

Dissertation

**„Struktur-Funktionsanalyse des Elongator-assoziierten
Proteins Kti11/Dph3 in *Saccharomyces cerevisiae* und
Arabidopsis thaliana.“**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I - BIOWISSENSCHAFTEN
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von

Herrn René Zabel
Geboren am 06.11.1980 in Halberstadt

Gutachterin bzw. Gutachter

1. Prof. Dr. K. D. Breunig
2. Prof. Dr. R. G. Sawers
3. Prof. Dr. M. Mörl

Halle/Saale, 27.02.2013

Veröffentlichungen

Zabel R, Bär C, Mehlgarten C, Schaffrath R (2008). Yeast alpha-tubulin suppressor Ats1/Kti13 relates to the Elongator complex and interacts with Elongator partner protein Kti11. *Mol Microbiol.* **69**:175-87

Bär C, **Zabel R**, Liu S, Stark MJ, Schaffrath R (2008). A versatile partner of eukaryotic protein complexes that is involved in multiple biological processes: Kti11/Dph3. *Mol Microbiol.* **69**:1221-33

Abstract

Kti11 alias Dph3, a small, highly conserved Zn-ribbon protein, was found to interact with at least three distinct proteins or protein complexes: the Dph complex required for synthesis of the diphthamide modification on translation factor eEF2, the Elongator complex involved in modification of wobble nucleosides in eukaryotic tRNAs and Kti13, a protein assumed to be an Elongator regulator. As predicted from the *Arabidopsis thaliana* genome sequence, plants contain a locus, At2g15910 that is homologous to the yeast *KTI11* gene. By complementation of a *kti11* yeast mutant with the plant gene we have shown that At2g15910 encodes a protein, named AtKti11 that is functionally conserved between yeast and plants. Suitable bioassays have been established to monitor Kti11 function and the capability of At2g15910 to substitute for the *KTI11* gene. Protein biochemical studies in yeast revealed that, like yeast Kti11, AtKti11 functionally interacts with Dph1, Dph2, Kti13 and the Elongator complex. TAP-purifications with AtKti11 *in planta* identified the Elongator complex and a non characterized protein (At1g27060) as possible interaction partners. At1g27060 was shown to encode a likely Kti13 ortholog (AtKti13) that is also functional in yeast. The interaction between Kti11 and Kti13 occurs in *E. coli* and is therefore independent of other yeast proteins.

Recombinantly expressed Kti11 from *E. coli* revealed iron binding capacity and this property was confirmed for Kti11 in yeast. Reversible oxidation of the protein suggests that it might function as an electron carrier. Four highly conserved cysteine residues are involved in iron binding. Individual mutation of three of the four cysteines results in a dominant negative phenotype that affects tRNA modification but not diphthamide synthesis. The fourth cysteine mutation results in a recessive loss-of-function phenotype. Interaction studies revealed that the dominant negative phenotype correlates with the ability of mutant Kti11 variants to bind Elongator. This result strongly suggests that binding of a defective Kti11 variant to one of the Elongator subunits blocks the function of intact Kti11 in tRNA modification.

The biochemical reaction of Elongator dependent tRNA modification is still elusive, but a radical based mechanism is predicted, since Elongator subunit Elp3 harbors a radical SAM domain. Mutations that result in loss of [4Fe-S] cluster binding in Elp3 affect Kti11 interaction while Elongator assembly is not disturbed. Since we know that Kti11 is redox active, we hypothesize that Kti11 might function in maintaining the reduced state of catalytic subunit Elp3.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Das <i>K. lactis</i> Killersystem	2
1.2.1 Der Killerphänotyp und seine genetische Grundlage.....	2
1.2.2 Struktur und Sekretion des Zymocins	3
1.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Zymocin-Untereinheiten	3
1.3 Isolierung Resistenz-verleihender Mutanten	4
1.3.1 Klasse I Resistenz.....	5
1.3.2 Klasse II Resistenz.....	5
1.4 Der Elongator Komplex.....	7
1.4.1 Neue Elongator-Funktionen.....	8
1.5 Elongator relevante Proteine	11
1.5.1 <i>ATS1/KTI13</i>	11
1.5.2 <i>KTI11/DPH3</i>	12
1.6 Zielstellungen	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Großgeräte und nicht gesondert erwähnte Hilfsmittel	19
2.1.3 Mikroorganismen.....	21
2.1.3.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	21
2.1.3.2 <i>Kluyveromyces lactis</i> Stämme	21
2.1.3.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stämme.....	21
2.1.3.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme.....	21
2.1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien.....	22
2.1.5 Primer	22
2.1.6 Plasmide	24

2.1.7	Nährmedien und Anzuchtbedingungen.....	26
2.1.7.1	Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i>	26
2.1.7.2	Anzuchtbedingungen für Hefen.....	26
2.1.7.3	Anzuchtbedingungen für <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.1.7.4	Anzuchtbedingungen für Pflanzen.....	27
2.1.7.5	Anzuchtbedingungen für Pflanzen auf Selektivmedium	27
2.1.8	Anaerobe Methoden	28
2.2.	Methoden	28
2.2.1	DNA–Isolationen	28
2.2.1.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	28
2.2.1.2	Schnell-Isolation chromosomaler DNA aus Hefezellen.....	29
2.2.1.3	Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA.....	29
2.2.2	Modifikation und Analyse der DNA.....	30
2.2.2.1	DNA-Fällung.....	30
2.2.2.2	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	30
2.2.2.3	Restriktion	30
2.2.2.4	Ligation	30
2.2.2.5	Gelelektion von DNA-Fragmenten	30
2.2.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten	31
2.2.2.7	Dephosphorylierung	31
2.2.2.8	Sequenzierung.....	31
2.2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.2.10	PCR-basierende „one-step <i>in vivo</i> “ Epitopmarkierung	32
2.2.2.11	Klonierung von PCR-Produkten.....	32
2.2.2.12	PCR-basierende Gendeletion (Knockout)	32
2.2.3	Transformationen.....	33
2.2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> nach Hanahan (1985)	33
2.2.3.2	Transformation von Hefen nach Gietz und Schiestl (1995)	33
2.2.3.3	Transformation von Hefen nach Knop et al. (1999).....	34
2.2.3.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
2.2.3.5	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.2.3.6	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur (PSB-D).....	35
2.2.3.7	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 Zellkultur	36
2.2.4	Analyse von Proteinen.....	37

2.2.4.1	Präparation von Zellextrakten aus Hefe	37
2.2.4.2	Präparation von Zellextrakten aus <i>E. coli</i>	38
2.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.2.4.4	Ko-Immunopräzipitation	39
2.2.4.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	39
2.2.4.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	40
2.2.4.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Westernanalyse)	40
2.2.4.8	Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)	41
2.2.4.9	Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	42
2.2.4.10	Präparative Gelfiltrationschromatographie	43
2.2.4.11	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.2.4.12	Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen	43
2.2.4.13	UV-VIS Absorptions-Spektroskopie.....	43
2.2.5	Wachstumstests.....	43
2.2.5.1	Exotoxin-Test auf Festmedium (Killer-Eklipse-Assay)	43
2.2.5.2	γ -Toxin-Test.....	44
2.2.5.3	Diphtherie-Toxin-Assay.....	44
2.2.5.4	<i>SUP4</i> -Suppressions-Assay	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Identifizierung und Charakterisierung des pflanzlichen Kti11 Homologs.....	45
3.1.1	Komplementationsanalyse des potentiellen Kti11 Homologs aus <i>A. thaliana</i>	45
3.1.1.1	γ -Toxin Assay	45
3.1.1.2	tRNA Suppressions-Assay	46
3.1.1.3	AtKti11 ermöglicht Ribosylierung von eEF2 durch das Diphtherie-Toxin	48
3.1.2	Interaktionsstudien von AtKti11 in Hefe	49
3.2	Charakterisierung von <i>AtKti11</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
3.2.1	Charakterisierung der T-DNA Insertionslinie Salk_039327	52
3.2.2	AtKti11 Lokalisierung in BY2 Tabak Zellkultur	54
3.2.3	AtKti11 Lokalisierung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
3.2.4	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von AtKti11 aus <i>A. thaliana</i> Zellkultur	56
3.3	Komplementationsanalyse der <i>kti13Δ</i> Mutante mit dem At1g27060 Gen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
3.4	Charakterisierung der Kti11 – Kti13 Interaktion.....	63
3.5	Biochemische und phänotypische Charakterisierung von Kti11.....	64

3.5.1	UV-Vis Spektrum von gereinigtem Kti11-(His) ₆	67
3.5.2	Biochemische Charakterisierung von Cystein-Substitutionsmutationen	68
3.5.3	Eisenbindung von Kti11 in Hefe	70
3.5.4	Phänotypische Charakterisierung der Cystein-Substitutionsmutanten	71
3.5.5	Interaktionsstudien der Cystein-Mutanten mit Elp3, Dph1 und Kti13.....	76
3.5.6	Verlust des dominant negativen Phänotyps durch Kti11 Verkürzung	79
3.5.7	Dominant-negativer Phänotyp durch Cystein-Substitution in <i>AtKti11</i>	81
3.6	Interaktionsstudien von Kti11 mit mutierten Elp3 Varianten	83
3.6.1	Eisen-Schwefel-Cluster in Elp3 ist essentiell für Kti11 Bindung.....	84
3.6.2	Elp3 Cystein-Mutationen der [Fe-S] Bindedomänen erlauben Elp1 Interaktion ...	86
4.	Diskussion	88
4.1	Identifizierung von AtKti11 und Charakterisierung in <i>S. c.</i> und <i>A. t.</i>	88
4.1.1	<i>AtKTI11</i> komplementiert den <i>kti11Δ</i> tRNA-Modifikationsdefekt in Hefe	88
4.1.2	AtKti11 interagiert mit dem <i>A. thaliana</i> Core-Elongator.....	90
4.1.3	<i>AtKTI11</i> komplementiert den <i>kti11Δ</i> Diphthamid-Biosynthesedefekt.....	90
4.1.4	AtKti11 lokalisiert cytoplasmatisch und Zellkern-gebunden in <i>A. thaliana</i>	92
4.1.5	At1g27060 komplementiert den <i>kti13Δ</i> -Phänotyp in Hefe	92
4.1.6	Kti11-Kti13 Interaktion ist evolutionär hoch konserviert	93
4.2	Charakterisierung von Kti11	93
4.2.1	Kti11 ist ein Eisen-bindendes Protein	94
4.2.2	Kti11 Eisenbindung ist essentiell für die Diphthamid Biosynthese	96
4.2.3	Kti11 Eisenbindung ist essentiell für U ₃₄ tRNA-Modifikation	98
4.2.4	[4Fe-4S]-Cluster in Elp3 ist essentiell für Kti11 Interaktion.....	99
5.	Zusammenfassung	101
6.	Literatur	102
7.	Anhang	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Killerphänotyp im Killer-Eklipse-Assay nach Kishida et al. (1996).	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zymocin induzierten Zelltods.	4
Abbildung 3: Darstellung von U ₃₄ Modifikationen in tRNAs.	9
Abbildung 4: NMR Struktur von Kti11 (Sun et al., 2005).	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung bekannter Kti11 Interaktoren in Hefe und Säuger.	15
Abbildung 6: Wirkmechanismus vom Diphtherie-Toxin in Säugerszellen.	16
Abbildung 7: Sequenzvergleich möglicher Kti11 Homologe in Eukaryoten.	45
Abbildung 8: γ -Toxin-Test von <i>AtKTI11</i> .	46
Abbildung 9: Stopp-Codon Suppression des <i>ade2-1</i> -Allels durch <i>SUP4</i> .	47
Abbildung 10: <i>AtKTI11</i> ermöglicht ochre-Suppression durch <i>SUP4</i> .	48
Abbildung 11: <i>AtKTI11</i> verleiht Diphtherie-Toxin Sensitivität.	49
Abbildung 12: AtKti11 interagiert mit Dph1 und Dph2.	51
Abbildung 13: AtKti11 interagiert mit Kti13 und Elp2	51
Abbildung 14: Darstellung der chromosomalen Primerbindestellen.	53
Abbildung 15: Plasmidkarte des Expressionsvektors pK7FW2.0.	54
Abbildung 16: AtKti11-GFP exprimierende BY-2 Tabak-Zelllinie.	55
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie von AtKti11-GFP exprimierenden <i>A. thaliana</i> Linien.	56
Abbildung 18: Plasmidkarte des binären Vektors pK7m34GW,0.	57
Abbildung 19: AtKti11-TAP Expressionslevel verschiedener Zellkulturlinien.	58
Abbildung 20: Eluate verschiedener TAP-Aufreinigungen im SDS-Gel.	59
Abbildung 21: Sequenzvergleich möglicher Kti13 Homologe.	62
Abbildung 22: Cross-Komplementationsanalyse von <i>AtKTI13</i> in Hefe mithilfe des γ -Toxin Tests.	63
Abbildung 23: <i>AtKTI13</i> ermöglicht partielle ochre-Suppression durch <i>SUP4</i> .	63
Abbildung 24: Protein Interaktion von rekombinant exprimierten Kti11 und Kti13.	64
Abbildung 25: Nickel-NTA Elutionsprofil von Kti11.	65
Abbildung 26: Gegenüberstellung von gereinigten Kti13 und Kti11.	66
Abbildung 27: Gelfiltration von rekombinant gereinigtem Kti11-(His) ₆ .	66
Abbildung 28: Analyse von rekombinant gereinigtem Kti11-(His) ₆ nach Gelfiltration.	67
Abbildung 29: UV-Vis Absorptionsspektrum von rekombinant gereinigtem Kti11.	68
Abbildung 30: Schematische Darstellung von Kti11.	68
Abbildung 31: UV-Vis Absorptionsspektrum von rekombinant exprimierten Kti11-Varianten.	69
Abbildung 32: Eisenbindung von Wildtyp-Kti11 und mutierten Varianten in Hefe.	71

