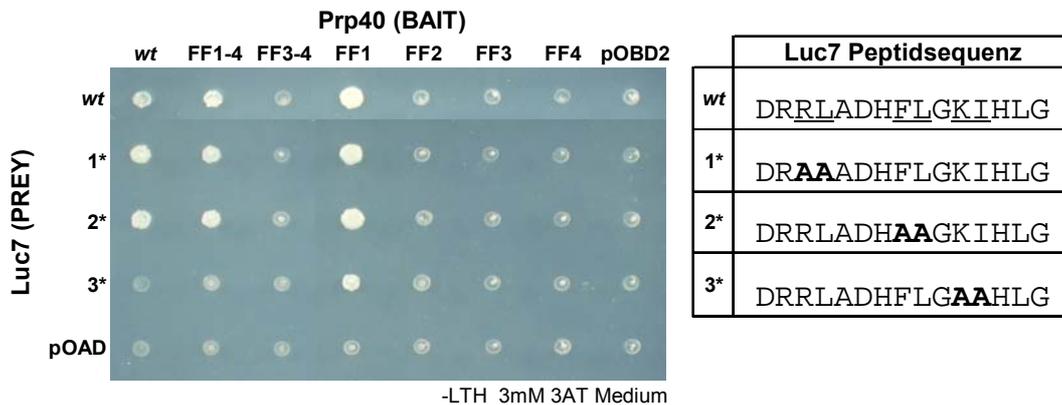


Abb. 3-22: Y2H-Versuch der Luc7 Mutanten mit Prp40FF-Domänen

Die Mutante 3* (KI) zeigt eine Auswirkung auf die Bindung der FF1-Domäne. *wt* kennzeichnet die jeweiligen wildtyp-Konstrukte als Bait oder Prey. Luc7-Mutanten als Preys; pOAD = leerer Prey-Vektor. Prp40-Konstrukte als Baits (FF1-4; FF3-4; FF1; FF2; FF3; FF4). pOBD2 = leerer Bait-Vektor

Aus den Y2H-Versuchen geht hervor, dass die ersten beiden Luc7-Mutationskonstrukte (RL → AA; FL → AA) die Bindung zu Prp40 (*wt*, FF1-4 & FF1) nicht beeinflussen. Jedoch kann bei dem dritten Konstrukt (KI → AA) ein Ausfall der Bindung zu Prp40 *wt* und FF1-4 beobachtet werden. Die Interaktion zu Prp40-FF1 ist zwar noch vorhanden, fällt aber, auch im Wiederholungstest, wesentlich schwächer aus, als im Vergleich mit dem *wt*-Konstrukt von Luc7. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Peptidarray-Ergebnissen (siehe Abb. 3-23), wo Phenylalanin (F)

und Lysin (K) als essentiell für die Interaktion eingestuft wurden, wäre zumindest noch ein Ausfall der Interaktion mit dem zweiten Luc7-Mutationskonstrukt (FL → AA) zu erwarten gewesen.

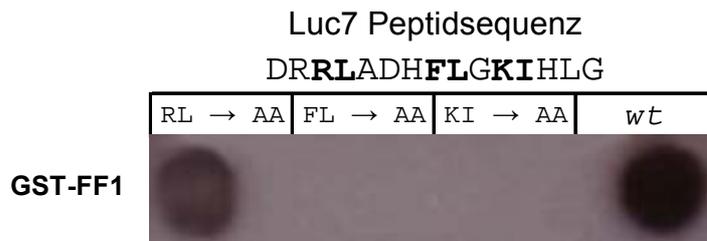


Abb. 3-23: Peptidarray-Mutation Luc7 Peptidsequenz

Peptidarrays Luc7 Peptidsequenz (DRRLADH**FLGKI**HLLG) synthetisiert auf PEG-Membran (PEG) als 15mere. *wt* kennzeichnet wildtyp-Peptidsequenz. AA zeigt den jeweiligen Doppel-AS-Austausch in der wt-Peptidsequenz durch Alanin. Inkubation mit GST-Prp40FF-Fusionsprotein (GST-FF1). Detektion mit α -GST-HRP und Chemolumineszenz. Fett markiert für Interaktion essentielle AS.

***In vivo* Prp40-FF- Deletionen**

Um die Bedeutung der FF-Domänen in Prp40 zu untersuchen, wurden diese vom C-Terminus her *in vivo* deletiert. Dabei wurde durch homologe Rekombination einer ProteinA-Kanamycin-Kassette an die Stelle der jeweiligen FF-Domäne, die deletiert werden sollte, zum Nachweis, eingesetzt (Knop *et al.* 1999). So konnte ein ProteinA getaggttes Deletions-Konstrukt (Prp40FF Δ 3-4ProA) hergestellt werden, das im Vergleich zu dem full length Prp40-ProteinA getaggtten Protein (Prp40FF1-4ProA) einen Wachstumsdefekt zeigt (siehe Tab. 3-8 & Abb. 3-25). Dies deutet darauf hin, dass die deletierten FF-Domänen 3 und 4 nicht essentiell für das Überleben der Hefezelle sind, aber irgendeinen Mechanismus in der Zelle beeinflussen, was zum Beispiel der Spleißvorgang sein könnte. Alle anderen Deletionen resultieren in einem letalen Effekt der haploiden Hefezelle (siehe Tab.3-8). Die vitalen Konstrukte wurden

durch Kontroll-PCR aus der jeweiligen genomischen DNA und Western- Blot aus den jeweiligen Hefestämmen verifiziert (siehe Abb. 3-24).

Prp40 FF- Deletionen			
Konstrukt	Skizze	Phänotyp	
FF1-4 ProA		ProA	vital
Δ FF4 ProA		ProA	letal
Δ FF3-4 ProA		ProA	vital
Δ FF2-4 ProA		ProA	letal
FF1-1 ProA		ProA	letal
FF2-2 ProA		ProA	letal

Tab. 3-8: *in vivo* FF-Deletionskonstrukte Prp40

Rot : WW-Domänen; Blau: FF-Domänen; Grün: coiled-coil-Region; ProA: ProteinA-Tag

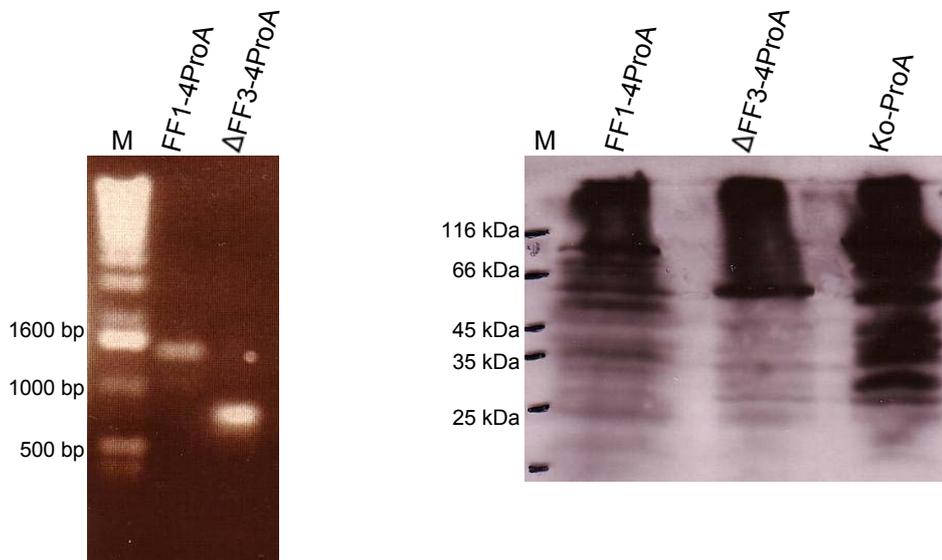


Abb. 3-24: Kontrolle der FF-Deletionskonstrukte mit PCR und Western-Blot

Linke Abbildung zeigt Kontroll-PCR aus genomischer DNA mit Kontroll-Primern (siehe Methoden) nach homologen Rekombination der ProA-Kanamycin-Kassette; Konstrukte zeigen die erwartete Größe bei 1446 bp (FF1-4ProA) und 759 bp (Δ FF3-4ProA); M = Marker. Rechte Abbildung zeigt Western Blot mit Nachweis der ProA-getaggten Konstrukte mit Rabbit anti Goat (1.AK) und Goat anti Rabbit (2.AK) und Chemolumineszenz; Konstrukte zeigen die erwartete Größe von 83 kDa (FF1-4ProA), 56 kDa (Δ FF3-4ProA) und 90 kDa (KoProA) als Kontrolle; M = Marker.

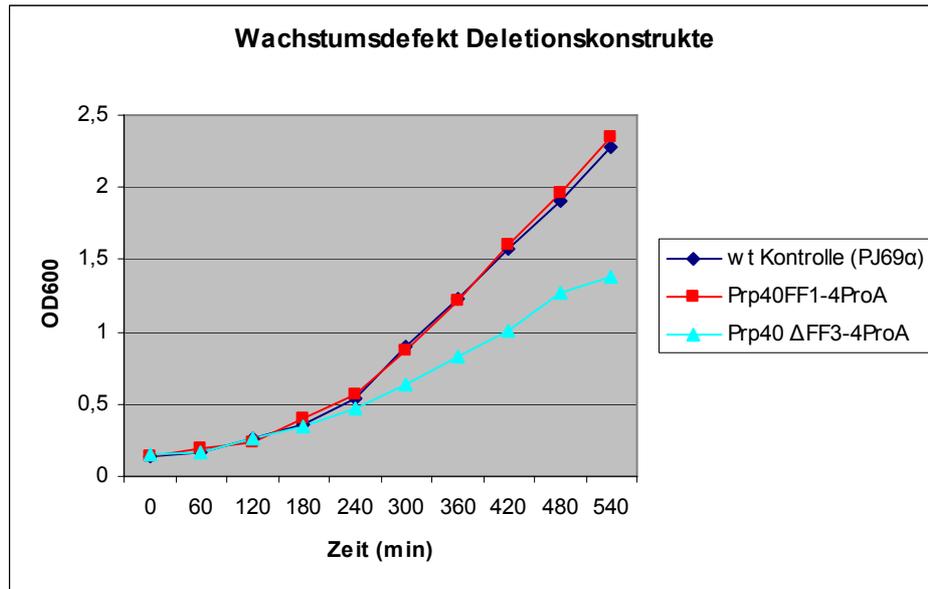


Abb. 3-25: Wachstumsdefekt *in vivo* Deletionskonstrukt von Prp40

Das Deletionskonstrukt Prp40FF Δ 3-4ProA zeigt einen Wachstumsdefekt im Vergleich zur *wt*-Kontrolle

Ob dieser Wachstumsdefekt des Deletionskonstruktes aufgrund einer Beteiligung der FF-Domäne am Spleißmechanismus hervorgerufen wird, wird durch einen funktionellen Spleißtest & eine genomweite Microarray-Studie untersucht.

Um festzustellen, ob die Funktion der FF-Domänen von ihrer speziellen Identität abhängt, wurden *in vivo* Konstrukte hergestellt, die zweimal die FF1-Domäne enthalten oder zweimal die FF2-Domäne (siehe Tab.3-8), welche aber nach ersten Tests nicht lebensfähig sind.

Funktioneller Speißtest (RT-PCR)

Um zu überprüfen, ob der Wachstumsdefekt bei der *in vivo* FFΔ3-4ProA- Mutante eine Auswirkung auf das Spleißen hat, wurde die totale RNA aus diesem Stamm und dem Kontrollstamm FF1-4ProA (siehe Tab. 3-8) isoliert und daraus die mRNA. Diese wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben und mit Primer in den jeweiligen Exonregionen für zwei *Saccharomyces cerevisiae* Intron-Gene (siehe Abb. 3-26) das korrekte Spleißen detektiert. Die dafür ausgewählten Gene DBP2 und ECM33 unterscheiden sich in ihrer Struktur und wurden schon in anderen Spleißosom-Studien verwendet (Görnemann *et al.* 2005). DBP2 besitzt ein sehr langes erstes Exon (1273 bp) und ein langes Intron (1003 bp). Im Gegensatz dazu hat ECM33 ein kurzes erstes Exon und kurzes ein Intron, aber ein langes zweites Exon (1348 bp). Diese beiden Gene sollten so repräsentativ für alle *S.c.* Intron-Gene sein.