Abbildung 33 : γ -Toxin-Test verschiedener <i>kti11</i> C:S Substitutions-Mutanten im <i>kti11</i> Δ Hintergrund.	72
Abbildung 34 : γ -Toxin-Test verschiedener <i>kti11</i> C:S Substitutions-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund.	73
Abbildung 35 : Suppression der <i>C27S</i> Dominanz durch <i>KTI11</i> Überexpression im γ -Toxin-Test.	74
Abbildung 36 : DT-Test verschiedener <i>kti11</i> C:S Substitutions-Mutanten im <i>kti11</i> Δ Hintergrund.	75
Abbildung 37 : DT-Test verschiedener <i>kti11</i> C:S Substitutions-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund.	75
Abbildung 38 : Cystein-Mutationen in Kti11 beeinflussen nicht die Kti13 Interaktion.	76
Abbildung 39 : Cystein-Mutationen in Kti11 beeinflussen Elp3 Interaktion.	77
Abbildung 40 : <i>C27S</i> Mutation in Kti11 verhindert die Dph1 Interaktion.	77
Abbildung 41 : γ -Toxin-Test verkürzter <i>kti11</i> Mutanten im <i>kti11</i> Δ Hintergrund.	80
Abbildung 42 : γ -Toxin-Test verkürzter <i>kti11</i> Allele im Wildtyp-Hintergrund.	80
Abbildung 43 : Eine C-terminale Kti11 Verkürzung beeinflusst die Elp3-Interaktion.	81
Abbildung 44 : γ -Toxin-Test von <i>C27S</i> und <i>AtC26S</i> im <i>kti11</i> Δ -Hintergrund.	82
Abbildung 45 : γ -Toxin-Test von <i>C27S</i> und <i>AtC26S</i> im Wildtyp-Hintergrund.	82
Abbildung 46 : Schematische Darstellung von Elp3.	83
Abbildung 47 : Killer-Eklipse-Test verschiedener <i>elp3</i> -Mutanten.	84
Abbildung 48 : Kti11-Elp3 Interaktion bedarf eines intakten Elp3 AdoMet-Motivs.	85
Abbildung 49 : Cystein Substitutionen in Elp3 erlauben Elp1 Interaktion.	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auswahl von Vertretern der Klasse I und II Sensitivitätsgene.	6
Tabelle 2:	Großgeräte und Hersteller	19
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien und Hersteller	19
Tabelle 4:	Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	21
Tabelle 5:	Verwendete <i>Kluyveromyces lactis</i> Stämme	21
Tabelle 6:	Verwendete <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stämme	21
Tabelle 7:	Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	21
Tabelle 8:	Verwendete <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien	22
Tabelle 9:	Verwendete PCR-Primer (MWG Operon AG)	22
Tabelle 10:	Verwendete Plasmide	24
Tabelle 11:	Ergebnisse der ersten AtKti11-Tap-Aufreinigung.	60
Tabelle 12:	Ergebnisse der zweiten AtKti11-Tap-Aufreinigung.	60
Tabelle 13:	Zusammenfassung der phänotypischen und biophysikalischen Daten der mutierten <i>KT111</i> Cystein nach Serin Varianten.	78

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>A. t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFW	Calcofluor White
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
ECL	enhances chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
G	Guanin
G	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanylnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Green Fluorescent Protein
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GST	Glutation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

H	Histidin
HA	Hemagglutinin
HAP	HAT -associated protein
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin
IgG	Immunglobulin G
kan ^R	Kanamycin-Resistenz
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation
LB	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mc	multi-copy
M(IP) ₂ C	Mannosyl-diinositolphosphoceramid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl ₂	Natriumchlorid
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

Pfu	Pyrococcus furiosus
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
Q	Glutamin
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDm	synthetisches Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAP	Tandem-affinity-purification
Taq	Thermus aquaticus
TBST	tris buffered saline + 0,3% Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UV	Ultraviolett
UV-Vis	Ultraviolett-sichtbar
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
Xgal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktosid
YEPD	yeast extract/peptone/dextrose, Hefevollmedium
YNB	Yeast Nitrogen Base
Zn	Zink

1. Einleitung

1.1 Einführung

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen raffinierte Strategien entwickelt, andere Organismen in ihrem Wachstum zu hemmen und sich dadurch Selektionsvorteile geschaffen. Der Sekundärstoffwechsel der Pflanzen zum Beispiel brachte eine Vielzahl von Stoffen hervor, hier sind besonders die Alkaloide zu nennen, die negative Wirkung auf Keimung und Wachstum anderer Pflanzen besitzen. Ebenso schützen sich viele Pflanzen gegen Fraßfeinde durch Produktion von Sekundärmetaboliten. Canavanin, ein Arginin Analogon, wird von einigen Leguminosen wie z. Bsp. *Canavalia ensiformis* in großen Mengen produziert. Diese nicht-proteinogene Aminosäure wird durch Herbivoren aufgenommen, in Proteine eingebaut und führt dort zur Protein-Falschfaltung einhergehend mit einem Funktionsverlust. Nicht nur der Sekundärstoffwechsel hat solch wachstumshemmende Verbindungen hervorbracht, auch DNA- oder RNA-kodierte Proteintoxine fanden Einzug im Kampf um die Erhaltung der Art. So sind nicht nur in Pflanzen biotoxische Verbindungen zu finden, auch Prokaryoten (Antibiotika, Toxine) und einzellige Eukaryoten (Hefen) haben Wege der Produktion und Sekretion zytostatischer Stoffe gefunden. Das Diphtherie-Toxin, ein Vertreter der proteinösen Toxine, welches vom gram-positiven Bakterium *Corynebacterium diphtheriae* produziert und sekretiert wird, ist in der Lage, den eukaryotischen Translationelongationsfaktor 2 (eEF2) durch Modifikation zu inhibieren und damit die Zielzellen zu töten (Van Ness et al., 1980, Collier, 1967). Unter den Hefen konnten Stämme identifiziert werden, die ebenfalls biologisch wirksame Substanzen sekretieren und damit die Zellproliferation anderer Spezies hemmen oder diese sogar abtöten. Diese Hefestämme werden Killerhefen genannt. In *Saccharomyces cerevisiae* konnten drei unterschiedliche Killertoxine (K1, K2, K28) identifiziert werden, die von doppelsträngigen RNA Viren kodiert sind (Tipper und Schmitt, 1991; Wickner, 1996). Die meisten viral-kodierten Killertoxine, vergleichbar dem K1 Toxin, wirken als Ionophoren und unterbrechen die Plasmamembranfunktion durch Ausbildung Kation-spezifischer Membranporen (Martinac et al., 1990; Weiler et al., 2002; Breinig et al., 2002; Weiler and Schmitt, 2003). Nicht nur in *S. cerevisiae*, auch in Arten wie *Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae* oder *Pichia inositovora* wurden proliferationshemmende Toxine entdeckt, deren Produktion auf lineare, doppelsträngige Plasmid-DNA zurückzuführen ist (Gunge et al., 1981; Worsham und Bolen, 1990; Hayman und Bolen, 1991).

Unter den DNA-kodierten Killertoxinen ist das von *K. lactis* sekretierte Zymocin das wohl am intensivsten untersuchte Killersystem.

1.2 Das *K. lactis* Killersystem

1.2.1 Der Killerphänotyp und seine genetische Grundlage

Das von *K. lactis* sekretierte Zymocin ist in der Lage, Hefestämme der Gattung *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* und *Candida* in ihrem Wachstum zu inhibieren (Gunge et al., 1981; Kishida et al., 1996; Fichtner et al., 2003a). Visualisiert werden kann dieses Phänomen durch einen von Kishida et al. (1996) beschriebenen Killer-Eklipse-Assay (Abb. 1). Sensitive *S. cerevisiae* Stämme sind nicht fähig, unmittelbar neben dem Zymocin-produzierenden *K. lactis* Stamm zu wachsen und zeigen die Ausbildung eines Hemmhofes. Resistente Stämme hingegen bilden keinen Hemmhof aus und wachsen bis an die *K. lactis* Kolonie heran.

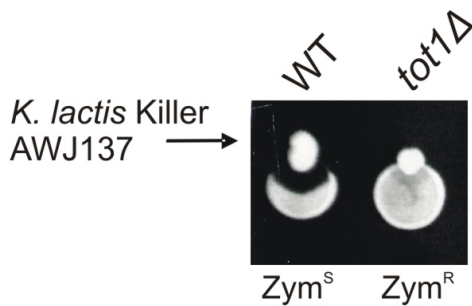


Abbildung 1: Killerphänotyp im Killer-Eklipse-Assay nach Kishida et al. (1996).

Sensitiver (Zym^S) und resistenter (Zym^R) *S. cerevisiae* Stamm wurden auf YEPD getropft und mit dem *K. lactis* Killer inokuliert. Inhibierung des Wildtypstammes (WT) zeigt sich durch Ausbildung eines Hemmhofes um die Killerkolonie. Resistenter *tot1Δ*-Stamm wächst bis an den Killerstamm heran.

Werden sensitive Hefestämme mit Zymocin behandelt, arretieren diese in der G1-Phase des Zellzyklus, bevor sie den Start-Kontrollpunkt überschreiten können. Betrachtet man diese Hefen lichtmikroskopisch, erkennt man eine Akkumulation nichtsporender Zellen. So arretierte Hefezellen verfügen über einen präreplikativen (1n) DNA-Gehalt, wie mittels FACS-Analysen nachgewiesen werden konnte (Butler et al., 1991a).

Genetisch liegen dem Killersystem die zwei doppelsträngigen linearen DNA Plasmide k1 und k2 zugrunde (Gunge et al., 1981; Stark et al., 1990; Schaffrath und Breunig, 2000). Diese kommen in erhöhter Kopienzahl (50-100) vor, sind cytoplasmatisch lokalisiert und benötigen damit ein zellkernunabhängiges Transkriptionssystem. Die linearen Plasmide sind autonom replizierende genetische Elemente, die in ihrer Struktur den Adenoviren und einigen Bakteriophagen ähneln (Meijer et al., 2001). Sie enthalten 15 intronlose offene Leseraster (ORF), wobei k1 vier und k2 elf ORFs trägt. So besitzen alle k1 und k2 kodierten Gene im 5' Nichtkodierungsbereich ein UCS-Element (*upstream conserved sequence*), das essenziell für die korrekte Erkennung des Promoters durch die, von ORF6 kodierte,

RNA-Polymerase ist (Stark et al., 1984, 1990; Romanos und Boyd, 1988; Wilson und Meacock, 1988; Kamper et al., 1991; Schickel et al., 1996; Schaffrath et al., 1996).

1.2.2 Struktur und Sekretion des Zymocins

Das von *K. lactis* sekretierte Zymocin ist ein heterotrimerer Glycoproteinkomplex, der aus den Untereinheiten, α (99kDa), β (30 kDa) und γ (28 kDa) besteht (Sugisaki et al., 1984; Stark und Boyd, 1986). Sowohl α - und β - als auch die γ -Untereinheit des Zymocins werden vom Killerplasmid k1 kodiert, jedoch ist in Abwesenheit von k2 die Transkription der k1 Gene nicht möglich, da transkriptionsrelevante Gene, wie RNA-Polymerase, mRNA-Capping-Enzym, Helikase, einzelstrangbindendes Protein, k2-kodiert sind (Larsen et al., 1998; Tiggemann et al., 2001; Stark et al., 1990; Schaffrath und Meacock, 2001; Wilson und Meacock, 1988; Schaffrath et al., 1995a, b, 1997a). Die α - und β -Untereinheit des Zymocins werden als ein gemeinsamer Proteinvorläufer vom ORF2 transkribiert und anschließend, vermittelt durch ein Signalpeptid ins Endoplasmatische Retikulum (ER) ko-translational importiert (Stark und Boyd, 1986). Im ER erfolgen die Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz und die Glykosylierung der α -Untereinheit. Auch die γ -Untereinheit wird in das ER transportiert und die Signalsequenz ebenfalls proteolytisch abgespalten (Stark und Boyd, 1986). Danach erfolgt der Transport in den Golgi-Apparat mit anschließender Spaltung des α/β -Vorläuferproteins durch die Endopeptidase Kex1 in die beiden reifen Toxin-Untereinheiten α und β (Tanguy-Rougeau et al., 1988; Wesolowski-Louvel et al., 1988; Stark et al., 1990). Die folgende Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der α -Untereinheit und intermolekularen Disulfidbrücken zwischen β - und γ -Untereinheit dienen der Zymocin-Integrität und seiner Stabilität (Stark und Boyd, 1986; Stark et al., 1990). Schließlich wird es über den Sekretions-Stoffwechselweg der Hefe exportiert (Tokunaga et al., 1987, 1988, 1990). Anzumerken sei, dass nur das vollständig assemblierte Holo-Zymocin zur Sekretion befähigt ist (Tokunaga et al., 1989).

1.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Zymocin-Untereinheiten

Obwohl Zymocin als trimerer Proteinkomplex sekretiert wird, konnte seine zytostatische Wirkung allein der γ -Untereinheit (γ -Toxin) zugeordnet werden (Tokunaga et al., 1989; Butler et al., 1991b; Frohloff et al., 2001). So führte eine intrazelluläre Expression des γ -Toxins unter der Kontrolle eines regulierbaren Galaktose-Promotors auf galaktose-haltigen Medien zu einem Wachstumsblock. Dieser ist im Gegensatz zum Holo-Zymocin reversibel (Tokunaga et al., 1989; Butler et al., 1991b). Extrazellulär angebotenes γ -Toxin hingegen hat keinen proliferationshemmenden Effekt auf sensitive *S. cerevisiae* Stämme. Nur Holo-Zymocin ist, extrazellulär zugeführt, zur Wachstumsinhibition befähigt. *In vitro*-Studien

konnten belegen, dass Holo-Zymocin, vermittelt durch die α -Untereinheit, an Chitin bindet (Buttler et al., 1991c). Weitere Untersuchungen konnten sowohl eine Chitinbindedomäne als auch ein Exochitinase-Motiv in der α -Untereinheit ausmachen (Butler et al., 1991c; Jablonowski et al., 2001a, 2003). Über die β -Untereinheit ist dagegen noch nicht viel bekannt. Wahrscheinlich ist sie für den Eintritt des γ -Toxins in die Zielzelle verantwortlich. 2005 identifizierte die Arbeitsgruppe um Anders Byström (Lu et al., 2005) eine tRNA Endonuklease Funktion innerhalb des γ -Toxins. Sie zeigten, dass 3 tRNA-Spezies ($tRNA^{\text{Glu}}_{(\text{UUC})}$, $tRNA^{\text{Gln}}_{(\text{UUG})}$ und $tRNA^{\text{Lys}}_{(\text{UUU})}$) *in vitro* durch Applikation von gereinigtem γ -Toxin in ihrer Anticodon-Schleife endonucleolytisch gespalten werden. Die Spaltung erfolgt hierbei zwischen den Nukleotiden 34 und 35. Da diese tRNAs *in vivo* massiv depletiert werden, kommt es zur Proteinbiosynthese-Hemmung einhergehend mit einem Wachstumsarrest.

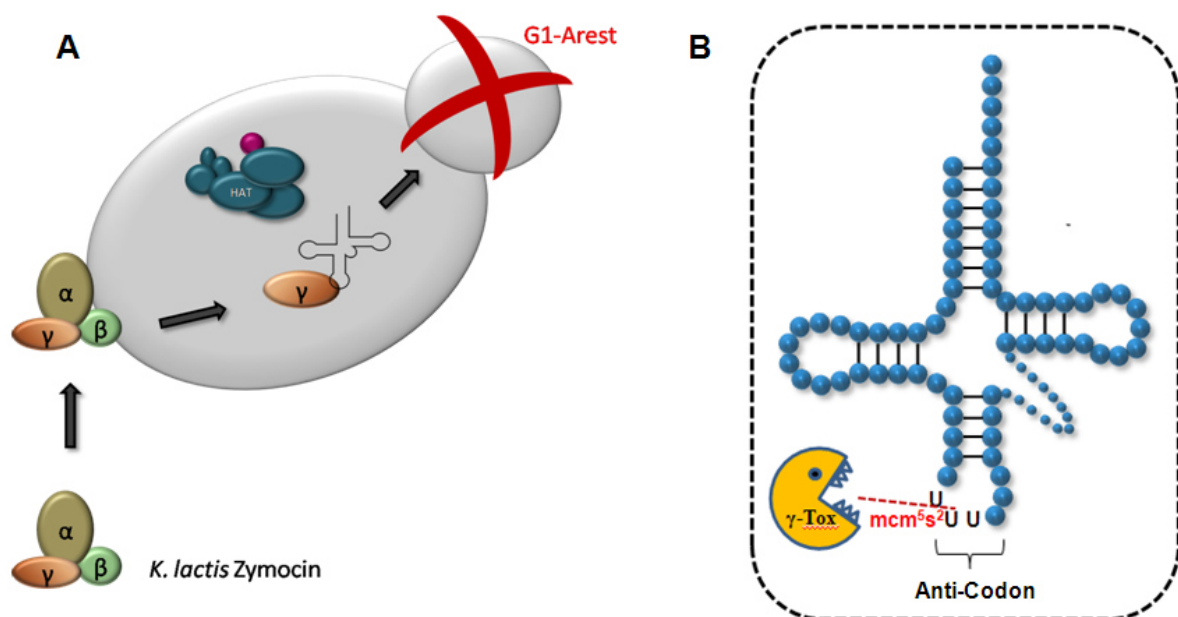


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zymocin induzierten Zelltods.

K. lactis Killerhefen sekretieren das heterotrimer Zymocin. Nach Bindung der α -Untereinheit an die Zellwand sensibler *S. cerevisiae* Zellen findet der γ -Toxin Import statt. Intrazellulär erkennt und schneidet das γ -Toxin die Elongator-abhängig modifizierten tRNAs ($tRNA^{\text{Glu}}$, $tRNA^{\text{Lys}}$ und $tRNA^{\text{Gln}}$). Der endonukleatische Schnitt erfolgt hierbei zwischen der Nukleotidposition 34 und 35 in der Anticodonschleife.

1.3 Isolierung Resistenz-verleihender Mutanten

In den letzten 20 Jahren konnten viele Zymocin-resistente Mutanten von unterschiedlichen Arbeitsgruppen isoliert und wie folgt bezeichnet werden: *skt* (*sensitiv to K. lactis toxin*), *iki* (*insensitiv to killer*), *kli* (*K. lactis toxin insensitiv*) und *tot* (*toxin target site*) (Butler et al., 1991b, 1994; Schaffrath et al., 1997b; Frohloff et al., 2001). Einige Mutanten zeigten zwar Resistenz gegen exogen zugeführtes Holo-Zymocin, verhielten sich aber vollständig sensitiv gegenüber intrazellulär exprimierten γ -Toxin. Daraufhin erfolgte eine Einteilung der Mutanten

in aufnahme-defizient (Klasse I) und toxintarget-defekt (Klasse II) (Butler et al., 1991b, 1994; Schaffrath et al., 1997b; Frohloff et al., 2001).

1.3.1 Klasse I Resistenz

Vertreter dieser Klasse sind lediglich gegen exogenes Zymocin resistent. Gendefekte betreffen demnach Komponenten, die entweder für die Toxinbindung oder -aufnahme benötigt werden. Hauptsächlich sind hier Gene der Chitinbiosynthese betroffen, was auf Chitin als primären Zymocin-Rezeptor hindeutet (Takita und Castilho-Valavicius, 1993; Jablonowski et al., 2001a). So führen erhöhte Chitinlevel zur Hypersensitivität gegen Holo-Zymocin (Jablonowski et al., 2001a). Das *CHS3*-Genprodukt (Tab. 1), die Chitinsynthase III, synthetisiert 90% des Zellwandchitins (Bulawa et al., 1992) und wird durch Mutationen in den Genen *CHS4-7* (Tab. 1) in ihrer Aktivität stark herabgesetzt (Santos et al., 1997; Trilla et al., 1997, 1999; Ziman et al., 1998; Jablonowski et al., 2001a).

Kti10, eine Plasmamembran H^+ -ATPase, die für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigt wird (McCusker et al., 1987; Mehlgarten und Schaffrath, 2004), führt ebenso zur Resistenzausbildung wie eine Mutation im *IPT1/KTI6*-Lokus (Tab. 1), dem Gen für die Plasmamembran-Sphingolipid-M(IP)₂C-Synthase (Zink et al., 2005). *GRX3 (mc)*, ein Glutareredoxin-Gen, verleiht Resistenz in erhöhter Kopienzahl. Der molekulare Mechanismus dieser Resistenzausbildung ist bis heute nicht verstanden. Jedoch könnten die für die γ -Toxin Aufnahme benötigten Disulfidbrücken zwischen der β - und γ -Untereinheit verstärkt reduziert vorliegen und damit den Eintritt des γ -Toxin in die Zielzelle negativ beeinflussen (Jablonowski et al., 2001a; Mehlgarten und Schaffrath, 2004).