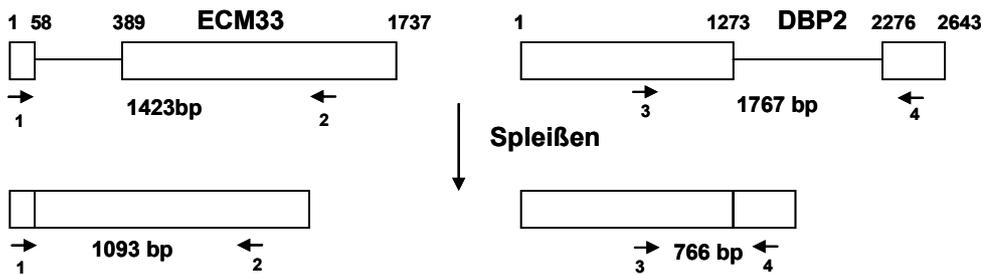


Abb. 3-26: Schema für RT-PCR Spleißtest

Zeigt die beiden Intron-Gene von *Saccharomyces cerevisiae* **ECM33** & **DBP2** vor und nach Spleißen mit angegebenen Basenpaar-Größen der PCR-Produkte. Rechtecke kennzeichnen Exons; Linien kennzeichnen Introns; Pfeile kennzeichnen Oligonukleotide (siehe Methoden) zur RT-PCR um korrektes Spleißen zu detektieren.

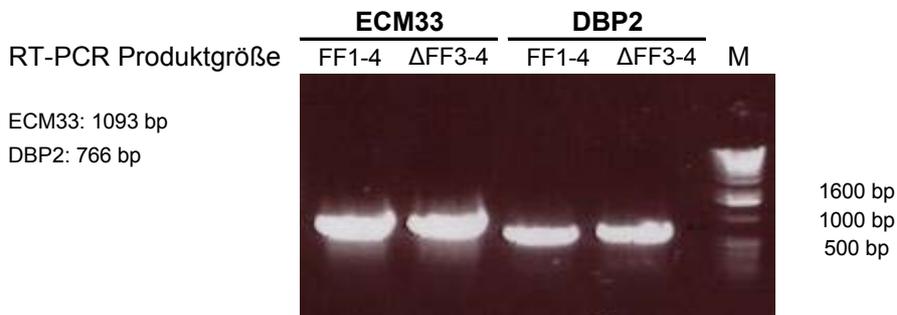


Abb. 3-27: RT-PCR Spleißtest für ECM33 & DBP2

Zeigt 1% Agarosegel mit PCR-Produkten aus RT-PCR für die Intronogene **ECM33** & **DBP2** aus dem Kontrollstamm (**FF1-4**) und dem Mutationsstamm (**Δ FF3-4**). **M** = Marker

Der Wachstumsdefekt, den die FF-Deletionsmutante von Prp40 im Vergleich zu den Kontrollstämmen zeigt, ist in diesem Versuch nicht auf das Spleißen zurückzuführen, jedenfalls nicht mit den hier verwendeten Intron-Genen ECM33 und DBP2, die nach Spleißen die korrekte RT-PCR-Produktlänge zeigen (siehe Abb. 3-27). Aber vielleicht sind diese nicht repräsentativ für das gesamte Genom bei Hefe.

Um das korrekte Spleißen genomweit, d.h. bei allen *Saccharomyces cerevisiae* Intron-Genen (275) zu untersuchen, wurden zusätzlich Microarrays benutzt (Clark *et al.* 2002). Dabei können parallel alle Gene, die bei *Saccharomyces cerevisiae* potentiell gespleißt werden, auf funktionierendes Spleißen auf einem Chip detektiert werden. Dazu wurde erneut aus der Mutante FF Δ 3-4ProA und dem Kontrollstamm FF1-4ProA die totale RNA isoliert und daraus die mRNA. In einer Labelling-Reaktion wurden die mRNAs in cDNA umgeschrieben und gleichzeitig mit zwei verschiedenen Farbstoffen zur Detektion versehen (siehe Methoden). Dann wurden die unterschiedlich markierten Proben auf zwei Chips hybridisiert und eingescannt. Die von mir durchgeführten Microarray-Versuche ergaben keine Ergebnisse. Deshalb wurden die Tests in Kollaboration wiederholt und werden derzeit noch durchgeführt und ausgewertet.

DISKUSSION

Interaktionspartner der FF-Domänenregion von Prp40

Aus den Y2H-Ergebnissen gehen Snu71 und Luc7 eindeutig als Interaktionspartner der FF-Domänenregion von Prp40 hervor (siehe Tab. 3-2).

Snu71/ Luc5 ist wie Prp40 und Luc7 ein U1snRNP assoziierter, essentieller Spleißfaktor. In Proteinkomplexstudien wurde es auch schon im Komplex unter anderen mit Prp40 nachgewiesen (Rigaut *et al.* 1999; Stevens *et al.* 2002; Gavin *et al.* 2002). Auch vorherige Y2H-Screens identifizierten Snu71 als Interaktionspartner von Prp40 (Ito *et al.* 2001). Snu71 enthält zentral eine coiled-coil-Region und N-terminale eine PWI-Domäne (Abb. 4-1), eine charakteristische Spleißfaktor-Domäne (Blencowe & Ouzounis 1999; Szymczyna *et al.* 2003). Ferner enthält Snu71 mehrere Arginin-Serin (RS)-, Arginin-Glutaminsäure (RE)- und Arginin-Asparaginsäure (RD)-Dipeptide, die auch in Spleißfaktoren bekannt sind. Unter anderen enthält auch das U1 snRNP-70K-Protein diese SR-Sequenzen. Die Funktion liegt wahrscheinlich in der Beteiligung von Protein-Protein-Interaktionen.

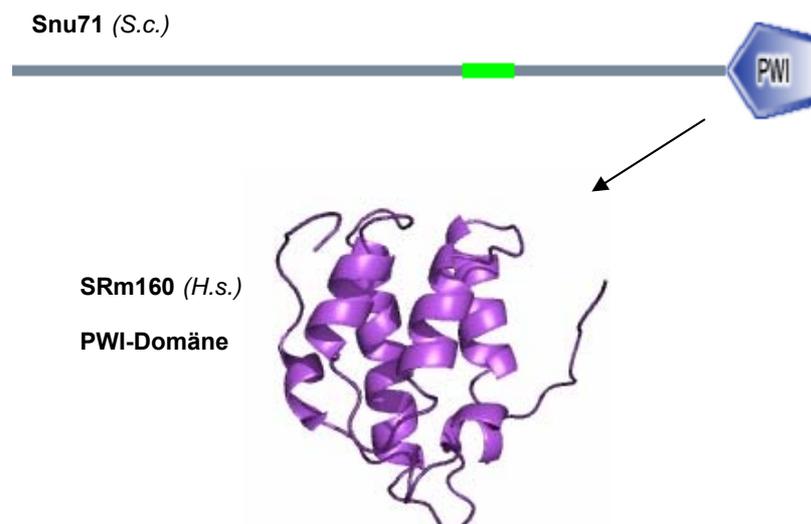


Abb. 4-1: Schematische Darstellung von Snu71 und bekannte PWI-Struktur des Menschproteins SRm160 (aus Szymczyna *et al.* 2003). Die NMR-Struktur der PWI-Domäne von SRm160 zeigt vier α -Helices (violett). Grün zeigt eine coiled-coil Region in Snu71.

Luc7 wurde als Hefe-Spleißfaktor 1999 entdeckt (Fortes *et al.* 1999). Das LUC7 (lethal unless CBC is produced) Gen wurde identifiziert durch eine Mutation, welche in Hefestämmen, denen der nukleare CAP-Bindekomplex fehlt, letal wirkt. Luc7 ist ebenfalls wie Prp40 und Snu71 eine Komponente des U1snRNP und essentiell (Mutation letal) für vegetatives Wachstum. Seine Funktion besteht in der 5'-Spleißstellen-Erkennung. Die CAP-Struktur der prä-mRNA wird durch den nuklearen CAP-Bindekomplex erkannt, ein konservierter heterodimerer Komplex, bestehend aus CBC80 und CBP20 (Izaurrealde *et al.* 1994, 1995; Colot *et al.* 1996; Görlich *et al.* 1996; Lewis *et al.* 1996). Der CBC-Komplex ist sowohl in Hefe als auch in Säugetieren vorhanden. Luc7 ist also essentiell für die Formation des Commitment Komplexes in Hefe, der auch noch andere Proteine der Luc-Kollektion enthält. Manche dieser Gene codieren Proteine, die zwischen Hefe und Wirbeltier konserviert sind (siehe Tab. 1-1). Wie auch für andere Spleißfaktoren charakteristisch, besitzt Luc7 Arginin-Serin (RS) und Arginin-Glutaminsäure (RE) Wiederholungssequenzen. Als bekanntes Motiv enthält Luc7 eine coiled-coil-Region (Newman *et al.* 2000). Coiled-coil Motive bestehen aus zwei oder mehr α -Helices, die sich gegenseitig umwickeln. Liganden für diese Regionen sind in der Regel andere coiled-coil Sequenzen.

Qualität der Interaktionen

Es ist natürlich möglich, dass nicht alle in Frage kommenden Interaktionspartner von Prp40 im Y2H-Screen erfasst worden sind. Schließlich kann es durch gelegentliche Kontamination des Mediums zu einem Ausfall an potentiellen Interaktionspartnern kommen und auch der Roboter, mit dem die Screens durchgeführt werden, weist baubedingt Ungenauigkeiten auf, die zu Falsch-Negativen führen können. Falsch-Negative sind auch Proteine, die tatsächlich miteinander interagieren würden, dies aber durch eine veränderte Faltung im Zellkern nicht tun können. Falsch-Positive sind Proteine, die normalerweise nicht miteinander interagieren, dies aber durch eine veränderte Oberfläche (z.B. milieubedingt), doch tun. Die hier als positiv getesteten Proteine wurden aber in Einzeltests bestätigt und aufgrund ihrer biologischen Rolle oder des biologischen Zusammenhangs als Falsch-Positive praktisch ausgeschlossen. Außerdem wurde zumindest die Interaktion zwischen der ersten FF-

Domäne von Prp40 und Luc7 in einer unabhängigen Methode *in vitro* bestätigt (Abb. 3-4 und Abb. 3-5). Eine Bestätigung der Bindung von Prp40 an Snu71 kam im *in vitro*-Bindeassay zwar nicht zustande (Abb. 3-3), aber dies könnte möglicherweise daran liegen, dass keine GST-Prp40-Fusionsproteine für Snu71 zur Verfügung standen (GST-Prp40 oder GST-FF2-3 und GST-FF1-3, welche im Y2H-Test positiv waren, sind instabil oder unlöslich; siehe Diplomarbeit). Alternativ könnte die Bindung von Snu71 an Prp40 auch durch Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden, da für Snu71 ein Antikörper existiert.

Bisherige Interaktionspartner von Prp40

Zu Beginn dieser Arbeit war über die FF-Domänen von Prp40 nur bekannt, dass sie zusammen mit den WW-Domänen an die phosphorylierte C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (pCTD RNAPII oder RPO21) bindet (Morris & Greenleaf 2000). Ansonsten waren zwar mehrere Interaktionspartner von Prp40 identifiziert, aber mit Beteiligung der N-terminalen WW-Domänen (**Prp8** und **Msl5**; Abovich *et al.* 1997) über Prolin-reiche Regionen. Über Y2H-Experimente wurden auch bereits mehrere Interaktionspartner von Prp40 identifiziert (**Snu71** und möglicherweise **Ada2**; Ito *et al.* 2001; **Clf1** Chung *et al.* 1999; **Prp8** und **Msl5** Abovich *et al.* 1997). Chung *et al.* berichteten auch von einer Interaktion der FF-Domänenregion mit Clf1.

Kürzlich wurde jedoch, mit der Charakterisierung der Struktur der ersten FF-Domäne von Prp40 und deren Interaktion mit dem crn-TPR1-Motiv von Clf1, (Crooked neck-like factor 1) ein neuer Einblick über das Bindeverhalten der FF-Domäne gegeben (Gasch *et al.* 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-Screens von Prp40 ergaben kein Ergebnis mit Clf1, auch nicht mit der ersten FF-Domäne (FF1). Bei Kontrolle des Clf1-Klons konnte festgestellt werden, dass der Vektor kein Insert enthielt. Auch Ada2 wurde für die FF-Domänenregion positiv getestet (siehe Diplomarbeit), aber aufgrund des biologischen Zusammenhanges nicht weiter untersucht. Stattdessen wurden Prp40, Snu71 und Luc7, näher analysiert.

Proteinkomplex-Daten von Prp40, Snu71 und Luc7

Die Annahme, dass Prp40, Snu71 und Luc7 einen Subkomplex innerhalb des U1snRNP bilden, wird auch durch Proteinkomplex-Charakterisierungen in der Hefe bekräftigt (Gavin *et al.* 2002; Stevens *et al.* 2002), bei denen diese drei Proteine immer in einem Komplex nachzuweisen sind. Als Detektionssystem dient zum einen die MALDI-TOF Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight), basierend auf der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinfragmenten oder Proteingemischen (Mann *et al.* 2001). Zum anderen kann zur spezifischen Aufreinigung von Proteinkomplexen die TAP (tandem affinity purification) - Methode verwendet werden (Puig *et al.* 2001; Forler *et al.* 2002).

Prp40 und Snu71 wurden in der folgenden Tabelle (Tab. 4-1) nicht als Bait verwendet. Luc7 ergab mit weiteren Proteinen als Bait folgende Ergebnisse (aus Gavin *et al.* 2002 sind nur die Komplexe gezeigt, in denen Prp40, Snu71 oder Luc7 gefunden wurden). Parallel sind die U1snRNP-Proteine als solche markiert (aus Stevens *et al.* 2002):

DISKUSSION

Cbc2	Luc7	Mud1	Nam8	Smx2	Smx3	Snp1	Sto1	Vps41	Yhc1
Cbc2	Cdc33	Cbc2	Cbc2	Brr1			Brr1 Bur2 Cbc2		
Kap95	Hsh155			Clf1 Cus1 Dib1 Hsh155	Cus1 Dib1 Ecm2 Hsh155		Hta1 Kap95		
				Lea1 Lsm4	Lea1				
Luc7	Luc7		Luc7	Luc7	Luc7	Luc7	Luc7 Msh4	Luc7	Luc7
		Mud1	Mud1	Mud1	Msl1		Mud1		Mud1
Nab3							Nab3		
Nam8	Nam8		Nam8			Nam8			Nam8
Npl3 Nrd1			Npl3				Nrd1	Pep3 Pep5	
			Prp11	Prp3 Prp4 Prp6 Prp9 Prp11 Prp19 Prp21 Prp31	Prp4 Prp6 Prp9 Prp19 Prp31 Prp39 Prp42				
	Prp39 Prp40 Prp42	Prp39 Prp40 Prp42	Prp39 Prp40 Prp42	Prp40	Prp40	Prp39 Prp40 Prp42	Prp40 Prp42		Prp39 Prp40 Prp42
Rse1	Rse1			Prp46 Rse1	Rse1		Rlr1 Rse1 Scp160 Scr9 Sen1 Sgv1		
Smd2	Smb1 Smd2 Smd3 Smx3		Smb1 Smd2 Smd3	Smb1 Smd1 Smd2 Smd3	Smb1 Smd3		Smd1 Smd2 Smd3		Smb1 Smd1 Smd2
Snp1	Snp1	Snp1	Snp1	Snp1		Snp1	Snp1		Snp1
Snu56	Snu56	Snu56	Snu56	Snu56 Snu66	Snt309	Snu56			Snu56
Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71	Snu71
Srp1 Sto1 Tif4632	Snu114 Sto1 Tif4631	Sto1	Snu114 Sto1 Tif4632	Snu114 Sto1	Snu114 Sto1	Sto1	Srp1 Sto1 Tif4631 Tif4632	Vam6 Vps16 Vps33 Vps41	Sto1
	Yhc1		Yef3 Yhc1	Yhc1					Yhc1
YML117W				YJR084W YLR424W	YDL209C YJR084W YLR424W		YDL175C YKL214C		

Tab. 4-1: Proteinkomplexe mit Prp40, Snu71 und Luc7; MS u. TAP Daten (Gavin *et al.* 2002)

Gezeigt sind nur Komplexe, welche die Proteine Prp40, Snu71 und Luc7 enthalten. Gelb markiert die U1snRNP Proteine, MS Daten (Stevens *et al.* 2002), obere Zeile zeigt die Baits.

U1snRNP-assoziierte Proteine

Um einen Einblick in die Wechselwirkungen innerhalb des U1snRNP zu bekommen, wurden alle U1snRNP-assoziierten Proteine im Y2H-Test auf Interaktion untersucht (Tab. 3-3 und Abb. 3-2). Aber zwischen den U1snRNP-Proteinen konnte keine weitere Interaktion, als die schon per Y2H getesteten Prp40 mit Snu71 und Luc7, detektiert werden. Möglicherweise finden die Interaktionen innerhalb des U1snRNPs auf RNA-Ebene statt, die nicht mit dem Y2H-System erfasst werden können, denn die meisten U1snRNP-assoziierten Proteine besitzen eine RNA-Bindedomäne (siehe Tab. 4-2). So könnten auch die Interaktionen zwischen Prp40 und Snu71 und Luc7 stabilisiert werden.

U1snRNP-Proteine	Skizze
Luc7	
Mud1/U1-A	
Nam8	
Prp39	
Prp40	
Prp42	-
Snp1/U1-70K	
Snu56	-
Snu71	
Yhc1/U1-C	

Tab. 4-2: Schematische Darstellung der U1snRNP-Proteine mit gefundenen Domänen (aus SMART-Datenbank). **RRM**: RNA recognition motif; **HAT**: Half-A-TPR-Repeat; **WW**: WW-Domäne; **FF**: FF-Domäne; **PWI**: PWI-Domäne in Speisefaktoren; **ZnFU1**: Zinkfinger-Domäne Typ U1

Von vier U1snRNP-Proteinen (Nam8, Snu56, Snp1/U1-70K und Yhc1/U1-C) wurde die direkte Bindung an die prä-mRNA nachgewiesen (Zhang et al. 1999; Puig et al. 1999).

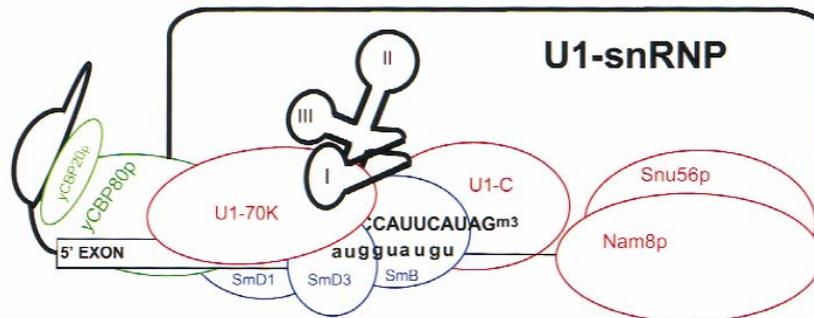


Abb. 4-2: Modell der prä-mRNA-Protein Interaktionen im Commitment-Komplex 1 in Hefe (aus Zhang et al. 1999). Nur der 5'-Arm, stem/loop I, II und III der U1snRNA sind dargestellt (siehe Einleitung). Die 5'-Region Sequenzen sind in Kleinbuchstaben, die 5'-Arm Sequenzen der U1snRNA sind in Großbuchstaben gezeigt. Die Intron-Sequenz ist durch eine Linie und das 5'-Exon ist durch ein Rechteck dargestellt. Rot markiert sind U1snRNP-spezifische Proteine. Blau markiert sind Sm-Proteine und grün markiert CBC (Cap binding complex)-Proteine.

Kartierung der Protein-Protein-Interaktion von Prp40 mit Snu71 und Luc7

Y2H-Kartierung

Die Y2H-Ergebnisse (Tab. 3-2) ergaben, dass jeder gefundene Interaktionspartner eine andere FF-Domänenregion zu bevorzugen scheint. Luc7 zeigte eindeutig eine Interaktion mit der FF1-Domäne von Prp40 (auch *in vitro* verifiziert durch GST-Pulldowns Abb. 3-4 und Abb. 3-5), genauso das C-terminale Fragment (Luc7-II), während Snu71 an die Region FF2-3 bindet. Auffallend bei Snu71 war, dass das ganze Protein noch mit FF1-3 und FF2-3 interagiert hat, das Fragment II nur noch mit FF1-3 (siehe Tab. 3-2). Eventuell könnte die FF1-Domäne bei der Interaktion in einem Teil außerhalb des Fragments II binden. Dazu müsste noch der N-terminale Teil von Snu71 im Y2H-Versuch getestet werden. Außerdem macht es den Eindruck, als ob die FF4-Domäne keine Rolle spielt, zumindest nicht bei den hier identifizierten Interaktionspartnern (eventuell bei anderen). Auf jeden Fall scheinen die beiden N-

terminalen FF-Domänen FF1 und FF2 am wichtigsten, um eine Interaktion einzugehen.

Peptidarray-Kartierung

Die unabhängig untersuchten Peptidarrays in Berlin und in unserem Labor, zur Bestimmung der Interaktionsregion in Snu71 und Luc7, ergaben ähnliche Ergebnisse, obwohl die Versuche mit unterschiedlichen Versuchs-Bedingungen durchgeführt wurden. In Berlin wurden die Peptide als 20mere auf einer CAPE-Membran mit einem halbautomatischen Roboter (ASP222; ABIMED) synthetisiert. In unserem Labor wurden die Peptide als 15mere auf einer β -Alanin-Membran oder einer PEG-Membran mit einem vollautomatischen Roboter (MULTIPEP; INTAVIS) synthetisiert.

So wurde für Snu71 mit allen FF-Konstrukten, außer mit FF1 (nur schwach), eine Binderegion im C-terminalen Teil des Proteins detektiert mit der Sequenz NDVHY (siehe Abb. 3-11). Die Versuche mit phosphorylierten Peptiden waren weniger konsistent und wurden daher auch nicht berücksichtigt. Wichtig ist zu erwähnen, dass nur der Bereich Snu71-II (AS 329-536) gespottet wurde, der im Y2H-Versuch detektiert wurde. Eventuelle Interaktionsstellen in der N-terminalen Region von Snu71 bleiben also undetektiert. So wäre es interessant in Peptidarrays mit dem gesamten Peptidabfolge von Snu71 zu überprüfen, ob tatsächlich eine Interaktion für die FF1-Domänen beobachtet werden kann, da bei Fragmentierung von Snu71 die Interaktion im Y2H-Versuch nur noch mit FF1-3 stattfinden kann, anstatt, wie vorher mit dem ganzen Protein beobachtet, mit FF2-3 (siehe Tab. 3-2).

Für Luc7 wurde mit allen FF-Konstrukten (FF1; FF2; FF1-2 und FF3-4), außer FF4, zuerst eine Binderegion im C-terminalen Teil mit der Sequenz HFLGK detektiert, wobei FF2 und FF3-4 nur ein Peptid banden, FF1 und FF1-2 aber überlappende Peptide. Für FF4 wurde ein anderes Interaktionsmuster detektiert (Abb. 3-7; Tab. 3-4 und Abb. 3-13; B). Auch hier ergaben die Phosphorylierungsversuche keine weiteren Ergebnisse. Luc7 wurde zusätzlich in voller Länge gespottet und mit allen FF-Konstrukten getestet (Abb. 3-9; Tab. 3-5 und Abb. 3-13; A2). Überraschenderweise tauchte, neben der C-terminalen, noch eine zusätzliche Binderegion im N-Terminus

auf, was nicht aus den Y2H-Ergebnissen zu erwarten war (siehe Tab. 3-2). Alle FF-Konstrukte zeigten wieder ein ähnliches Bindemuster in dieser Region. Auch in der Binderegion im C-Terminus von Luc7 wurden für alle FF-Domänen-Konstrukte positive Peptide detektiert. Außerdem treten etliche Cystein-haltige Peptide auf (Tab. 3-5), von denen bekannt ist an GST und auch an Gluthation zu binden und somit aus der Bewertung fallen. In Berlin wurde Cystein durch Serin ersetzt, um Falsch-Positive zu vermeiden. Die Tatsache, dass bei FF2 ziemlich starke Signale, unter anderen auch mit Cystein-haltigen Peptiden, auftreten (siehe Abb. 3-9), lässt die Vermutung zu, dass die Qualität von diesem Protein nicht ausreichend war. Anscheinend wurde durch die Dialyse nicht genug Gluthation entfernt, so dass die Ergebnisse mit Vorsicht behandelt und wiederholt werden sollten. Abgesehen von einigen schwachen Interaktionen, zeigen alle FF-Konstrukte das gleiche Interaktionsmuster im N- und C- Terminus. Aufgrund der Y2H-Ergebnisse, sollte die Bindung aber im C-terminalen Teil von Luc7 stattfinden (siehe Tab. 3-2). Diese wurde dann auch für weitere Peptidarray-Mutationsanalysen detaillierter untersucht.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass erstens, die Phosphorylierung von Serinen bei den hier getesteten Interaktionen mit Snu71 und Luc7, wie bei der CTD, keine Rolle spielt, diese eher nachteilig beeinflussen, zweitens zeigen die getesteten FF-Domänen ähnliche Binderegionen, sowohl bei Snu71 als auch bei Luc7 und drittens weisen die identifizierten Regionen in Snu71 (NDVHY) und Luc7 (HFLGK) keine Ähnlichkeit auf.