1.3.2 Klasse II Resistenz

Im Gegensatz zu den Mutanten der Klasse I sind Klasse II Mutanten sowohl gegen exogenes Holo-Zymocin als auch intrazellulär exprimiertes γ -Toxin resistent. Phänotypische Analysen der Klasse II Mutanten ergaben stets Thermosensitivität, langsames Wachstum, Sensitivität gegenüber Caffein und verminderte Resistenz gegen das Zellwandgift Calcofluor White (Frohloff et al., 2001, 2003; Jablonowski et al., 2001b, 2001c, 2004; Krogan und Greenblatt, 2001; Li et al., 2001; Winkler et al., 2001; Fichtner et al., 2002a, 2002b). Diese typischen Wachstumsdefekte aller Klasse II Mutanten wurden als *tot*-Phänotyp (toxin target site) bezeichnet und deuteten auf eine gemeinsame Funktion der betroffenen Gene in der Zelle hin (Frohloff et al., 2001). Die Genprodukte von *TOT1-3* und *TOT5-7* konnten einem Proteinkomplex zugeordnet werden, der als Elongator bekannt ist (Frohloff et al., 2001; Jablonowski et al., 2001b).

Weitere Vertreter dieser Resistenzklasse und deren Funktion können aus Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Auswahl von Vertretern der Klasse I und II Sensitivitätsgene.

(nach Schaffrath und Meinhardt, 2005).

(^aCHS: Chitinsynthese-defizient; ^b KTI: K. lactis toxin insensitive; ^c SKT: sensitive to K. lactis toxin; ^d IKI: insensitive to killer toxin; ^e ELP: elongator protein; ^f TOT: toxin-target-site; ^g HAP: HAT-associated protein; ^hATS: alpha-tubullin suppressor; ⁱ SIT4: Serine/threonine protein phosphatase; ^k RCC1: regulator of chromatin condensation; ^l GEF: GTP exchange factor; ^m *mc*: multi-copy; ?: Bedeutung nicht geklärt;).

Genbezeichnung/en	Funktion des Genproduktes	Zymocin-Relevanz
Klasse I-Resistenz		
<i>CHS3^a/KTI2^b</i>	Chitinsynthese	Toxinrezeptor
<i>CHS4/SKT5^c</i>	Chitinsynthese	Toxinrezeptor
<i>CHS5</i>	Chitinsynthese	Toxinrezeptor
<i>CHS6</i>	Chitinsynthese	Toxinrezeptor
<i>CHS7</i>	Chitinsynthese	Toxinrezeptor
<i>PMA1/KTI10</i>	H ⁺ -ATPase	γ-Toxin Import
<i>PTK2</i>	Pma1-Aktivator	γ-Toxin Import
<i>IPT1/KTI6</i>	M(IP) ₂ C Synthase	Toxinimport
<i>GRX3 (mc)^m</i>	Glutaredoxin	γ-Toxin Freisetzung ?
Klasse II-Resistenz		
<i>ELP1/KTI7/TOT1</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>ELP2/KTI3/TOT2</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>ELP3/KTI8/TOT3</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>ELP4/KTI9/TOT7</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>ELP5/TOT5/IKI1^d</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>ELP6/KTI4/TOT6</i>	Elongator	tRNA Modifikation
<i>KTI12/TOT4</i>	Elongator-assoziiertes Protein	Elongator Regulation
<i>ATS1^h/KTI13</i>	RCC1 ^k -Homologes	tRNA Modifikation
<i>KTI11/DPH3</i>	Elongator-assoziiertes Protein	tRNA Modifikation
<i>SIT4ⁱ</i>	Protein- Phosphatase	Elongator Regulation
<i>SAP155 (mc)</i>	Sit4-assoziiertes Protein	Elongator Regulation
<i>SAP185^m</i>	Sit4-assoziiertes Protein	Elongator Regulation
<i>SAP190</i>	Sit4-assoziiertes Protein	Elongator Regulation
<i>HRR25/KTI14</i>	Serin/Threonin Kinase	Elongator Regulation
<i>URM1</i>	tRNA Thiolyierung	tRNA Modifikation
<i>UBA4</i>	tRNA Thiolyierung	tRNA Modifikation
<i>TRM9/KTI1</i>	tRNA Metyltransferase	tRNA Modifikation
<i>tRNA^{GLU} (mc)</i>	tRNA	Toxin Angriffsziel

Auf die Klasse II Vertreter *KTI11* und *KTI13* wird im späteren Verlauf näher eingegangen, da sie unmittelbarer Bestandteil dieser Forschungsarbeit sind.

1.4 Der Elongator-Komplex

Ursprünglich wurde angenommen, dass der Elongator-Komplex als hexamerer Protein-Komplex assembliert (bestehend aus zwei heterotrimeren Subkomplexen; Elp1/Elp2/Elp3 Core-Komplex und Elp4/Elp5/Elp6 HAP-Komplex) und mit der elongierenden, hyperphosphorylierten Form der RNA-Polymerase II interagiert (Otero et al., 1999; Wittschieben et al., 1999; Fellows et al., 2000; Winkler et al., 2001; Li et al., 2001; Krogan und Greenblatt, 2001). Jüngst berichteten Autoren von ihrem Erfolg in der Kristallisation des Elongator HAP-Komplexes (Glatt et al., 2012). Sie fanden heraus, dass die Elongator-Untereinheiten Elp4, Elp5 und Elp6 ATPase-Aktivität aufweisen und einen heterotrimeren Komplex ausbilden, der in seiner Struktur Ähnlichkeiten zum homo-hexameren RecA-Ring besitzt. In weiteren Experimenten zeigten sie, dass jede Elongator-Untereinheit in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten mit sich selbst interagiert und der gereinigte Komplex ein Molekulargewicht von ca. 900 kDa aufweist. Daher postulieren die Autoren dieser Studie einen dodecameren-Elongator-Komplex (Glatt et al., 2012).

Vergleicht man die Proteinsequenz der einzelnen Elongator Untereinheiten des Core-Komplexes aus Hefe mit dem Proteom höherer eukaryotischer Vertreter, wie z.B. Mensch, Maus oder der Ackerschmalwand, so ist deren hochgradige Konservierung äußerst auffällig (Hawkes et al., 2002; Kim et al., 2002; Collum et al., 2000; Nelissen et al., 2005; Mehlgarten 2009). *In vitro*- wie auch *in vivo*-Studien belegen eine Histonacetyltransferaseaktivität (HAT) des Elongators, die auf Untereinheit 3 lokalisiert ist (Wittschieben et al., 1999; Winkler et al., 2002). Mit dieser assistiert der Elongator-Komplex vermutlich der RNA-Polymerase II während der Transkriptionselongation (Wittschieben et al., 1999). Tatsächlich acetyliert rekombinant synthetisierte Elongatoruntereinheit 3 die vier Core-Histone *in vitro* (Wittschieben et al., 1999). Hingegen richtet sich seine HAT-Aktivität im Holo-Elongator nur gegen die aminoterminalen Enden der Histone H3 und H4 (Winkler et al., 2002). Neben der C-terminal gelegenen Histonacetyltransferase Domäne in Elp3 konnte durch Sequenzvergleiche im N-Terminus ein Radikal-SAM-Motiv (SAM=S-Adenosyl-Methionin) identifiziert werden (Sofia et al., 2001). Untersuchungen an einem Elp3 Homolog aus *Methanocaldococcus jannaschii* zeigten erstmalig die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters [Fe-S] und die katalytische Spaltung SAM (Paraskevopoulou et al., 2006).

IKaP (IkBV-Kinasekomplex-assoziiertes Protein) stellt das Hefehomolog von Elp1 innerhalb des humanen Elongators dar. Eine stabilisierende Gerüstfunktion für die Elongator Integrität konnte für IKaP gezeigt werden (Cohan et al., 1998; Hawkes et al., 2002) und wird aufgrund von Interaktionsstudien für das Hefehomolog ebenfalls vermutet (Frohloff et al., 2003). Mutationen in IKaP resultieren im neuropathologischen Krankheitsbild der familiären Dysautonomie einhergehen mit Neuronendegradation (Riley-Day Syndrom) (Slaugenhaupt und Gusella, 2002). Für Elp2, die zweitgrößte Elongator Untereinheit, wird

ähnlich wie für Elp1 eine Funktion in der Elongator Stabilisierung vermutet. Eine *elp2* Deletion beeinflusst zwar nicht generell die Elongator-Assemblierung, jedoch ist die Bindungsaffinität zwischen dem Core- und HAP-Komplex verringert (Frohloff et al, 2003; Petrakis et al, 2005). Es wird vermutet, dass mit Hilfe von acht im Protein vorkommenden WD40 Aminosäure-Sequenzmotiven Protein-Protein Interaktionen mit Elongator-Untereinheiten oder Elongator-assoziierten Proteinen vermittelt werden (Fellows et al, 2000).

1.4.1 Neue Elongator-Funktionen

Bis 2005 wurde angenommen, dass der Elongator mithilfe seiner Histonacetyltransferaseaktivität der RNA-Polymerase II die Transkription durch Chromatin vereinfacht. Neue Studien zeigten den Elongator vermehrt cytoplasmatisch lokalisiert mit Funktionen in Exocytose und tRNA-Modifikation (Rahl *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). Der Einfluss des Elongators auf sekretorische Prozesse konnte 2005 durch Rahl *et al.* gezeigt werden. Untersuchungen offenbarten eine physikalische Interaktion zwischen Sec2, einem GTP-Austauschfaktor (GEF) für die Rab-GTPase Sec4 und der Elongatoruntereinheit 1. Diese Interaktion spielt eine essentielle Rolle bei der korrekten, polarisierten Lokalisierung von Sec2, die für post-Golgi vesikuläre Transporte wichtig ist (Rahl et al., 2005).

Neueste Studien bringen den Elongator Komplex in direkte Verbindung mit paternaler DNA-Demethylierung (Okada et al., 2010), der Aufrechterhaltung der Genomstabilität während der DNA Replikation (Li et al., 2009), sowie der transkriptionellen Regulation von Auxin relevanten Genen auf Ebene des Chromatin-Remodelings (Nelissen et al., 2010) und der Regulation der Immunantwort in Pflanzen (DeFraia et al., 2010). Ebenfalls konnte 2009 ein Einfluss des Elongators auf das Migrationsverhalten und die Differenzierung von kortikalen Neuronen durch Acetylierung von α -Tubulin gezeigt werden (Creppe *et al.*, 2009). Erste Hinweise auf eine Elongatorfunktion in der tRNA Modifikation konnten bereits 1994 durch Butler *et al.* gesammelt werden. Sie zeigten, dass eine Überexpression der tRNA^{Glu_{UUC}} Resistenz gegen das *Kluyveromyces lactis* Toxin verleiht. Jedoch blieb die Rolle des Elongators im Zymocin-vermittelten Zelltod bis 2005 ungeklärt. 2005 gelang es schließlich der Gruppe um Anders Byström, den molekularen Mechanismus der Resistenzausprägung in Elongatormutanten aufzudecken. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Elongator sowie weitere Faktoren, die ebenfalls der Resistenzklasse 2 angehören (*KTI11/DPH3*, *TOT4/KTI12* und *ATS1/KTI13*) für die Modifikation durch Methoxycarbonylmethyl (mcm⁵) oder Carbamoylmethyl (nmc⁵), an der *Wobble*-Base Uridin₃₄ (U₃₄) im Anticodon von 11 tRNA Spezies notwendig sind (Abb. 2) (Huang *et al.*, 2005).

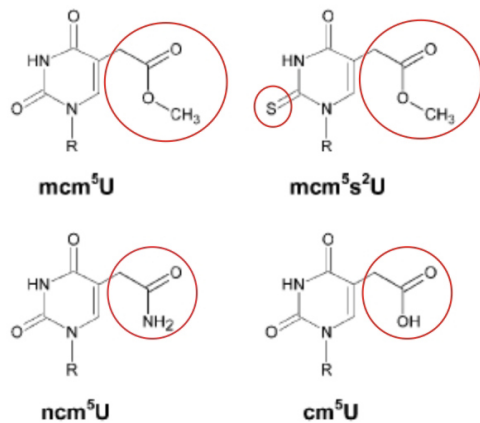


Abbildung 3: Darstellung von U₃₄ Modifikationen in tRNAs.