Ein Homologievergleich in verschiedenen Spezies ergab, dass die identifizierte Region in Snu71 weniger gut konserviert ist (Abb. 3-12), hingegen der für Luc7 charakterisierte Bereich sehr gut (Abb. 3-14), vor allem die Aminosäuren Histidin (H), Glycin (G) und Lysin (K). Allerdings ist Luc7 generell besser konserviert als Snu71, welches ein Hefe-spezifisches Protein ist.

Gründe für widersprüchliche Peptidarray-Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit und Glaubwürdigkeit der Peptidarray-Methode zu testen, wurden die Versuche mehrmals wiederholt. Ergebnisabweichungen stammen wahrscheinlich aus der Verwendung unterschiedlicher Membranen und deren Linker.

In Verbindung mit der Synthesequalität, die Grundlage für eine korrekte Faltung der Peptidkette ist, können so Schwankungen erklärt werden. So lässt sich auch eine nicht kontinuierliche Peptidfolge in überlappenden Peptiden erklären. Außerdem spielt die Qualität des aufgereinigten Proteins, mit dem die Membran inkubiert wird, eine wesentliche Rolle. So sind wahrscheinlich die auffallend starken Signale der FF2-Domäne (Abb. 3-9) auf eine nicht ausreichende Proteinqualität zurückzuführen.

Motiv-Diskussion mit Luc7-Mutation

Da die Gesamtdaten für Luc7, sowohl in den Y2H-Versuchen als auch in den Peptidarrays, eindeutiger und konsistenter waren als die von Snu71, wurden die Interaktionsregionen der FF-Domänen in Luc7 näher charakterisiert.

Die N-terminale Region wurde durch einen Alanin-Scan analysiert und zeigte Arginin (R) für die Bindung essentiell an (Abb. 3-16). Die genauere Analyse der C-terminalen Binderegion von Luc7 durch Alanin-Scans (Abb. 3-15; Abb.3-17; Abb. 3-18 und Tab. 3-6) und eine Substitutionsanalyse (Abb. 3-20 und Tab. 3-7) mit allen zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren ergab ein Motiv für die FF1-Domäne $\Phi\mathbf{F}/\mathbf{H}/\mathbf{LxK}/\mathbf{RxG}/\mathbf{H}/\mathbf{Lxx}$ (siehe Tab. 4-3). Die Aminosäure Lysin (K) konnte auch nur an deren Position vier substituiert werden, was diese Position sehr spezifisch und essentiell macht und höchstwahrscheinlich bei der Interaktion mit der FF1-Domäne eine wichtige Rolle spielt. Ob und wie die positive Ladung von Lysin sich auf die Interaktionstelle in der FF1-Domäne auswirkt, muss näher analysiert werden z. B. in NMR-Studien. Außerdem konnte keine wirkliche Ähnlichkeit zu der im N-Terminus detektierten Binderegion festgestellt werden, außer dass der Ausfall der Bindung ebenso auf den Verlust einer basischen Aminosäuren zurückzuführen ist (siehe Abb. 3-16), was eventuell für spätere strukturelle Studien interessant sein könnte.

		Luc7-Peptidsequenz							
		F	L	G	K	I	H	L	G
Aminosäuren	A		A			A	A	A	A
	C								
	D								D
	E								
	F	F	F					F	F
	G		G	G	G	G	G	G	G
	H		H	H			H	H	H
	I	I				I		I	
	K				K				
	L	L	L				L	L	L
	M		M	M		M	M	M	M
	N		N	N		N	N	N	N
	P		P	P		P	P		P
	Q		Q	Q		Q		Q	Q
	R		R	R	R	R	R	R	R
	S		S	S		S	S	S	S
	T		T	T		T	T	T	T
	V					V		V	
	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y		Y			Y		Y	

F	G
Φ H x K x H x x	
L	R L

■ unpolare hydrophobe AS

■ polare ungeladene AS

■ basische AS

■ saure AS

□ wt Kontroll-AS

Tab. 4-3: Luc7-Bindemotiv

Mutationsanalyse

Basierend auf der Zusammenfassung aller Ergebnisse (Tab. 3-6 und Tab. 3-7) wurden Luc7-Mutanten (RL → AA; FL → AA und KI → AA) mit Doppel-Aminosäureaustausch hergestellt und im Y2H-Versuch getestet (Abb. 3-22). Allerdings wurde nur mit der KI-Mutante ein Effekt erzielt. Die Bindung fiel aus bei Prp40 *wt* und bei Prp40FF1-4, aber nicht bei Prp40FF1, sondern resultierte nur in einem ca. 50%-langsameren Wachstum der Hefen, was nicht den Erwartungen entsprach. Ebenso wäre bei der FL-Mutante ein Ausfall der Bindung zu erwarten gewesen. Deshalb sollen die Bindung der Mutanten zu FF1 auch im GST-Pulldown

im Vergleich mit Luc7 getestet werden. Vielleicht müssen auch die beiden wichtigsten Aminosäuren Phenylalanin (F) und Lysin (K) zusammen, oder die gesamten Aminosäuren in der Motiv-Sequenz, mutiert werden. Außerdem wurde noch ein Peptid synthetisiert, das der gesamten Binderegion in Luc7 entspricht (Tab. 3-4 Peptidsequenz 23-24: LSRLDTRRLADHFLGKIHLGYVKMR), um im GST-Pulldown mit Luc7 um die Bindestelle in der FF1-Domäne zu konkurrieren (Abb. 3-6). Allerdings konnte keine Beeinflussung mit Peptid beobachtet werden. Dies könnte an der Peptidlänge liegen und soll mit einem spezifischeren Bereich wiederholt werden. Es muss natürlich berücksichtigt werden, dass die Aminosäure-Konstellation in einem freien Peptid eventuell nicht der *in vivo* entspricht und so die Faltung des Peptides, die für die Interaktion wichtigen Aminosäuren blockieren könnte.

Funktion der FF-Domäne in anderen Spezies

Neben dem Hefe-FF-Protein Prp40 sind die menschlichen FF-Proteine HYP/FA11 und CA150 am besten untersucht. Ansonsten ist über die FF-Domäne in anderen Spezies wenig bekannt.

Interaktion mit der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II

Wie von Prp40, ist auch von HYP/FA11 und CA150 mit Beteiligung der FF-Domäne, eine Bindung an die phosphorylierte CTD der RNAPII bekannt (Morris & Greanleaf 2000; Carty *et al.* 2000 und Allen *et al.* 2002, siehe Abb. 4-3).

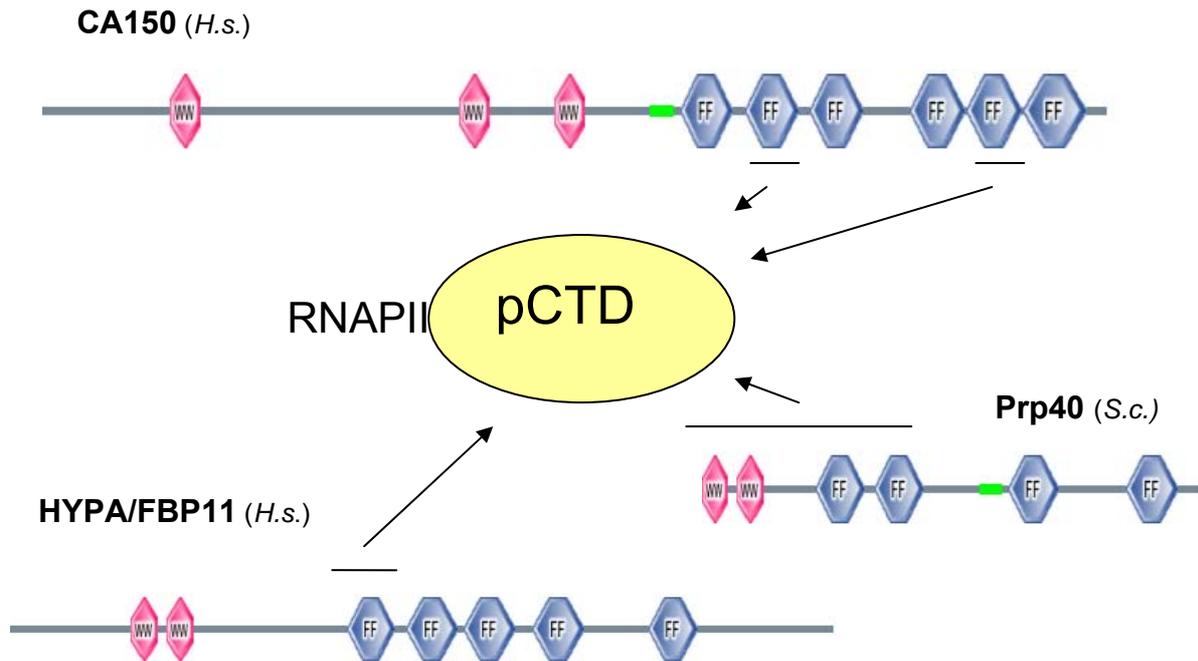


Abb. 4-3: Bekannte FF-Domänen Interaktionen mit der phosphorylierten CTD der RNAPII

HYPA/FBP11

Die erste FF-Domäne von HYPA/FBP11 (Formin-Binde-Protein 11), auch ein Spleißfaktor mit insgesamt fünf FF-Domänen, bindet an ein CTD-Peptid, welches an beiden Serinen phosphoryliert ist, mit einer Dissoziationskonstante von 50 μM (Allen *et al.* 2002). Die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II besteht aus Heptapeptid- Wiederholungen der Konsensus-Sequenz $\text{Y}^1\text{S}^2\text{P}^3\text{T}^4\text{S}^5\text{P}^6\text{S}^7$ und wird alternativ an Serin5 in Promotorregionen und Serin2 während der Elongation phosphoryliert (Kobor *et al.* 2002 & Komarnitsky *et al.* 2000), wobei immer noch unklar ist, welche Serine modifiziert werden müssen, um eine FF-Domänen-Bindung hervorzurufen.

Diese Erkennungsstelle, die hier für die erste FF-Domäne von HYPA/FBP11 beschrieben wurde, ist nicht in allen FF-Sequenzen konserviert, was auf unterschiedliche Bindspezifitäten hinweisen könnte. Sequenz-Alignments und phylogenetische Studien (siehe Abb. 4-4) ergaben, dass Prp40 und FBP11 keine orthologen Proteine sind, wie zuvor angenommen (Gasch *et al.* 2006).