Struktur von 5-Methoxycarbonylmethyluridin (mcm^5U), 5-Methoxycarbonylmethyl-2thiouridin (mcm^5s^2U), 5-Carbamoylmethyluridin (nmc^5U) 5-Carboxymethyluridin (cm^5U). mcm^5U und nmc^5U sind Elongator und Trm9/Kti1 (Methyltransferase) abhängig. Abbildung nach Huang et al. (2005)

Liegt nur ein einziges der genannten Gene mutiert oder deletiert vor, so ist das besagte Uridin hypomodifiziert und die γ -Untereinheit des Zymocin kann die tRNAs (Schnitt erfolgt zwischen Nukleotid 34 und 35) nicht spalten (Huang et al., 2005). Ob der Elongator und seine relevanten Faktoren direkt an der Modifizierung beteiligt sind oder die Modifizierung indirekt beeinflussen, ist nicht hundertprozentig geklärt. Jedoch zeigt eine aktuelle Studie, dass der hexamere Elp4-Elp5-Elp6-Komplex tRNAs bindet. Die Freisetzung der tRNA Moleküle wird entweder durch ATP-Bindung oder ATP-Hydrolyse in den ATPase-Domänen der Untereinheiten katalysiert (Glatt et al., 2012).

Es sind über 70 verschiedene Modifikationen an tRNA Molekülen bekannt (Agris, 1996). Die Vielzahl modifizierten Basen befindet sich in internen oder endständigen Schleifen der tRNAs (Sprinzl und Vassilenko, 2005). Die Modifikationen dienen der korrekten Faltung und Prozessierung, Erkennung durch Aminoacylsynthetasen, Codon-Erkennung, Einhaltung des Leserasters und ermöglichen eine genaue und effiziente Codon-Anticodon Paarung (Agris et al., 2007; Agris et al., 2004; Björk et al., 1987). Ein Beispiel für Basenhypomodifizierung in tRNAs und deren pleiotropen Effekte sei an dieser Stelle genannt. Der ECK/KEOPS-Komplex ist ein 2006 identifizierter heptamerer Proteinkomplex konserviert von Archaeen bis Eukaryoten. Genetische Analysen von KEOPS Mutanten zeigten einen Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse wie Transkriptionsregulation, Telomerhomöostase oder Aufrechterhaltung der Genomstabilität (Downey et al., 2006; Kisseleva-Romanova et al., 2006). Jüngste Publikationen zeigen, dass der KEOPS Komplex für die Modifikation von Adenin durch Threonylcarbamoyl an Position 37 (t^6A37) in der Anti-Codon-Schleife von ANN-Anticodon-tragenden tRNAs essentiell ist. Eine Hypomodifizierung führt zu einer Missregulation von *GCN4* abhängigen Gene aufgrund einer fehlerhaften uORF (upstream ORF) Erkennung im Promoterbereich von *GCN4* (Daugeron et al., 2011). Zum Anderen verhindert ein modifiziertes A37 in der tRNA Methionin die Erkennung von GUG Codons als Translationsstart und erlaubt lediglich die Paarung mit AUG-Codons (El Yakuobi et al., 2011). Die beschriebenen pleiotropen Phänotypen von KEOPS Mutanten beruhen womöglich auf einer Misstranslation von Proteinen, die damit indirekt zahlreiche zelluläre

Prozesse beeinflussen (Daugeron *et al.*, 2011; El Yakuobi *et al.*, 2011). Alles in Allem spielen Modifikationen in tRNAs eine wichtige Rolle für die korrekte Dekodierung und Interpretation von mRNA Codons.

Zurück zum Elongator und wobble Uridin. 1966 stellte Francis Crick die später nach ihm benannte „Wobble-Hypothese“ auf. Diese besagt, dass ein Uridin in Position 34 („wobble base position“) nicht nur mit Adenin (A), sondern auch mit Guanin (G) paaren kann. Aus heutiger Sicht der Wissenschaft ist die von Crick aufgestellte Hypothese zwar weiterhin aktuell, jedoch wurde sie mehrfach überarbeitet. Wobble Uridine liegen nahezu immer in modifizierter Form vor. Das hat zur Folge, dass wobble Uridine ebenfalls mit U und C (Cytosin) paaren können und damit die Variabilität der wobble Base erhöhen (Nasvall *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 1985). Einige Wissenschaftler postulieren sogar eine neue Form der Translationsregulation auf Ebene der Codon Wahl in Zielgenen (Begley *et al.*, 2007). Sie zeigten am Beispiel der tRNA Methyltransferase Trm9/Kti1, dass mRNAs, bei denen Arginin (AGA) und Glutamat (GAA) Codons überrepräsentiert sind, in *trm9Δ* Stämmen schwächer translatiert wurden als im isogenen Wildtyp-Stamm. Trm9 transferiert die endständige Methylgruppe der mcm^5U_{34} und $mcm^5s^2U_{34}$ Modifikation in Elongator-abhängig modifizierten tRNAs.

Man stelle sich vor, im Genom eines Organismus existiert ein Set von Genen, welche ein überdurchschnittlich hohen Anteil an Elongator abhängigen Codons besitzen. Wird nun aufgrund von veränderten Umweltbedingungen die Modifizierung der entsprechenden tRNAs beeinflusst, hätte dies möglicherweise einen Einfluss auf die effiziente Dekodierung genau dieser mRNAs, während andere nicht oder weniger beeinflusst sein könnten. Eine mRNA-spezifische Translationsregulation wäre somit für die Zelle realisierbar. Das eine Elongator-Disruption die Translation beeinflusst, konnte in *Schizosaccharomyces pombe* eindrucksvoll nachgewiesen werden (Bauer *et al.*, 2012). Die Autoren zeigten, dass das Expressionlevel von 494 Proteinen in *elp3Δ* Zellen um mehr als die Hälfte reduziert war, während das Proteom nur moderat durch eine *ELP3* Deletion beeinflusst wurde. Die Codon-Zusammensetzung der entsprechenden Gene zeigte eine überrepräsentative Anzahl von Elongator-abhängigen AAA-Codons ($tRNA^{Lys_{AAA}}$). In weiteren Analysen fanden sie heraus, dass Cdr2, ein Schlüsselprotein in Zellzyklus- und Zellteilungsvorgängen, in *elp3Δ*-Stämmen drastisch herunter reguliert war, während das *steady state* Level seiner mRNA nicht beeinflusst war. Sowohl die Überexpression der $tRNA^{Lys_{AAA}}$, als auch der Austausch der AAA-Codons gegen Elongator-unabhängige AAG-Codons, resultierte in einer Cdr2-Expression, die dem Level in Wildtyp-Zellen entsprach (Bauer *et al.*, 2012).

In den letzten 6 Jahren wurden Daten publiziert, die zeigten, dass die pleiotropen Elongator-Defekte (Elongator als Multitasking-Komplex) womöglich auf einer tRNA Hypomodifizierung beruhen. Die Hypersensitivität gegen DNA schädigenden Agenzien, veränderte Histon-

Acetylierungsmuster, Sekretionsdefekte oder die Temperatursensitivität von Elongatormutanten konnten durch eine gezielte Überexpression von Elongator-abhängig modifizierten tRNAs (tRNA^{Lys}, tRNA^{Gln} und tRNA^{Glu}) wiederhergestellt werden (Esberg *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). Da ebenfalls in *Caenorhabditis elegans* und *Arabidopsis thaliana* die Notwendigkeit des Elongators für die Modifizierung des wobble Uridins in tRNAs gezeigt werden konnte, ist es fraglich, ob der Elongator tatsächlich einen „Multitasking Komplex“ darstellt (Chen *et al.*, 2009; Mehlgarten *et al.*, 2010).

1.5 Elongator relevante Proteine

1.5.1 *ATS1/KTI13*

ATS1/KTI13 wurde ursprünglich als *multi-copy*-Suppressor von konditionalen Klasse II α -Tubulin-Mutanten isoliert (*ATS1*= α -*tubulin* *suppressor* 1), die bei nichtpermissiver Temperatur mit einem Überschuss an Microtubuli arretieren (Kirkpatrick und Solomon, 1994). Später konnten Fichtner und Schaffrath (2002) zeigen, dass eine Gendeletion sowohl Resistenz gegen Zymocin verleiht als auch elongatordefekt-ähnliche Phänotypen hervorbringt. Der bereits nachgewiesene Einfluss auf tRNA Modifikation bekräftigt die genetische Verbindung zum Elongator (Huang *et al.*, 2005; Zabel *et al.*, 2008). *ATS1/Kti13* nimmt in der Reihe der Elongator relevanten Faktoren jedoch eine Sonderstellung ein, da Mutationen im Gen nicht den vollständigen Verlust der Elongator-abhängigen tRNA Modifikation zur Folge haben. Da circa 18% der tRNAs in *kti13* deplitierten Stämmen modifiziert vorliegen, wird eine eher regulierende Funktion postuliert (Huang *et al.*, 2005; Zabel *et al.*, 2008). *ATS1/KTI13* entspricht dem ORF *YAL020w* auf Chromosom 1. Es hat eine Länge von 1001 Basen und kodiert für ein 333 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 36,5 kDa. Sequenzvergleiche zeigen eine ca. 18%ige Aminosäureidentität zum Säuger Protein DelGEF (*deafness-locus-associated putative guanine nucleotide exchange factor*) einem Vertreter der Rcc1 (*regulator of chromatin condensation* I) Superfamilie. Rcc1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für die kleine Ras-verwandte GTPase Ran (Bischhoff und Postingl, 1991). Strukturell ist Rcc1 durch 7 tandemartigen Wiederholungen von 51-68 Aminosäuren charakterisiert, die zur Ausbildung einer sieben-blättrige beta-Propeller-Struktur führen (Renault *et al.*, 1998). Diese wird aufgrund der Aminosäurestruktur ebenfalls für Kti13 erwartet (hier jedoch nur 5 tandemartige Wiederholungen) (Kirkpatrick und Solomon., 1994; Shields *et al.*, 2003).

In den letzten 20 Jahren wurde eine Vielzahl an weiteren Proteinen identifiziert, die ebenfalls Rcc1 typischen Aminosäurewiederholungen aufweisen (*RCC-like domains*: RLD). Zum jetzigen Stand der Wissenschaft wird davon ausgegangen, dass RLDs Bereiche darstellen,

die es Proteinen ermöglichen, unterschiedlichste Funktionen erfüllen zu können. Vom Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF) für kleine GTPasen, über Enzyminhibition bis hin zur Vermittlung von Protein-Protein oder Lipid-Protein Interaktionen konnte den RLDs funktionell nachgewiesen werden (Hadjebi et al., 2008). DelGEF besitzt im Vergleich zu Kti13 sieben RLDs, jedoch existiert eine verkürzte, aus fünf RLDs bestehende, splice-Variante (Uhlmann et al., 1999). Dieses verkürzte Protein lokalisiert hauptsächlich in den Mitochondrien im Gegensatz zur cytoplasmatisch-kernlokalisierten Verteilung des Vollängenproteins (Uhlmann et al., 2002). Funktionell ist wenig bekannt über DelGEF. 2002 zeigten Sjölander et al., dass DELGEF mit der Exocyst-Untereinheit Sec5 interagiert und diese Bindung positiv beeinflusst wird durch Mg^{2+} , Mn^{2+} , GTP und dCTP Zugabe. Eine zentrale Rolle des Exocyst-Komplex ist die Regulation von sekretorischen Prozessen. Da eine vermehrte Sekretion von Proteoglykanen in einer DelGEF knockdown Linie beobachtet werden konnte, könnte es sich bei DelGEF um einen negativen Regulator des Exocyst-Komplexes handeln (Sjölander et al., 2002). 2 Jahre später identifizierte diese Arbeitsgruppe einen weiteren Faktor (DelGIP1 = *DelGEF interacting protein 1*), der ebenfalls die Proteoglykan Sekretion negativ beeinflusst und mit DelGEF interagiert (Sjölander et al., 2004). Vergleicht man die Aminosäuresequenz von DelGIP1 mit dem Proteom von *S. cerevisiae*, so findet man ein mögliches Homolog mit einer Identität in der Aminosäuresequenz von 38%. Interessanterweise handelt es sich hierbei um Kti11/Dph3 (*killer toxin insensitive 11/ diphthamide 3*), einen Faktor, der ebenfalls für die Elongator-abhängige tRNA Modifikation notwendig ist. Eine Protein-Protein Interaktion zwischen Kti11 und Kti13 konnte mittels Ko-Immunopräzipitation in Hefe durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Zabel et al., 2008). Da Interaktionsstudien zwischen Kti13 und Elongator-Untereinheiten keine Protein-Wechselwirkungen feststellen konnten, wird ein möglicher regulatorischer Einfluss von Kti13 auf den Elongator Komplex über den Elongator-Interaktor Kti11 vermutet (Zabel et al., 2008).

1.5.2 **KTI11/DPH3**

2002 fanden Fichtner und Schaffrath durch Komplementationsanalysen mit einer Hefe Gen-Bank heraus, dass *KTI11* dem ORF *YBL071w-A* auf Chromosom II entspricht. Neben der Zymocin Resistenz zeichnen sich *kti11* Mutationen ebenfalls durch erhöhte Temperatursensitivität und Hypersensitivität gegenüber Koffein und Calcofluor White aus und zeigen damit den bereits bei Elongator-Mutanten beschriebenen *tot*-Phänotypen (Fichtner und Schaffrath, 2002).

Kti11 ist ein zwischen allen Eukaryoten hochkonserviertes (zwischen 35-50% Aminosäuresequenz Identität), kleines Protein (82 Aminosäuren) mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von ca. 9 kDa. Die Protein-Struktur wurde 2005 durch Sun et al. mit Hilfe

der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) aufgeklärt (Abb. 4). Erstaunlich hierbei ist der recht kompakt strukturierte N-Terminus im Vergleich zum relativ unstrukturierten und weniger konservierten C-terminalen Teil (Sun et al., 2005). Aufgrund von vier hochkonservierten Cystein Resten (C25, C27, C47 und C50), die an der Koordinierung eines Zink-Ions beteiligt sind, erfolgte die Klassifizierung von Kti11 in die *Zn-ribbon* Gruppe, eine Unterklasse der Zink-Finger Superfamilie. Ein klassisches Merkmal dieser Proteinfamilie ist die Ausbildung von 2 symmetrischen Schleifen im Zentrum der Zink-Bindedomäne, wobei jede dieser Schlaufen aus 2 antiparallelen β -Faltblättern besteht (Krishna et al., 2003). Typisch für die Zink-Ion koordinierende Domäne in Kti11 ist die Abfolge von $\beta\beta\alpha\beta$ Faltblättern bzw. Helices in der Sekundärstruktur. Da keine vergleichbare Sekundärstruktur anderer Zn-Finger Proteine existiert, wurde Kti11 in eine neue Gruppe, die CSL-Zink-Finger Klasse, eingeteilt. (CSL steht dabei exemplarisch für die Aminosäuresequenz um das letzte Zink koordinierende Cystein in Kti11).

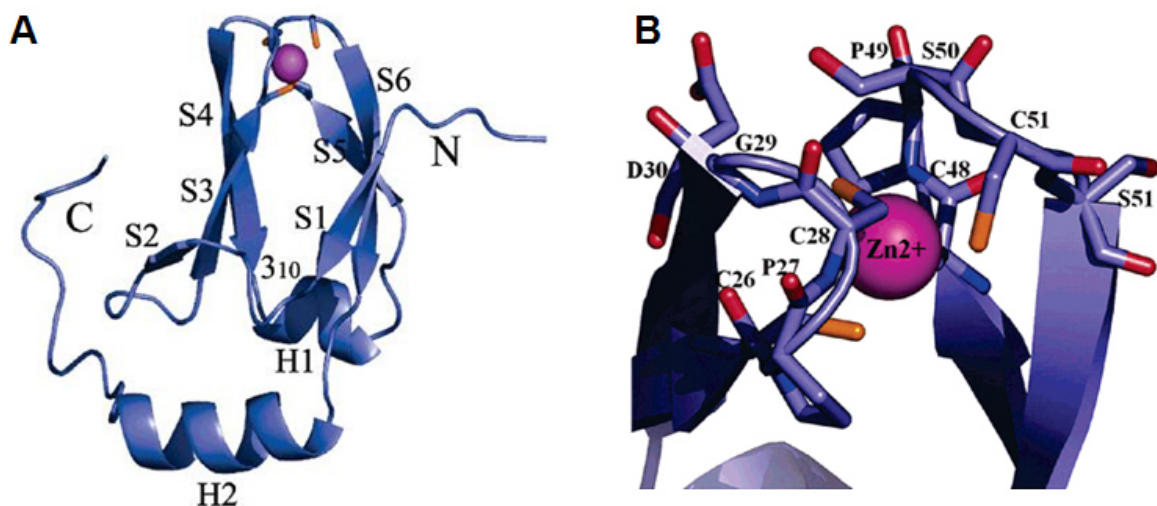


Abbildung 4: NMR Struktur von Kti11 (Sun et al., 2005).

A Sekundärstrukturdarstellung von Kti11. Das gebundene Zinkion (Zn^{2+}) ist in violett dargestellt. Charakteristisch ist der kompakte N-Terminus. **B** detaillierte Darstellung der Zink-Bindedomäne. Das Zinkion (Zn^{2+}) ist in violett dargestellt, während Sauerstoffatome in rot und die Schwefelatome der Zink koordinierenden Cystein-Reste orange-farbig markiert sind.

Zn-ribbon-Domänen wurden in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert, welche in unterschiedlichste zelluläre Prozesse involviert sind, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Primasen, RNA Polymerase-Untereinheiten, Topoisomerasen, ribosomale Proteine, Chaparone, Casein Kinase II, Rieske Eisen-Schwefel Protein, Rubredoxin, Rubrerythrin, Desulfiredoxin, Aminacyl-tRNA Synthetasen, Adenylat-Kinasen u. v. m. (Zhu et al., 1996; Qian et al., 1993, Baraldi et al., 1999; Hard et al., 2000; Martinez-Yamout et al., 2000; Grishin, 2000; Harms et al., 2001; Chantalat et al., 1999; Iwata et al., 1996; Berry and

Phillips, 1998). Die Funktion der *Zn-ribbon* Domäne kann dabei vielseitig sein. Neben der Vermittlung von Protein-DNA Interaktionen wurden ebenfalls Protein-RNA Interaktionen, Protein-Dimerisierung, Protein-Stabilisierung und Elektronentransportfunktion durch Rubredoxin oder dem Rieske-Protein dieser Domäne funktionell zugeordnet (Luscombe et al., 2000; Bochkareva et al., 2000; Chantalat et al., 1999; Berry and Phillips, 1998; Iwata et al., 1996; Krishna et al., 2002). Welche Funktion die Zink-Bindedomäne in Kti11 jedoch besitzt ist nicht bekannt.

Trotz der geringen Größe sind bis heute eine Vielzahl an Interaktoren durch Ko-Immunopräzipitationen und Tandem-Affinitätsreinigungen (TAP) für Kti11 identifiziert worden. Neben dem Elongator-Komplex konnten Protein-Protein Wechselwirkungen mit dem DelGEF Homolog Ats1/Kti13, 40S ribosomalen Proteinen Rps7A und Rps19A, Translations-Elongationsfaktor II (Eft2) und Diphthamid-Biosynthese relevanten Proteinen (Dph1 und Dph2) aufgedeckt werden (Fichtner et al., 2003; Bär et al., 2008; Zabel et al., 2008). In Abbildung 5 sind die bekannten Interaktoren schematisch dargestellt. Eine nähere Charakterisierung der Kti11 Interaktion mit seinen Bindepartnern zeigte, dass Kti11 zwar mit dem Elongator interagiert, aber eine *kti11* Deletion die Elongator-Integrität nicht beeinflusst (Fichtner et al., 2003; Bär et al., 2008). Da eine Verkürzung von Kti11 um 15 Aminosäuren (*kti11-1*) zum Verlust der Elongator-Interaktion führt, wird die Elongator Interaktionsdomäne im C-terminalen Bereich von Kti11 vermutet (Bär et al., 2008). Interessanterweise hat diese Mutation keinen Einfluss auf die Kti13 Interaktion (Bär et al., 2008). Kti11-Kti13 scheinen eine vom Elongator unabhängige Bindung einzugehen, da Disruptionen einzelner Elongator-Untereinheiten die Interaktion beider Proteine nicht beeinflussen (Zabel et al., 2008). Dies wird bekräftigt durch synergistische Wachstumsdefekte von *kti11 kti13* Doppelmutanten in einem sekretionsdefizienten Stammhintergrund *sec2-59*, welche in *kti11Δ elp3Δ* oder *kti13Δ elp3Δ* Doppelmutanten nicht zu beobachten waren. Dies deutet auf eine zusätzliche Elongator unabhängige Funktion von Kti11/Kti13 in möglicherweise sekretionsrelevanten Prozessen hin (Zabel et al., 2008).

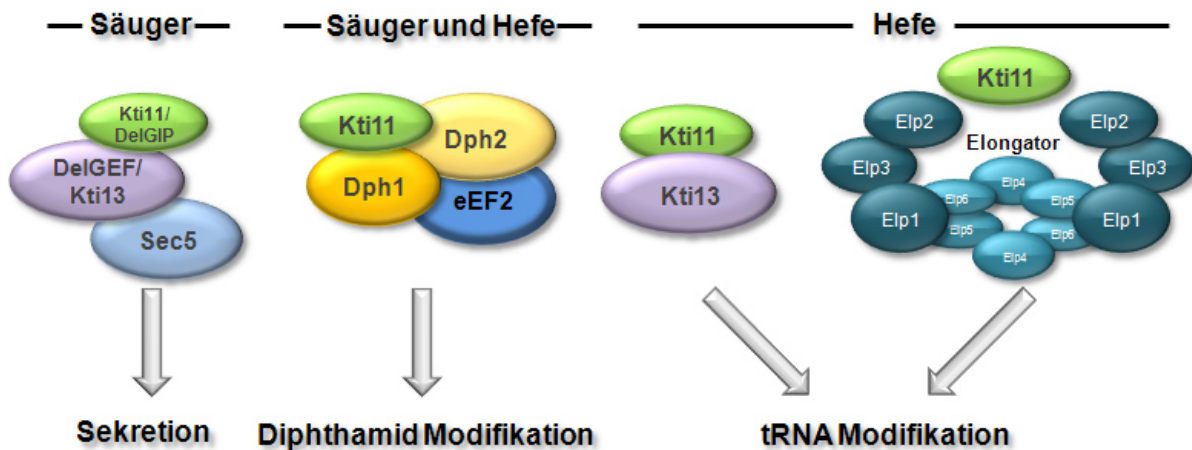


Abbildung 5: Schematische Darstellung bekannter Kti11 Interaktoren in Hefe und Säuger.