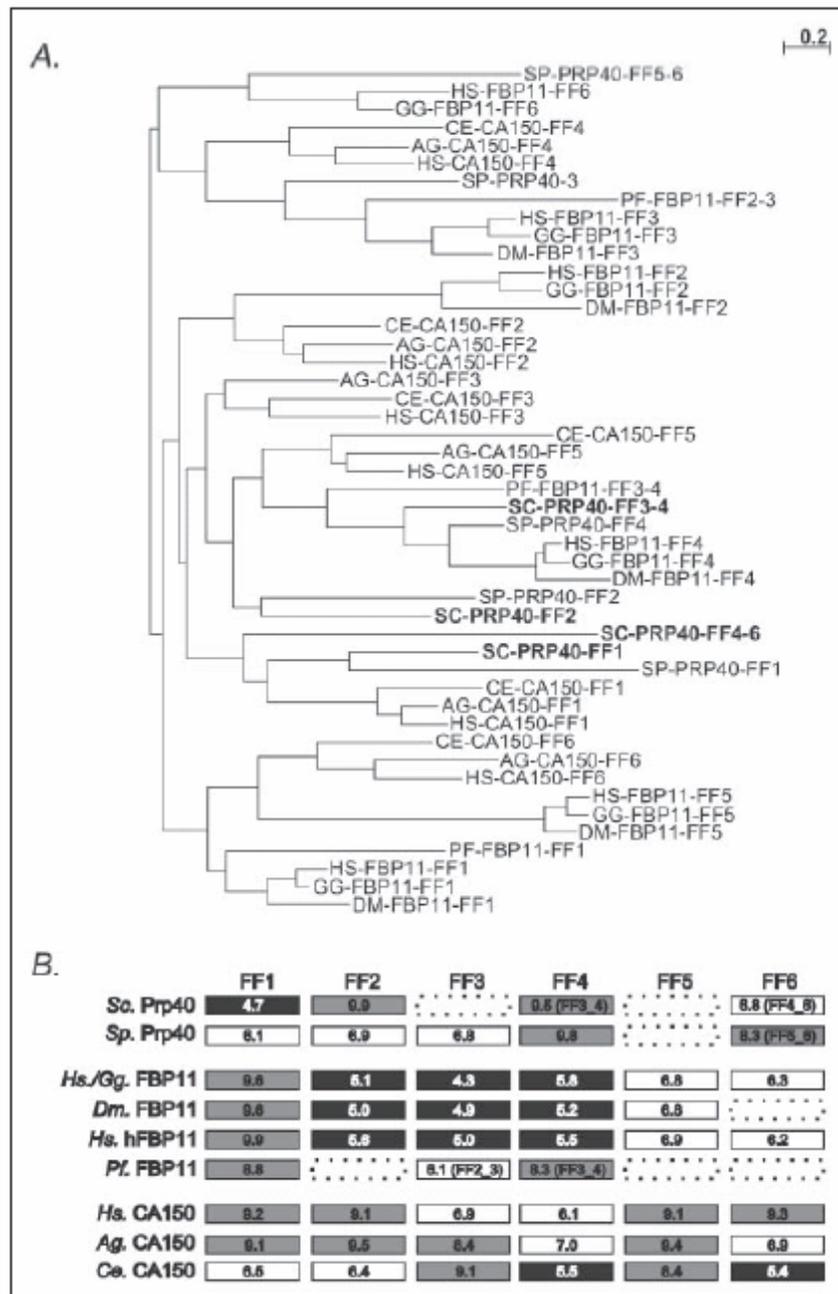


Abb. 4-4: Domänen-Komposition von Prp40, FBP11 und CA150 (aus Gasch *et al.* 2006)

A, Phylogenetische Darstellung der verwandten Proteine Prp40, FBP11 und CA150. Spezies sind folgend abgekürzt: *Ag.*: *Anopheles gambiae*, *Ce.*: *Caenorhabditis elegans*, *Dm.*: *Drosophila melanogaster*, *Gg.*: *Gallus gallus*, *Hs.*: *Homo sapiens*, *Pf.*: *Plasmodium falciparum*, *Sc.*: *Saccharomyces cerevisiae* und *Sp.*: *Schizosaccharomyces pombe*. FF-Proteine mit weniger als sechs FF-Domänen können zwei Nummern haben. Die erste Nummer entspricht der Position der Domäne in der Proteinsequenz (z. B. Prp40 FF4) und die zweite Nummer zeigt die Ähnlichkeit zu anderen FF-Domänen basierend auf ihrer phylogenetischen Verwandtschaft (z. B. Prp40 FF4_6). Die Skalierung zeigt eine Distanz von 0.2 Substitutionen pro Stelle. B, pKa Values von FF-Domänen in drei verwandten Proteinen Prp40, FBP11 und CA150. Weiße, graue und schwarze Rechtecke wurden für neutral ($6.0 < pKa < 8.0$), positiv geladene ($pKa > 8.0$) und negativ geladene ($pKa < 6.0$) FF-Domänen verwendet. Offene Rechtecke markieren nicht vorhandene FF-Domänen.

CA150

Bei dem Transkriptionsfaktor CA150 mit insgesamt sechs aufeinanderfolgenden FF-Domänen, der die RNAPII-Aktivität reguliert, wurde die Interaktion mit der CTD durch die zweite und fünfte FF-Domäne (siehe Abb. 4-3) identifiziert (Carty *et al.* 2000). Außerdem assoziieren die FF-Domänen von CA150 mit multiplen Transkriptions- und Spleiß- bezogenen Proteinen (siehe Tab. 4-4), wie Tat-SF1 (Tat-specific factor 1). Tat-SF1 ist essentiell für die Tat-aktivierte Transkription des HIV-1 LTR-Promotors und rekrutiert snRNPs zu aktiven Stellen der Transkription (Zhou *et al.* 1996; Fong *et al.* 2001). Die Rolle von Tat-SF1 liegt in der Verbindung von Spleißen und Transkription. Individuelle Domänen in den FF-Serien zeigen äquivalente und nicht kooperative Bindeigenschaften mit Bindeaffinitäten von 150-500 μ M, anstatt Bindekooperativität mit einem identifizierten Konsensus-Bindemotiv $(D/E)_{2/5}F/W/Y(D/E)_{2/5}$ für nicht phosphorylierte Liganden (Smith *et al.* 2004).

TABLE 1. Nuclear proteins identified by mass spectrometry as interacting with the FF domains of CA150

Protein	Locus identification	Domain(s) (n)
ATBF1	463	ZnF/C2H2 (23), homeobox (4)
+BR140 ^a	7862	ZnF/RBZ, PHD (2), BROMO, PWWP
+BTF	9774	
+CFIM	11052	RRM
DDX1	1653	SPRY, helicase (2, DEXD, HELIC)
DDX3	1654	Helicase (2, DEXD, HELIC)
DDX36	170506	Helicase (2, DEXD, HELIC), HA2
DDX9	1660	DSRM (2), helicase (2, DEXD, HELIC)
DNAPK	5591	FAT, PI3K, FATc
FBP2	8570	KH (4)
hnRNPK	3190	KH (3)
+hnRNPU	3192	SAP, SPRY
HRPT2	79577	Cdc73-like
KARP-1	10545	
MSI1	4440	RRM (2)
NONO	4841	RRM (2)
+NOPP140	9221	LisH, SRP40-like
+Nucleolin	4691	RRM (4)
+p150TSP	9646	TPR (9)
PARP-1	142	BRCT
+PD2	54623	Paf-1 like
+PNN	5411	
PSF	6421	RRM (2)
PRP8	10594	JAB/MPN
+S164	58517	PWI, RRM
SAP130	79595	
+SC35	6427	RRM
+SRm300	23524	AT hook
+SRP55	6431	RRM (2)
+SRP75	6429	RRM (2)
+TAT-SF1	27336	RRM (2)
+TCOF1	6949	LisH
+TRAP150	9967	
TRAP95	10025	WD40 (repeats)
+UBF-1	7343	HMG (6)
+ZNF265	9406	ZnF/RBZ

^a A + indicates proteins containing regions rich in serine or acidic residues.

Tab. 4-4: Durch Massenspektrometrie identifizierte Interaktionen mit CA150FF-Domänen (aus Smith *et al.* 2004). Die FF1-6 und FF5-6 Domänen von CA150 wurden als Bait verwendet.

Da von den FF-Domänen von CA150 auch bekannt ist, dass sie an die phosphorylierte CTD der RNA Polymerase II binden (Carty *et al.* 2000), wird angenommen, dass CA150 durch die gleichzeitige Erkennung von solchen Motiven in Tat-SF1 und der phosphorylierten CTD Transkriptions- und Spleißfaktoren zu der aktiven RNAPII rekrutieren könnte.

p190-Rho GTPase



FF-Domänen sind auch präsent in der p190-Familie der cytoplasmatischen Rho GTPase aktivierenden Proteine (GAPs). Der Serum-gesteuerte Transkriptionsregulator TFII-I ist ein spezifischer Interaktionspartner der p190 RhoGAP FF-Domänen. p190 bindet TFII-I im Cytoplasma über die FF-Domänen, aber auf PDGF-Rezeptor vermittelte Phosphorylierung einer FF-Domäne, wird TFII-I von p190 abgegeben und translokalisiert in den Nukleus, wo es die Transkription von Serum-induzierten Genen, wie c-fos, aktivieren kann. Dies deutet auf eine Rolle der FF-Domänen in der Phosphorylierungs-vermittelten Signaltransduktion hin (Jiang *et al.* 2005). Hier muss allerdings erwähnt werden, dass diese FF-Domänen sich erheblich in Sequenz und Struktur zu den FF-Domänen der WW/FF-Familie unterscheiden.

Bekannte Interaktion der Prp40FF1-Domäne mit crn-TPR von Clf1



Clf1/Syf3p ist ein essentielles und gut konserviertes multifunktionales Protein, involviert in Zellzyklus-Progression, prä-mRNA-Spleißen und Initiation der DNA-Reparatur in Hefe. Clf1 besteht aus mehreren crn-TPR (crooked neck-like tetratricopeptidwiederholungen)-Motiven. Mit einem N-terminalen crn-TPR-Peptid von Clf1

wurde von Gasch *et al.* 2006 eine Bindestelle in der FF1-Domäne von Prp40 gefunden (siehe Abb. 4-5), die sich unterscheidet von der früher identifizierten CTD RNAPII-Bindestelle in der FF1-Domäne von FBP11 (Allen *et al.* 2002). Die erste FF-Domäne von Prp40 zeigte auch keine Interaktion mit drei unterschiedlichen Peptiden der CTD von RNAPII, was darauf zurückzuführen ist, dass die Bindestelle in der ersten FF-Domäne von Prp40 vorwiegend negativ geladen und so ungeeignet für eine Bindung mit phosphorylierten Peptidensequenzen ist (siehe Abb. 4-4). Im Vergleich zu der ersten FF-Domäne zeigte die vierte FF-Domäne von Prp40 keine Bindung zu dem getesteten TPR-Motiv von Clf1, was vermuten lässt, dass die in Prp40 vorhandenen FF-Domänen unterschiedliche Bindenspezifitäten besitzen und so funktionell nicht äquivalent sind. Dies wird unterstützt durch Sequenzanalyse und phylogenetische Studien, die zeigten, dass Prp40 und FBP11 keine orthologen Proteine sind und so eine unterschiedliche Bindenspezifität, gezeigt durch ihre FF1-Domänen, zulassen (siehe Abb. 4-4). Es wird angenommen, dass zumindest zwei räumlich getrennte Interaktionsoberflächen in FF1-Domänen existieren, die entstanden sind um verschiedene Bindemotive zu erkennen (siehe Abb.4-5).

Bei Vergleich der Clf1-Sequenz mit dem Luc7-Bindemotiv, konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden (Abb. 4-6). Eher wurden ähnliche Motive im C-terminalen Teil gefunden.

DISKUSSION

T-COFFEE, Version 1.41(Fri Jun 28 14:24:48 MDT 2002)
 Notredame, Higgins, Heringa, JMB (302)pp205-217,2000
 CPU TIME:0 sec.
 SCORE=40

```

*
BAD AVG GOOD
*
a : 36
b : 43
c : 39
d : 41

FF1 KEEAEKEFITMLKENQ-VDSIW-----SFSRIISELGTDRPRYWMV-DDDPLWKKEMFEKYLNS
FF2 TSKFKEAFQKMLQNNNS-HIKYY-----TRWPTAKRLIADEPIYKH-SVNEKTKRQTFQDYIDT
FF3 DRIARDNFKSLLREVPIKIKAN-----TRWSDIYPHIKSDPRFLHMLGRNGSSCLDLFLDFVDE
FF4 LEQKKHYFWLLLQ-----RTYTKTGKPKPSTWDLASKELGESLEYKA-LGDEDNIRRQIFEDFKPE

      . . * : * :
      : : : : : : :
    
```

```

FF1: KEEAEKEFITMLKENQ-VDSIW-----SFSRIISELGTDRPRYWMV-DDDPLWKKEMFEKYLNS (132-188)
FF2: TSKFKEAFQKMLQNNNS-HIKYY-----TRWPTAKRLIADEPIYKH-SVNEKTKRQTFQDYIDT (210-257)
FF3: DRIARDNFKSLLREVPIKIKAN-----TRWSDIYPHIKSDPRFLHMLGRNGSSCLDLFLDFVDE (355-413)
FF4: LEQKKHYFWLLLQ-----RTYTKTGKPKPSTWDLASKELGESLEYKA-LGDEDNIRRQIFEDFKPE (493-552)
    
```

Abb. 4-7: FF-Domänen Alignment von Prp40

Unteres Alignment: Rahmen markiert konserviertes DXR(Y/F)-Motiv in der 3₁₀-Helix der Domänen FF1 und FF3. Rot markiert konservierte Phenylalanin-Reste. Grün markiert beteiligte AS in der FF1-Domäne bei Bindung des crn-TPR-Peptids von Clf1 (siehe Abb.4-5). Nummern geben AS-Position in der Prp40-Sequenz an. Diese Alignment wurde vorgenommen nach T-COFFEE Alignment (siehe oben) mit Angabe von konservierten AS (siehe Legende).

Zusammenfassung der bekannten FF-Interaktionen

	FF-Konsensussequenzen				
	Snu71(S.c.)	Luc7 (S.c.)	Clf1(S.c.)	pCDT	Tat-SF1(H.s.)
S.c. Prp40 FF1	-	ΦF/H/LxK/RxG/H/L	crn-TPR1	-	
S.c. Prp40FF2-3	NDVHY(DHH...)	-			
S.c. Prp40 WWFF1-2				phospho-CTD	
H.s. HYP/GBP11 FF1				SYpSPTpSPSYpSPTpSPSY	
H.s. CA150 FF2 & FF5				phospho-CTD	(D/E) _{2/5} F/W/Y(D/E) _{2/5}

Tab. 4-5: Zusammenfassung von bekannten FF-Konsensussequenzen

Gestrichelte Felder markieren nicht getestete Interaktionen. Graue Felder markieren ungleiche Spezies. – markiert negativ getestete Interaktion. S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*. H.s. *Homo sapiens*. Für die Snu71-Binderegion sind noch in der Sequenz folgende AS in Klammern angegeben. p steht für phosphoryliert.

Zusammenfassend ergeben die Vergleiche mit allen bisher charakterisierten Bindesequenzen für FF-Domänen keine Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit für Luc7 identifizierten Motiv. Es enthält weder potentielle Phosphorylierungsstellen in der Sequenz, noch enthält sie aromatische Aminosäuren in Verbindung von flankierenden sauren, negativ geladenen Aminosäuren, wie in Tat-SF1. Sogar zu

Sequenzen, die die gleiche FF-Domäne betreffen, wie bei dem crn-TPR-Peptid in Clf1 ist eine Homologie nicht erkennbar (siehe Tab. 4-5). Das gleiche gilt im Prinzip für die Binderegion in Snu71. Erweitert man jedoch die kartierte Peptidsequenz (NDVHY → **D**) um die nächstfolgende Aminosäure, würde dies dem für die FF-Domänen von CA150 identifizierten Motiv (**D/E**)_{2/5}F/W/**Y(D/E)**_{2/5} entsprechen, das charakterisiert ist durch eine zentrale aromatische Aminosäure flankiert im Abstand von 2-5 Aminosäuren durch eine der beiden sauren Aminosäuren. Dies entspricht allerdings einer vagen Beobachtung und muss durch weitere Versuche analysiert werden.

Bioinformatische Auswertung der Interaktionsregionen

Die Bioinformatische Auswertung der identifizierten Interaktionsregionen bzw. Motive von Snu71 und Luc7 sollte Aufschluss über die Spezifität dieser Interaktionen mit der FF-Domäne geben.

So ergab die Suche nach der Interaktionsregion von Snu71 (NDVHY) unter anderen zwei interessante Proteine mit gleicher oder ähnlicher Sequenz, die auch eine Rolle im Spleißmechanismus besitzen. So ist das U1snRNP-Protein Msl5 (BBP) auch eine Komponente des Commitment-Komplexes der Hefe, von dem bekannt ist mit den WW-Domänen von Prp40 zu interagieren (Abovich *et al.* 1997). Bei einem weiteren Spleißfaktor, dem U4/U6-U5snRNP-Protein Prp6 tritt eine ähnliche Sequenz mit vier Aminosäuren (DVHY) auf. So könnten die gefundenen Sequenzen wie in Snu71 potentielle Erkennungsstelle für FF-Domänen, vorrangig FF2-3, in diesem Protein sein.

Die Suche im Hefegenom nach der Interaktionsregion von Luc7 (FLGKIH), ergab unter anderen ein interessantes U2snRNP-Protein Prp9, allerdings nur mit 4 übereinstimmenden Aminosäuren (GKIH).

Bei der Suche nach dem Luc7-Motiv, wurden unter anderen auch Proteine mit Funktion im Spleißen detektiert und mit verschiedenen Variationen des Motivs beobachtet (siehe Abb. 3-21). Die Variationen wurden vorgenommen, um für das

DISKUSSION

Bindungsepitop optimierte Ergebnisse in der Datenbank zu bekommen, da die Positionen in der Sequenz nicht unbedingt unabhängig voneinander sein müssen. Zum Beispiel könnte an einer Position Leucin gegen Phenylalanin ausgetauscht sein und die Bindung findet statt, wird aber zusätzlich noch ein Austausch von Arginin gegen Lysin statt, bindet das Protein eventuell nicht mehr.

Table 1. Proteins Characterized by Mass Spectrometry

Protein	SGD ORF Name*	Calc. MW (kDa)	Number of Peptides Seq.
Known splicing proteins			
U1 snRNP proteins			
Prp39	YML046W	74.7	3
Snu71	YGR013W	71.3	3
Prp40	YKL012W	69.1	7
Prp42	YDR235W	65.1	2
Nam8	YHR086W	57	2
Snu56	YDR240C	56	4
Snp1	YIL061C	34.5	5
Mud1	YBR119W	34.4	3
Yhc1	YLR298C	32	2
Luc7	YDL067C	30	2
U2 snRNP proteins			
→ Rse1	YML049C	153.7	6
→ Hsh155	YMR288W	110	9
Prp9	YDL030W	63	7
Cus1	YMR240C	50.3	3
Prp21	YJL203W	33	13
Cus2	YNL286W	32.3	4
Prp11	YDL043C	29.9	11
Lea1	YPL213W	27.2	10
→ Hsh49	YOR319W	24.5	9
→ Snu17	YIR005W	17.1	7
→ Msl1	YIR009W	12.8	7
U4/U6•U5 snRNP proteins			
→ Prp8	YHR165C	279.5	22
→ Brr2	YER172C	246.1	30
→ Snu114	YKL173W	114	18
→ Prp6	YBR055C	104.2	29
Snu66	YOR308C	66.4	15
Prp31	YGR091W	56.3	12
Prp3	YDR473C	56	29
Prp4*	YPR178W	56	12
Spp381	YBR152W	34	3
Prp38	YGR075C	27.9	7
Snu23	YDL098C	22.6	13
Dib1	YPR082C	16.7	5
Snu13	YEL026W	13.5	3
Penta-snRNP specific proteins			
Syf1	YDR416W	100.2	8
Syf3	YLR117C	82.4	12
→ Cef1	YMR213W	67.7	7
→ Prp19	YLL036C	56.6	13
Sad1	YFR005C	52.2	5
Prp46	YPL151C	50.6	7
Prp45	YAL032C	42.4	18
Ecm2	YBR065C	40.2	1
Cwf2	YDL209C	38.3	11
Isy1	YJR050W	28.0	8
Syf2	YGR129W	24.8	2
Snt309	YPR101W	20.7	6
Ntc20	YBR188C	15.8	3
Sm/Lam proteins			
SmB1	YER029C	22.4	14
SmD1	YGR074W	16.2	8
SmD2	YLR275W	12.8	5
SmD3	YLR147C	11.2	5
SmE1	YOR158C	10.4	1
SmF	YPR182W	10	2
SmG	YFL017W-A	8.5	2
Lsm2	YBL026W	11.2	2

Tab. 4-6: Spleißfaktoren in Hefe (aus Stevens *et al.* 2002) Pfeile markieren Spleißfaktoren, die bei der bioinformatischen Auswertung der Motiv-Variationen von Luc7 verwendet wurden

So ergab eine erste Motivsuche mit [FIL]-[FHL]-x-[KR]-x-[GHL] unter anderen einige bekannte Spleißfaktoren (siehe Tab. 4-6), die mit verschiedenen Variationen des Motivs beobachtet wurden. Mit allen Variationen wurde das U2snRNP-Protein Rse1 und mit fast allen das U4/U6 U5-Protein Brr2 gefunden (siehe Abb. 3-21), welches potentielle Kandidaten für eine FF1-Domänen-Bindung sein könnten.

Funktion der FF-Domänen

Die Deletion der Domänen FF3 und FF4 resultierte in einem Wachstumsdefekt (Abb. 3-25). Daraus lässt sich schließen, dass irgendein Mechanismus in der Hefezelle betroffen sein muss und dass diese Domänen nicht essentiell für das Überleben der Hefe sind. Bei alleiniger Deletion der FF4-Domäne wird ein letaler Effekt beobachtet (Tab. 3-8). Vergleichsweise wurde auch schon bei den Y2H-Experimenten und auch bei der Proteinexpression beobachtet, dass Konstrukte mit der FF3-Domäne am Ende instabil waren. Die Domänen FF1 und FF2 scheinen absolut essentiell zu sein. Dies würde allerdings bedeuten, wenn man die Bindung zu Snu71 betrachtet, das im Y2H-Versuch an die Domänen FF2-3 bindet, dass diese Interaktion für die Hefezelle nicht von besonderer Bedeutung ist. Allerdings bleibt noch zu klären, ob es eventuell Interaktionsstellen für die FF1-Domäne im N-terminalen Teil von Snu71 gibt (z. B. mit Peptidarrays). Zudem sind die Wechselwirkungen innerhalb des U1snRNP noch zu berücksichtigen, wobei noch unklar ist, wie dieser Komplex genau zusammengehalten wird. Dabei könnten auch andere Proteine die Interaktionspartner stabilisieren. Ob nun der Wachstumsdefekt der Mutante Δ FF3-4 auf eine Beeinflussung des Spleißens zurückzuführen ist, sollte mit einem funktionellen Spleißtest überprüft werden (Abb. 3-26). Dazu wurden zwei Intron-Hefegene ausgewählt, anhand derer, durch RT-PCR, ein korrekter Spleißvorgang detektiert wurde (Abb. 3-27). Allerdings bleibt zu klären, ob diese beiden Intron-Gene, von insgesamt 275 bei *Saccharomyces cerevisiae*, repräsentativ sind. Deshalb wurde in Kollaboration mit Manuel Ares (Santa Cruz, USA) ein genomweiter Spleißtest (Microarray) veranlasst, der derzeit noch durchgeführt wird. Mit herkömmlichen Hefe-Microarray-Chips können außerdem Expressionsprofile der

genannten Mutanten erstellt werden, falls der Spleißtest negativ ausfällt, d.h. kein genomweiter Spleißdefekt festgestellt werden kann.

Eine bedeutende Frage ist, ob jede FF-Domäne durch eine andere austauschbar ist? Dazu wurden Doppel-Domänen-Konstrukte hergestellt, basierend auf der vitalen Δ FF3-4-Mutante, die zweimal die FF1-Domäne bzw. zweimal die FF2-Domäne enthalten (Tab. 3-8). Erste Hinweise deuten darauf hin, dass diese Konstrukte letal sind, was bedeuten würde, dass jede FF-Domäne in der Anordnung spezifisch ist. Dies wird auch durch Gasch *et al.* bekräftigt, die darauf hindeuten, dass FF1 und FF2 sich von ihrer Funktionalität unterscheiden könnten, denn FF1 ist vorwiegend negativ geladen (siehe Abb. 4-4) und daher ungeeignet phosphorylierte Peptide zu binden, eher geeignet wäre für eine Bindung von phosphorylierten Peptiden die FF2-Domäne.

Die Rolle von Prp40 als coupling Protein zwischen Transkription und mRNA-Prozessierung (Spleißen)

Immer mehr Publikationen weisen darauf hin, dass eine direkte Verbindung zwischen spezifischen Schritten der Transkription (Initiation, Elongation und Termination) und der mRNA-Prozessierung (Capping, Spleißen, Polyadenylierung und RNA-Editing) bei Eukaryoten stattfindet, d.h. die mRNA-Prozessierung verläuft bereits kotranskriptionell an der wachsenden mRNA (McCracken *et al.* 1997; Misteli *et al.* 1999; Maniatis *et al.* 2002 & Proudfoot *et al.* 2002). So koordinieren wahrscheinlich auch die meisten WW/FF-Proteine durch Bindung von Spleißfaktoren und auch der RNAPII die Verbindung der mRNA-Synthese und Spleißen (Lin *et al.* 2004).