Kti11/DelGIP1 interagiert im Säuger mit dem Kti13 Homolog DelGEF, welches wiederum mit der Exocyst-Untereinheit Sec5 interagiert. Beide Proteine zeigen einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die Proteoglycan Sekretion. In Hefe und Säuger wechselwirkt Kti11 mit den Diphthamid Biosynthese relevanten Proteinen Dph1 und Dph2 sowie dem Diphthamid-Akzeptor-Protein eEF2. In Hefe interagiert Kti11 mit dem Elongator-Komplex (Elongator Model nach Glatt et al., 2012). Die Interaktion-vermittelnde Elongator-Untereinheit konnte bis heute nicht identifiziert werden. Ebenfalls konnte eine Protein-Protein Wechselwirkung mit dem tRNA Modifikations-relevanten Faktor Kti13 nachgewiesen werden. Die Größe der schematisch dargestellten Proteine entspricht nicht dem tatsächlichen Molekulargewicht. (verändert nach Bär *et al.*, 2008)

Mutationen in *KTI11* schützen Zellen nicht nur vor dem Zymocin induzierten Zelltod, sie bieten auch Schutz gegenüber dem vom menschlichen Pathogen *Corynebacterium diphtheriae* sezernierten heterodimeren Diphtherie-Toxin (Liu und Leppla, 2003). Das Diphtherie Toxin (DT) besteht aus 2 Untereinheiten, zum einen die B-Untereinheit, welche die Bindung des Toxins an die Diphtherie-Toxin-Rezeptoren (Abb. 6) (*Heparin-binding EGF-like growth factor*) von menschlichen Zellen ermöglicht und damit die Translokation in frühe Endosomen durch Rezeptor-vermittelte Endocytose induziert (Iwamoto et al., 1994; Lemichez et al., 1997; Papini et al., 1988). Aufgrund des sauren Milieus in den Endosomen kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung und Denaturierung des Holotoxin. Dadurch wird eine auf Untereinheit B lokalisierte Transmembrandomäne frei, die mit der Endosomenmembran interagiert und somit die A-Untereinheit ins Cytosol freisetzt (Draper und Simon, 1980; Kaul et al., 1996; D`Silva und Lala, 1998). Im Cytoplasma katalysiert schließlich die A Untereinheit, eine mono-ADP-Ribosyltransferase, den Transfer einer ADP-Ribosylgruppe vom Nicotinamidenindinukleotid (NAD) auf einen post-translationell modifizierten Histidinrest H715 (in Hefe H699) im eukaryotischen Elongationsfaktor 2 und inaktiviert ihn damit (Abb. 6) (Van Ness et al., 1980, Collier, 1967). Die Folgen sind ein Proteinbiosynthesestopp verbunden mit dem Zelltod. Resistenz gegen das Holo-Toxin wird vor allem durch die Toxinaufnahme-Defizienz vieler eukaryotischer Organismen durch einen

fehlenden Diphtherie-Toxin-Rezeptor auf der Zelloberfläche verursacht (Middlebrook et al., 1978; Cha et al., 1999). Eine intrazelluläre Expression der toxischen A Untereinheit führt jedoch in allen Eukaryoten zur ADP-Ribosylierung des EF2. Die hochgradige Konservierung dieses Faktors ist in der wichtigen Funktion für jede Zelle begründet. EF2 ist essentiell für die Translokation der Ribosomen entlang der mRNA. Die biologische Relevanz der Diphthamid-Modifizierung ist weitestgehend unbekannt, wird aber kontrovers diskutiert. Es wird aber angenommen, dass sie eine wichtige Rolle für die translationelle Genauigkeit und Aufrechterhaltung des korrekten Leserasters spielt, da Diphthamid-Biosynthese defiziente Hefestämme während der Translation vermehrt zu -1 *Frameshifting* neigen (Ortiz et al., 2006).

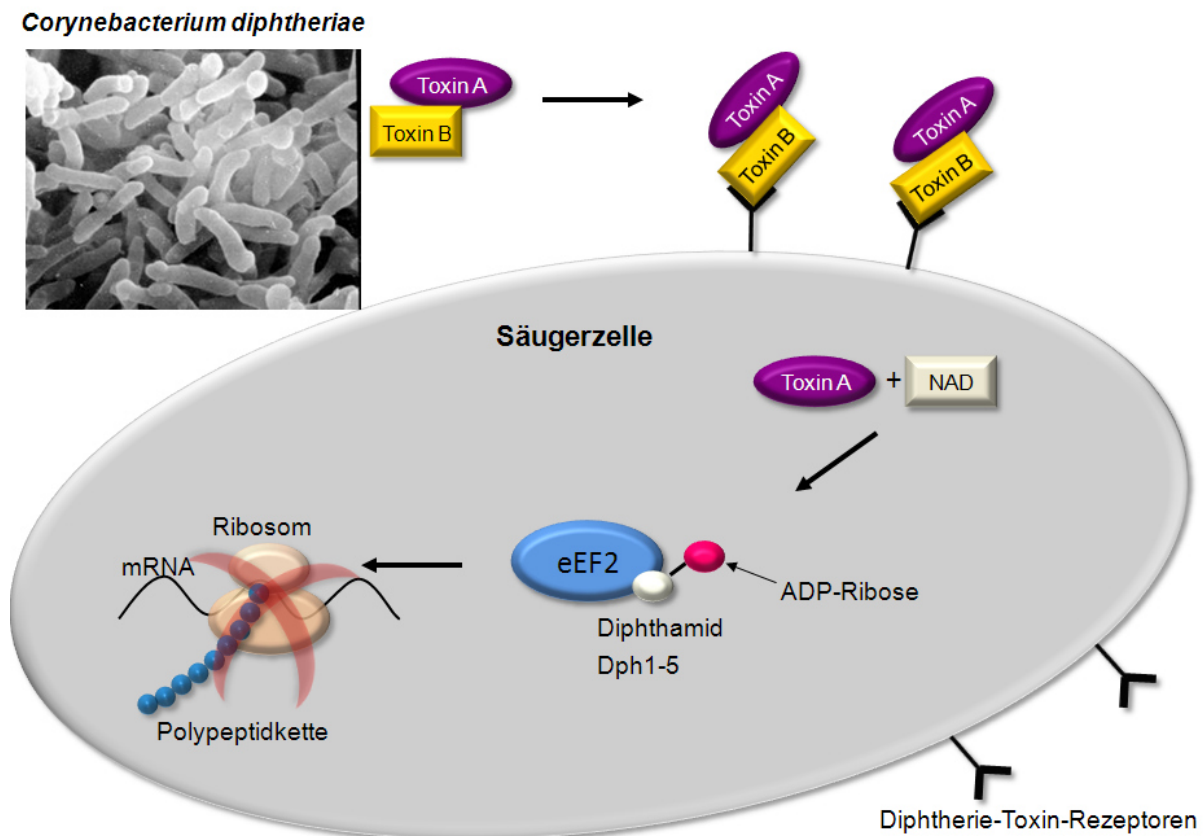


Abbildung 6: Wirkmechanismus vom Diphtherie-Toxin in Säugerszellen.

Nach Sekretion des heterodimeren Diphtherie-Toxins durch *Corynebacterium diphtheriae* bindet dieses an Diphtherie-Toxin-Rezeptoren (*Heparin-binding EGF-like growth factor*). Im Zellinneren katalysiert die A-Untereinheit den Transfer von ADP-Ribose auf den Diphthamid-modifizierten Histidinrest 715 des eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (EF2). Die Diphthamid Biosynthese bedarf dabei der Proteine Dph1-Dph5 und YBR246W. Durch ADP-Ribosylierung wird der EF2 inaktiviert und die Ribosomen-Translokation an translatierter mRNA wird verhindert.

In Hefe sind 6 Proteine für die Modifizierung des EF2 notwendig. Neben Kti11/Dph3 benötigt man für den 1. Schritt der Biosynthese, die Übertragung einer 3-amino-3-carboxyl Gruppe

vom S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf den Imidazolring des Histidins H699, Dph1, Dph2 und Dph4 (Liu und Leppla, 2003; Liu et al., 2004). Dieser Schritt bedarf der radikalische Spaltung von SAM durch ein in Dph1-Dph2 gebundenes [4Fe-4S]-Cluster (Zhang et al., 2010). Der nächste Schritt, eine Trimethylierung, wird durch die Methyltransferase Dph5 katalysiert und es entsteht das Zwischenprodukt Diphthine (Zhu et al. 2010). Im letzten Schritt erfolgt eine Amidierung des Diphthins durch YBR246W (Su et al., 2012). Mutationen in den biosynthese-relevanten Genen in Hefe führen einerseits zur DT-Resistenz, zeigen aber, bis auf *kti11*, erstaunlicherweise keine nennenswerten Wachstumsdefizite (Bär et al., 2008). Im Modellorganismus Maus hingegen zeigten sich drastische phänotypische Veränderungen. Fast alle homozygoten knock-out Mäuse für *dph1*, *dph3* oder *dph4* starben vor ihrer Geburt mit starker Unter- und Fehlentwicklung (Chen und Behringer, 2004; Webb et al., 2008; Liu et al., 2006). Auch hier zeigten *kti11/dph3* Mausmutanten den gravierendsten Phänotypen und starben am 11. Tag der Embryogenese (Liu et al., 2006). Die Autoren erklären diese zusätzlichen Wachstumsdefekte mit der Involvierung von Kti11/Dph3 in zwei biologisch voneinander getrennte Prozesse.

1.6 Zielstellungen

Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse über das Elongator- und diphthamidbiosynthese-relevante Protein Kti11/Dph3 zu erhalten. Obwohl in den letzten Jahren einige Studien sich mit diesem Protein beschäftigten, konnte dessen Funktion in der Zelle nicht genau eingegrenzt werden.

Die Arbeit untergliedert sich in 2 Teilaspekte. Zum einen sollte ein mögliches Kti11 Homolog in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und wenn möglich in *S. c.* und *A. t.* charakterisiert werden. Beginnend mit Komplementationsanalysen in Hefe, sollte ebenfalls die Möglichkeit der Wechselwirkung von AtKti11 mit Hefe Proteinen untersucht werden. Schließlich sollten Interaktions- und Lokalisationsstudien im pflanzlichen System zeigen, ob die gesammelten Erkenntnisse aus Hefe auch auf Pflanzen zutreffen.

Der 2. Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der proteinbiochemischen und genetischen Analyse von Kti11 und Cystein-Substitutionsmutanten. Vor allem sollte die Frage adressiert werden, ob Cystein-Mutationen einen Einfluss auf die Metallionenbindung haben und wenn ja, wie sich diese auf Proteinwechselwirkungen mit bekannten Interaktoren auswirkt. Mit geeigneten Assays sollte die Funktionalität der Varianten in der tRNA-Modifikation und Diphthamid-Biosynthese bestimmt werden.