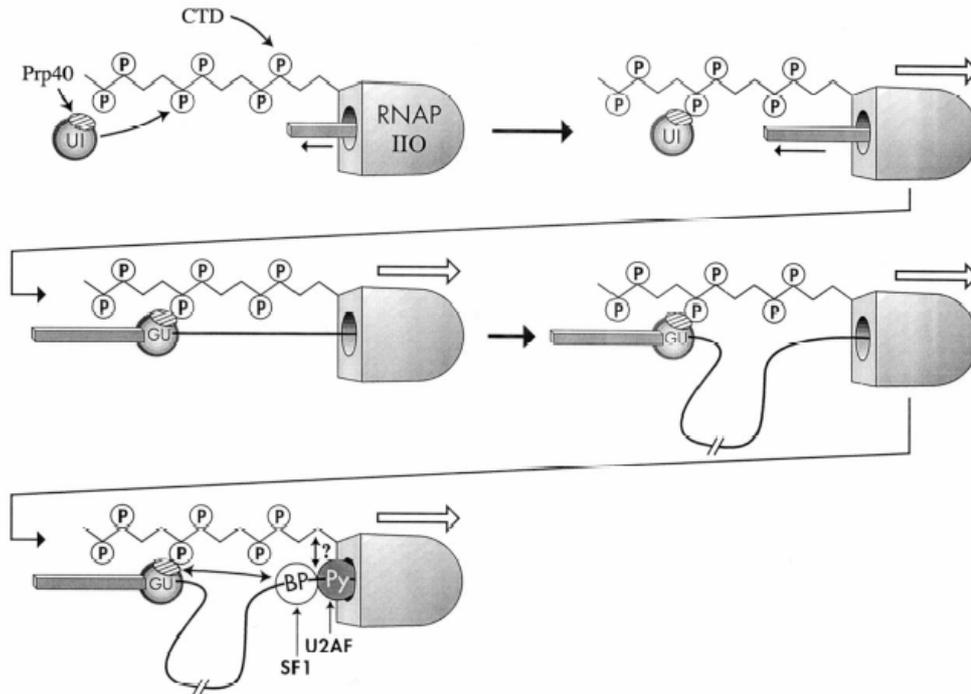


Abb. 4-8: Hypothese zur Verbindung von Transkription und Spleißen (aus Goldstrohm *et al.* 2001)

Dargestellt ist die RNA PII mit dem wachsenden Transkript aus dem Transkriptionskanal. Das U1snRNP wird in den Prozess einbezogen durch die Bindung von Prp40 an die hyperphosphorylierte CTD der RNA PII. Wenn die 5' Spleißstelle aus dem Transkriptionskanal der Polymerase II tritt, trifft sie direkt auf die pCTD, gebunden an Prp40. Wenn die 3' Spleißstelle aus dem Transkriptionskanal tritt, kann Prp40 mit dem Branchpointprotein (BP/MSI5) interagieren und den Komplex zum Herausschneiden des Introns stabilisieren.

Diese Arbeit unterstützt die These, dass auch Prp40 als Bindeprotein zwischen diesen beiden Ereignissen eine wichtige Rolle spielt, wobei die FF-Domänen direkt beteiligt sind. Durch die Interaktion mit der phosphorylierten CTD der RNAPII und die gleichzeitige Bindung von anderen Spleißfaktoren, wie die U1snRNP-Proteine Snu71 und Luc7 aus dieser Arbeit, kann das U1snRNP als Initiationsschritt für den gesamten Spleißkomplex an die sich noch in der aktiven Transkription befindlichen mRNA, herangeführt werden.

Offene Fragen, Strategien und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, lassen die Vermutung zu, dass die drei U1snRNP Proteine, Prp40, Snu71 und Luc7, einen Subkomplex innerhalb des U1snRNP vermittelt durch die FF-Domänen von Prp40 in der Hefe bilden, wobei verschiedene FF-Domänen an Snu71 und Luc7 binden. Die oft in Serie vorkommenden FF-Domänen könnten zur der Vermutung veranlassen, dass durch die Hintereinerschaltung der Module eine Verstärkung der Bindung erreicht wird.

Dadurch könnten mehrere schwache Domänen einen kooperativen Effekt bei der Bindung erzielen. Allerdings ergab diese Arbeit ein anderes Bild der FF-Domänen von Prp40. So scheinen verschiedene Domänen für verschiedene Ligandenbindungen zuständig zu sein, was auch durch andere Publikationen bestätigt wird.

Es liegt nahe, dass Prp40 multiple Interaktionen von verschiedenen Bindepartnern vermittelt und so eine zentrale Rolle im Spleißosom spielt. Die Tatsache, dass die FF-Domänen von Prp40 anscheinend phosphorylierte und unphosphorylierte Bindesequenzen erkennen, und noch völlig unklar ist, ob und wie dafür verschiedene FF-Domänen verantwortlich sind, macht diese Domäne zu einem hochinteressanten Forschungsobjekt. Noch dazu wurde bisher kein einheitliches Bindemotiv für FF-Domänen-Interaktionspartner von Prp40 gefunden (Clf1, Luc7, Snu71 & pCTD), sogar bei Bindepartnern der gleichen Domäne nicht (Clf1 und Luc7). Zwar zeigen die hier untersuchten FF-Domänen unter *in vitro* Bedingungen (Peptidarrays) alle ähnliche Bindemuster in Luc7, aber erste *in vivo* Deletionen der FF-Domänen lassen vermuten, dass die Domänen nicht austauschbar sind.

Das Y2H-Experiment gibt zwar Auskunft über die mögliche Interaktion von zwei Proteinen, jedoch keine Informationen darüber, wie diese Interaktion stattfindet. Deshalb sind detaillierte Untersuchungen der Struktur der beteiligten Proteine nötig. Dazu sind Studien mit gereinigten und synthetisch hergestellten Peptiden geplant. Speziell wäre es interessant die erste FF-Domäne von Prp40 mit Peptiden von Luc7 in NMR-Studien zu testen, da die Ergebnisse aus den Peptidarrays sehr viel versprechend sind.

Letztendlich fehlt auch noch der Beweis, dass die drei Proteine Prp40, Snu71 und Luc7 über die FF-Domänen wirklich einen Komplex innerhalb des U1snRNP bilden. Dazu wurden schon in Kooperation mit Christian Kambach (Paul Scherrer Institut Villingen, Schweiz) begonnen, alle drei Proteine für Kristallisationsversuche, aufzureinigen, um mittels Ko-Kristallisation Aufschluss über deren strukturellen Zusammenhalt zu erlangen.

LITERATUR

Abovich, N., Liao, X.C., & Rosbash, M. (1994)

The yeast MUD2 protein: An interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition

Genes & Development 8, 843-854

Abovich, N., & Rosbash, M. (1997)

Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals

Cell 89, 403-412

Allen, M., Friedler, A., Schon, O. and Bycroft, M. (2002)

The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11

J. Mol. Biol. 323, 411-416

Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., & Ponting, C.P. (2001)

Protein Repeats: Structures, Functions, and Evolution

J. Structural Biology 134, 117-131

Ares, M. Jr., Grate, L., Pauling, M.H. (1999)

A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA.

RNA. 5(9):1138-9

Ares, M. Jr. and Proudfoot, J. (2005)

The Spanish Connection:

Transcription and mRNA Processing Get Even Closer

Cell Review, Vol. 120, 163-166

Bedford, M.T. & Leder, P. (1999)

The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains

TIBS 24, 264-265

Bedford, M.T., Reed, R., Leder, P. (1998)

WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif

Proc Natl Acad Sci U S A, 95(18):10602-7

Ben-Yehuda, S., Dix, I., Russell, C.S., McGarvey, M., Beggs, J.D., & Kupiec, M. (2000)
Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA Splicing in *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics 156, 1503-1517

Berglund, J.A., Fleming, M.L., & Rosbash, M. (1998)
The KH domain of the branchpoint sequence binding protein determines specificity for pre-mRNA branchpoint sequence
RNA 4, 998-1006

Blencowe, B.J., & Ouzounis, C.A., (1999)
The PWI motif: a new protein domain in splicing factors
TIPS 24, 179-180

Bluthner, M., Mahler, M., Muller, D.B., Dunzl, H., Bautz, F.A. (2000)
Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/ScI-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides
J Mol Med. 78(1):47-54

Burchett, S.A., Flanary, P., Aston, C., Jiang, L., Young, K.H., Uetz, P., Fields, S., Dohlman, H.G. (2002)
Regulation of stress response signaling by the N-terminal dishevelled/EGL-10/pleckstrin domain of Sst2, a regulator of G protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae*
J. Biol. Chem. 277(25), 22156-22167

Burge C.B., Padgett R.A., Sharp P.A. (1998)
Evolutionary fates and origins of U12-type introns
Mol Cell,2(6):773-85

Burge, C.B., Tuschl, T., & Sharp, P.A. (1999)
Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes
In *RNA World II*, edited by Gesteland, R.F., Cech, T.R., Atkins, J.F., CSHL Press NY, 525-560

Camasses, A., Bragado-Nilsson, E., Martin, R., Seraphin, B., Bordonne, R. (1998)
Interactions within the yeast Sm core complex: from proteins to amino acids.
Mol Cell Biol. 18(4):1956-66

- Carty, S.M., Goldstrohm, A.C., Sune, C., Garcia-Blanco, M.A., Greenleaf, A.L. (2000)
Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II
Proc Natl Acad Sci USA 97 (16), 9015-9020
- Cheng, S.C., Abelson, J. (1987)
Spliceosome assembly in yeast
Genes Dev. 1(9):1014-27
- Chung, S., Mc Lean, M.R., & Rymond, B.C. (1999)
Yeast ortholog of the Drosophila crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition
RNA 5, 1042-1054
- Clark, T.A., Sugnet, C.W., Ares, M. Jr. (2002)
Genomewide Analysis of mRNA Processing in Yeast Using Splicing-Specific Microarrays
Science Vol 296
- Colot, H.V., Stutz, F., & Rosbash, M. (1996)
The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex
Genes & Development 10, 1699-1708
- Du, H., & Rosbash, M. (2001)
Yeast U1 snRNP-pre-mRNA complex formation without U1 snRNA-pre-mRNA base pairing
RNA 7, 133-142
- Duncan, M. C., Cope, M. J., Goode, B. L., Wendland, B., and Drubin, D. G. (2001)
Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex
Nat. Cell. Biol. 3, 687-90.
- Fortes, P., Bilbao-Cortes, D., Fornerod, M., Rigaut, G., Raymond, W., Seraphin, B., Mattaj, I.W. (1999)
Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition
Genes And Development 13, 2425-2438
- Fong, Y.W., Zhou, Q. (2001)
Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation
Nature, 414(6866):929-33

Gasch, A., Wiesner, S., Martin-Malpartida, P., Ramirez-Espain, X., Ruiz, L., Macias, M.J. (2006)
The structure of Prp40 FF1 domain and its interaction with the crn-TPR1 motif of Clf1 gives a new insight into the binding mode of FF domains
J Biol Chem. ;281(1):356-64

Gavin, A.-C., et al. (2002)
Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes
Nature 415, 141-147

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheise, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996)
Life with 6000 Genes
Science 274, 546-567

Goldstrohm, A.C., Albrecht, T.R., Sune, C., Bedford, M.T., Garcia-Blanco, M.A.(2001)
The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1
Molecular and Cellular Biology 21 (22), 7617-7628

Görlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R.A., Mattaj, I.W., Izaurralde, E. (1996)
Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export
Cell 87, 21-32

Görnemann, J., Kotovic, K.M. , Hujer, K., Neugebauer, K.M. (2005)
Contranscriptional Spliceosome Assembly Occurs in a Stepwise Fashion and Requires the Cap Binding Complex
Molecular Cell, Vol. 19, 53-63

Hudson, J.R. Jr, Dawson, E.P., Rushing, K.L., Jackson, C.H., Lockshon, D., Conover, D., Lanciault, C., Harris, J.R., Simmons, S.J., Rothstein, R., Fields, S. (1997)
The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form
Genome Res, 7(12):1169-73

Gottschalk, A., et al. (1998)
A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveal five novel proteins
RNA 4, 374-393

Ho, Y. et al. (2002)

Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry
Nature 415, 180-183

Ito, T., et al. (2000)

Toward a protein-protein interaction map of budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins
Proc Natl Acad Sci USA 97, 1143-1147

Ito, T., Chiba, T. and Yoshida, M. (2001)

A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome
Proc Natl Acad Sci USA 98 (8), 4569-4574

Izaurrealde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E. & Mattaj, I.W. (1995)

A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing
Cell 78, 657-668

Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C., & Mattaj, I.W. (1995)

A cap-binding protein complex mediating U snRNA export
Nature 376, 709-712

Jiang, W., Sordella, R., Chen, G.C., Hakre, S., Roy, A.L., Settleman, J. (2005)

An FF domain-dependent protein interaction mediates a signaling pathway for growth factor-induced gene expression
Mol Cell 17, 23-35

Kambach, C., Walke, S., & Nagai, K. (1999)

Structure and assembly of the small nuclear ribonucleoprotein particles
Current Opinion in Structure Biology 9, 222-230

Kao, H.Y., & Siliciano, P.G. (1996)

Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle
Molecular and Cellular Biology 16, 960-967

Kastner, B., Bach, M., & Lührmann, R. (1990)

Electron microscopy of small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) particles U2 and U5: evidence for a common structure-determining principle in the major U snRNP family
Proc Natl Acad Sci USA 87, 1710-1714

Käufer, N.E., & Potashkin, J. (2000)

Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding and mammals
Nucleic Acids Research 28 (16), 3003-3010

Keller, W., & Minvielle-Sebastia, L. (1997)

A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing
Current Opinion in Cell Biology 9, 329-336

Kobor, M.S., Greenblatt, J. (2002)

Regulation of transcription elongation by phosphorylation
Biochim. Biophys. Acta 1577, 261-275

Komarnitsky, P., Cho, E.J., Buratowski, S. (2000)

Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription.
Genes Dev, 14(19):2452-60

Krämer, A. (1992)

Purification of splicing factor SF1, a heat-stable protein that functions in the assembly of a presplicing complex
Mol. Cell. Biol. 12, 4545-4552

Kretzner, L., Rymond, B.C., & Rosbash, M. (1987)

S. cerevisiae U1 RNA is large and has limited primary sequence homology to metazoan U1 snRNA
Cell 50, 593-602

Lewis, J.D., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C., & Mattaj, I.W. (1996)

A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with cap-proximal 5' splice site
Genes & Development 10, 1683-1698

McCracken S., Fong N., Yankulov K., Ballantyne S., Pan G., Greenblatt J., Patterson S.D., Wickens M., Bentley DL. (1997)

The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription.
Nature, 385(6614):357-61

Michaud, S. & Reed, R. (1991)

An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway
Genes & Development 5, 2534-2546

Michaud, S. & Reed, R. (1993)

A functional association between the 5' and 3' splice site is established in the earliest prespliceosome complex (E) in mammals

Genes & Development 7, 1008-1020

Misteli, T., Spector, D.L. (1999)

RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo.

Mol Cell, 3(6):697-705

Morris, D.P. & Greenleaf, A.L. (2000)

The splicing factor Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II

J. of Biological Chemistry 275 (51), 39935-39943

Murphy, M.W., Olson, B.L., Siliciano, P.G. (2004)

The Yeast Splicing Factor Prp40p Contains Functional Leucine-Rich Nuclear Export Signals That Are Essential for Splicing

Genetics 166:53-65

Nagai, K., & Mattaj, I.W. (1994)

RNA-protein interactions in the splicing snRNPs

Oxford Univ. Press, 150-177

Nelissen, R.L., Will, C.L., van Venrooij, W.J., & Lührmann, R. (1994)

The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1snRNPs is mediated in part by common UsnRNP proteins

EMBO J. 13, 4113-4125

Neubauer, G., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Seraphin, B., Lührmann, R., & Mann, M. (1997)

Identification of the proteins of the yeast U1 small nuclear ribonucleoprotein complex by mass spectrometry

Proc Natl Acad Sci USA 94, 385-390

Newman, A.J., Lin, R.J., Cheng, S.C., Abelson, J. (1985)

Molecular consequences of specific intron mutations on yeast mRNA splicing in vivo and in vitro.

Cell, 42(1):335-44

Newman, J.R., Wolf, E., & Kim, P.S.A. (2000)

A computationally directed screen identifying interacting coiled coils from *Saccharomyces cerevisiae*

Proc Natl Acad Sci USA 97, 13203-13208

Pawson, T., Nash, P. (2003)

Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains
Science Review Vol 300

Rain, J.C., Rafi, Z., Rhani, Z., Legrain, P., & Krämer, A. (1998)

Conservation of functional domains involved in RNA binding and protein-protein interactions in human and *Saccharomyces cerevisiae* pre-mRNA splicing factor SF1
RNA 4, 551-565

Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B., & Lührmann, R. (1999)

Spliceosomal U snRNP assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner
Mol. Cell. Biol. 19, 6554-6565

Reed, R. (2000)

Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing
Current Opinion in Cell Biology 12, 340-345

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., & Seraphin, B. (1999)

A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration
Nat. Biotechnology 17, 1030-1032

Roiha H., Shuster E.O., Brow D.A., Guthrie C.

Small nuclear RNAs from budding yeasts: phylogenetic comparisons reveal extensive size variation.
Gene, 82(1):137-44

Ruby, S.W., & Abelson, J. (1988)

Pre-mRNA splicing in yeast
Science 242, 1028-1035

Ruskin, B., Zamore, P.D., & Green, M.R. (1988)

A factor U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly
Cell 52, 207-219

Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. (2000)

A network of protein-protein interactions in yeast
Nature Biotechnology 18, 1257-1261

Seraphin, B. (1995)

Sm and Sm-like proteins belong to a large family: Identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs
EMBO J. 14, 2089-2098

Seraphin, B., Kretzner, L., Rosbash, M. (1988)

A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site.
EMBO J, 7(8):2533-8

Seraphin, B., & Rosbash, M. (1989)

Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and in splicing
Cell 59, 349-358

Seraphin, B., & Rosbash, M. (1989)

Mutational analysis of the interactions between U1 small nuclear RNA and pre-mRNA of yeast
Gene 82, 145-151

Seraphin, B., & Rosbash, M. (1991)

The yeast branchpoint sequence is not required for formation of a stable U1 snRNA-pre-mRNA complex and is recognized in absence of U2 snRNA
EMBO J. 10, 1209-1216

Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C. and Weinberg, R.A. (1992)

Molecular-cloning of cDNAs encoding the gap-associated protein P190-implications for a signaling pathway from ras to the nucleus
Cell 69, 539-549

Siliciano, P.G., & Guthrie, C. (1988)

5' splice site selection in yeast: Genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements
Genes & Development 2, 1258-1267

Siliciano, P.G., Jones, M.H., & Guthrie, C. (1987)

Saccharomyces cerevisiae has a U1-like small nuclear RNA with unexpected properties
Science 237, 1484-1487

Smith, M.J., Kulkarni, S., Pawson, T. (2004)

FF domains of CA150 bind transcription and splicing factors through multiple weak interactions.
Mol Cell Biol, 24(21):9274-85

Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., Ares, M. Jr. (1999)

Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*.
RNA, 5(2):221-34

Stark, H., Dube, P., Lührmann, R. & Kastner, B. (2001)

Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle
Nature 409, 539-542

Stevens, S.W. (2000)

Analysis of low-abundance ribonucleoprotein particles from yeast by affinity chromatography and mass spectrometry microsequencing.
Methods Enzymol, 318:385-98

Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D. Abelson, J.(2002)

Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP
Molecular Cell 9, 31-44

Szymczyzna, B. R., Bowman, J., McCracken, S., Pineda-Lucena, A., Lu, Y., Cox, B., Lambermon, M., Graveley, B.R., Arrowsmith, C. H., Blencowe, B.J. (2003)

Structure and function of the PWI motif: A novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing
Genes & Development 17:461-475

Tucker, C. , Gera, J., & Uetz, P. (2001)

Towards an understanding of complex protein networks
Trends in Cell Biology 11 (3), 102-106

Uetz, P. et al. (2000)

A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*
Nature 403, 623-627

Uetz, P. & Grigoriev, A. (2005)

The yeast interactome
John Wiley & Sons Ltd: Chichester, volume 5, pp. 2033-2051

Vollert, C.S., Uetz, P. (2004)

The phox homology (PX) domain protein interaction network in yeast.

Mol Cell Proteomics, 3(11):1053-64

Walhout, A.J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., Thierry-Mieg, N., & Vidal, M. (2000)

Protein interaction mapping in *C. Elegans* using proteins involved in vulval development

Science 287, 116-122

Will, C.L., and Lührmann, R. (1997)

Protein functions in pre-mRNA splicing

Current Opinion in Cell Biology 9, 320-328

Will, C.L. and Lührmann, R. (2001)

Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function.

Curr. Opin. Cell Biol. 13,290-301

Zhang, D. and Rosbash, M. (1999)

Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex

Genes & Development 13:581-592

Zhuang, Y., & Weiner, A.M. (1986)

A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation

Cell 46, 827-835

Zhou, Q., Sharp, P.A. (1996)

Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat.

Science, 274(5287):605-10

Methoden

Bartel, P.L., & Fields, S. (1997)

The Yeast TWO-HYBRID System

Oxford University Press

Boisguerin P., Leben R., Ay B., Radziwill G., Moelling K., Dong L., Volkmer-Engert R. (2004)

An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies

Chem Biol. 11(4):423-5

Cagney, G., Uetz, P., & Fields, S. (2000)

High-throughput screening for protein-protein interactions using the two-hybrid assay

Methods in Enzymology 328, 3-14

Fields, S. & Song, O. (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interactions

Nature 340, 245-246

Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., Wilm, M. (2002)

An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes.

Nat Biotechnol 16; [epub ahead of print]

Frank, R. (1992)

Spot synthesis an easy technique for positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support

Tetrahedron 48, 9217-9232

Frank, R. (2002)

The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications.

J. Immunol. Methods 267, 13-26

James, P., Halladay, J., & Craig, E.A. (1996)

Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast

Genetics 144. 1425-1436

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmth, K., Schienel, E. (1999)

Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines

Yeast 15, 963-972

Koch, J., Mahler, M., Blüthner, M., & Dübel, S.

Analysis of protein interactions with peptides synthesized on membranes

In Golemis, E. (ed.) Protein-Protein-Interactions – A Molecular Cloning Manual

Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 569-581

Kramer, A., Reineke, U., Dong, L., Hoffmann, B., Hoffmuller, U., Winkler, D., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J. (1999)

Spot synthesis: observations and optimizations

J Pept Res, 54(4):319-27

Landgraf, C., Panni, S., Montecchi-Palazzi, L., Castagnoli, L., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G. (2004)

Protein interaction networks by proteome peptide scanning.

PLoS Biol, 2(1):E14

Lopez P.J., Seraphin B. (2000)

YIDB: the Yeast Intron DataBase.

Nucleic Acids Res, 28(1):85-6

Mann, M., Hendrickson, R.C., & Pandey, A. (2001)

Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry

Annu. Rev. Biochem. 10, 437-473

Otte L., Wiedemann U., Schlegel B., Pires J. R., Beyermann M., Schmieder P., Krause G., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J., Oschkinat H. (2002)

WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains

Protein Science, 12:491-500

Pikielny, C.W., Rymond, B.C., Rosbash, M. (1986)

Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes.

Nature,324(6095):341-5

Puig, O., et al. (2001)

The tandem affinity purification (tap) method: a general procedure of protein complex purification

Methods 24, 218-229

Reineke, U., Volkmer-Engert, R., & Schneider-Mergener, J. (2001)
Applications of peptide arrays prepared by SPOT-technology
Current Opinion in Biotechnology 12, 59-64

Uetz, P., & Hughes, R.E. (2000)
Systematic and large-scale two-hybrid screens
Current Opinion in Microbiology 3, 303-308

Uetz, P., Ideker, T., & Schwikowski, B. (2002)
Visualization and integration of protein-protein interactions
In Golemis, E. (ed.) Protein-Protein-Interactions – A Molecular Cloning Manual
Cold Spring Habor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 623-646

Vijayraghavan, U., Company, M., Abelson, J.(1989)
Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
Genes Dev,3(8):1206-16

Verwendete Datenbanken:

SMART

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

SGD

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

PRODOM

<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/2002.1/html/home.php#>

PFAM

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

YPD

<http://www.incyte.com/sequence/proteome/databases/YPD.shtml>

INTERPRO

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

NCBI BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

SCANPROSITE

<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>

TCOFFEE

<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>

ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
3AT	3-Aminotriazol
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AS	Aminosäure
Bidest	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CTD	C-terminale Domäne der RNA Polymerase II
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
H/ His	Histidin
HRP	Horseradish-Peroxidase
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
L/ Leu	Leucin
M	molar
MAT	Mating-Typ
mM	Millimolar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

ABKÜRZUNGEN

PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
Pro A	Protein A
rpm	rounds per minute
mRNA	messenger RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein Particle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	tandem affinity purification
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
T/Trp	Tryptophan
U	Unit
UV	Ultraviolett
Y2H	Yeast-2-Hybrid