Für die katalytisch aktive Untereinheit des Elongator Komplexes Elp3 wird neben der Histonacetyltransferase-Domäne eine 2., N-terminal gelegene Radikal-SAM-Domäne vermutet. Vom Elp3 Homolog aus dem Archaen *Methanocaldococcus jannaschii* ist bekannt,

das Elp3 mit Hilfe drei konservierter Cystein-Reste innerhalb der Radikal-SAM-Domäne ein [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, SAM bindet und spaltet (Paraskevopoulou *et al.*, 2006). Das dabei entstehende 5'-Deoxyadenosyl-Radikal könnte an katalytischen Reaktionen von Elp3 beteiligt sein. Mutationen sollten in diese Domäne eingeführt werden (in Kooperation mit Osita Onuma) und der Einfluss auf die Elongator Integrität und Kti11 Wechselwirkung untersucht werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Rolle von Kti11 in der tRNA- und Diphthamid-Modifikation zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Großgeräte und nicht gesondert erwähnte Hilfsmittel

Tabelle 2: Großgeräte und Hersteller

Geräte	Hersteller
Äkta	Amersham Bioscience
Autoklav	Varioklav
Brutschrank, Trockenschrank	Heraeus Instruments
Brutschränke, Schüttler	Memmert, Infors
Elektrophorese-Apparatur, Mini Trans Blot Apparatur, Geldokumentation	Bio Rad
Fluoreszenzmikroskop Axioskop, LSM510	Zeiss
Folienschweißgerät	RISCHE
Geldokumentation	MWG
Heizblock	SEL Laboratory Products, Roth
Luftschüttler	Janke & Künkel
Mikroskop	Zeiss
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf
Schnellkochtopf	WMf
Sequenzierer	ABI
Spektralphotometer	Pharmacia
Thermocycler	Eppendorf
Vibrax-Schüttler	VWR
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage / Feinwaage	Sartorius
Wasserbad	Julaba
Zentrifugen	Beckmann, Eppendorf

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Lieferanten
ECL Plus, Calmodulin-Sepharose, IgG-Sepharose, Ni-NTA-Sepharose, Protein-A-Sepharose,	Amersham Bioscience/ GE Healthcare
BigDye Terminator v1.1 DNA-Sequenzierungskit	Applied Biosystems

MATERIAL & METHODEN

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Biorad Laboratories
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Biorad Laboratories
Glasperlen	Braun Biotech
Hefeextrakt, Pepton, Trypton, YNB, Glycin	Difco
CIAP, dNTPs, Molekulargewichtsstandard (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Prestained Protein Molecular Weight Marker), <i>Pfu</i> -Polymerase, Restriktionsendonukleasen, GeneJet Plasmid Miniprep Kit, RNase, <i>Taq</i> -Polymerase, T4-DNA-Ligase	Fermentas
Galaktose, TEMED	Fluka
Glycerol, Tris Ultra Pure, Zymolyase, EDTA	ICN
PCR Topo-TA Cloning Kit [®] , TEV-Protease	Invitrogen
Sekundäre Antikörper	Jackson Immuno Research
Röntgenfilme, Fixierer, Entwickler	Kodak
Magnesiumchlorid	Merck
PVDF-Membran	Milipore
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Fast-Start- <i>Taq</i> DNA-Polymerase, Proteinase-Inhibitor Complete, primäre Antikörper	Roche
Acrylamid, Agar-Agar, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin, β -Mercaptoethanol, BSA, Borsäure, Calciumchlorid, Dikaliumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dimethylpimelimidat, 1,4-Dithiothreit, DMSO, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Ethanolamin Ethidiumbromid, Formaldehyd, Glucose, HEPES, IPTG, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Magnesiumacetat, Magnesiumsulfat, Methanol, Milchpulver, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumfluorid, Natriumhydroxid, Natriumdihydrogenphosphat, Polyethylenglycol 4000, Polyethylenglycol 3350, Pepton, Phenol, Rubidiumchlorid, Saccharose, Salzsäure, Sorbitol, Tween 20, Wasserstoffperoxid, XGal	Roth
Primäre Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Glasperlen	Sartorius

MATERIAL & METHODEN

Agarose, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue G250, SDS, Tween20, DAB, Hefeextrakt Trypton, Tetramethylethylendiamin, G418 (Geneticin), Glycerin	Serva
Lithiumacetat, Nickelchlorid, Salmosperm-DNA, Lysozym, Dimethylpimelimidat, Natrium-Borat	Sigma
3MM Filterpapier	Whatman

2.1.3 Mikroorganismen

2.1.3.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 4: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz/Quelle
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80LacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL
TOP10	<i>F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
Subcloning Efficiency TM DH5 α TM	<i>F⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	Invitrogen
Rosetta-gami(DE3)pLysS	<i>Δ(ara-leu)7697 _lacX74 _phoA P_{vull} phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F['][lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (CamR, StrR, TetR)</i>	Novagen

2.1.3.2 *Kluyveromyces lactis* Stämme

Tabelle 5: Verwendete *Kluyveromyces lactis* Stämme

<i>K. lactis</i>	Genotyp	Referenz / Quelle
AWJ137	<i>MATa leu2 trp1 [k1⁺ k2⁺]</i>	Kämper et al. (1991)

2.1.3.3 *Agrobacterium tumefaciens* Stämme

Tabelle 6: Verwendete *Agrobacterium tumefaciens* Stämme

<i>A. tumefaciens</i>	Genotyp	Referenz / Quelle
GV3101 pMP90	C58C1 Rif ^R	Koncz und Shell, 1986

2.1.3.4 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Tabelle 7: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp	Referenz/Quelle
CY4029	<i>MATa W303 SSD1-v1</i>	Luke et al. (1996)
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf, Frankfurt
Y00388	wie BY4741, aber <i>kti13Δ::kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
W303-1a	<i>MATa ura3-1 leu2-3, -112 his3-11, -15 trp1-1, ade2-1, can 100-1</i>	T. Davies

MATERIAL & METHODEN

RZY40	CY4029, aber <i>kti11Δ::KITRP1</i>	diese Arbeit
UMY2893	<i>MATα SUP4 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	Huang <i>et al.</i> (2005)
UMY2936	UMY2893, aber <i>kti11::kanMX6</i>	Huang <i>et al.</i> (2005)
UMY2940	<i>MATα SUP4 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 kti13Δ::KanMX4</i>	Huang <i>et al.</i> (2005)
RZY52	W303, aber <i>DPH1-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	diese Arbeit
RZY53	W303, aber <i>DPH2-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	diese Arbeit
FY1679-O8A	<i>MATα ura3-52 leu2D1 trp1D63 his3D200 GAL</i>	Euroscarf, Frankfurt
FFY2t-a	FY1679-O8A, aber <i>ELP2-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	F. Frohloff
FFY6t-a	FY1679-O8A, aber <i>ELP6-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	F. Frohloff
FFY4t-a	FY1679-O8A, aber <i>KTI12-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	F. Frohloff
RZY34	W303, aber <i>kti11Δ::KIURA3</i>	diese Arbeit
RZY05	CY4029, aber <i>kti13Δ::KIURA3</i>	diese Arbeit
FFY3t	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	F. Frohloff
ONY01	Like FFY3t, but <i>elp3Δ::KIURA3</i>	O. Onuma
ONY2	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY3	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C108A::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY4	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C118A::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY5	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C121A::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY7	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C224A-C236A::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY11	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C108A-C118A-C121A::SpHIS5</i>	O. Onuma
ONY12	FY1679-O8A, aber <i>ELP3-(c-myc)₃-C108A-C118A-C121A-C224A-C236A::SpHIS5</i>	O. Onuma

2.1.4 *Arabidopsis thaliana* Linien

Gearbeitet wurde mit *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia-0) aus der Familie der Brassicaceae. Verwendete T-DNA-Insertionslinien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete *Arabidopsis thaliana* Linien

T-DNA-Insertionslinie	Ort der T-DNA Insertion
Salk_039327	im Promoterbereich von At2g15910.2

2.1.5 Primer

Tabelle 9: Verwendete PCR-Primer (MWG Operon AG)

Bezeichnung	Sequenz
<i>KTI11/YBL071w</i> ORF FW	ATGAACACTGCGTAAGAGAAAGCCC
<i>KTI11/YBL071w</i> ORF RV	TAGTAATTCCAACCGGAGTCCAGCG
P21HA-RVAH	GAAGCTTGGCGCGCCCTGAGCAGCGTAATCTGGAAC

P21HA-FWE	GGAATTCTGAACGCTTGCCCTAATGCG
Hinel404	ACCATATTACGATTGAGAGAG
Hinel405	ATTGCAGATTGTCTTCTTATC
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
LBc1	CGTCCGCAATGTGTTATTAAG
TDNA-internal Fw	GACAAGTGTGTCGTGCTCCA
TDNA-internal Rv	AAATGGCTCAAGTCGGTGAC
<i>ATKT111</i> -Fw-Gat	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCATGTCGTACGACG ATGTTGAGATA
<i>ATKT111</i> -Rv-Gat	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCAACGGCCACA GGGTGAC
<i>KT111</i> myc-RV-HindIII	GAAGCTTGAGGTGTGGTCAATAAGAGCG
<i>Kti11</i> -Fw-HindIII	GAAGCTTATGTCAACATATGACGAAATC
<i>Kti11-1</i> _Rv-HindIII	CCAAGCTTCTAAGCCAAGTCTTCTTTATCGAAAAC
H- <i>KT111</i> -Rv	GAAGCTTTTAGGCAGCAGCGGCAATAGGC
<i>KT111</i> -Fw-His	ACCATGCAACATATGACGAAATCG
<i>AtKT111</i> -Fw-His	ACCATGTTCGTACGACGATGTTGAG
<i>KT15</i> -CACC-Fw	CACCATGTCAACATATGACGAAATC
<i>AtKT15</i> -CACC-Fw	CACCATGTTCGTACGACGATGTTGAG
H- <i>ATKT111</i> -RV2	GAAGCTTTTAGGCAACGGCCACAGGGTG
<i>AtKT15</i> -Rv-i	GTAATCTGGAACAAATCACCAGAAGGACAAGGATACGTGTACGC
<i>AtKT15</i> -Fw-i	GCGTACACGTATCCTTGTCTTCTGGTGATTTGTTCCAGATTACG
RB1	TCAGTTCCAAACGTAAAACGGC
<i>Kti11</i> -Rv o.S.	GGCAGCAGCGGCAATAGGCT
A- <i>ATKT111</i> -FW	GGGCGCGCCAATGTTCGTACGACGATGTTGAG
M13-R	CCCAGTCACGACGTTGTAAP
M13-F	AGCGGATAACAATTTACACAGG
<i>koKT111/YBL0171w</i> Fw	ACATACCACGACTGTAAGCACATCATTGTACAATACATTACCAG CTGAACGACGGCCAGTGAATTCCCGG
<i>koKT111/YBL0171w</i> Rv	CTTTATTTCTATTTGTATTCTCGATCTAGCCTCTCATCTTTAGGCA GCAGAGCTTGGCTGCAGGTTCGACGG
S2-DPH2	TTAAAATCTTGGATTTAAATAGAGAAGTTCGAGGGAAACAAATTAT AAGAGATCGATGAATTCGAGCTCG
S3-DPH2	CACGTGGTTATGGATTTGATCGCGAAGACGCTATGAAAAAGGAA AACAAACGTACGCTGCAGGTTCGAC
S2-DPH1	TATTTATACATATGTAACAGGAAGACAAGTGACAACAAAACTATT TAAAATCGATGAATTCGAGCTCG
S3-DPH1	ACGAAGCTAAAGGATACGGGCGTGGGGAAACTCCGAAACATGC GATTGAACGTACGCTGCAGGTTCGAC
<i>KT111</i> -Rv	TTAGGCAGCAGCGGCAATAGGC
<i>AtKT111</i> -Rv	TTAGGCAACGGCCACAGGGTG
<i>KT15</i> -Rv-i	GATATATTTGAAACCTATCTCCAGAGGGACAAGGATAGGTGAAC
<i>KT15</i> -Fw-i	GTTACCTATCCTTGTCCCTCTGGAGATAGGTTTCAAATATATC
<i>KT111</i> _Fw-C47S	GGCGAAAAAGTTGCTGTTAGTCCCAGCTGCTCACTGATG
<i>KT111</i> -Rvi_C47S	CATCAGTGAGCAGCTGGGACTAACAGCAACTTTTTCGCCCTC
<i>KT111</i> -Rvi_C25S	CCTATCTCCACAGGGAGTAGGATAGGTGAACATTTGATTTTC
<i>KT111</i> -Fw_C25S	CAAATGTTACCTATCCTAGTCCCTGTGGAGATAGGTTTC
<i>KT111</i> _Fw_C50S	GTTGCTGGTTGTCCAGCAGCTCACTGATGATCGATGTAG
<i>KT111</i> _Rvi_C50S	CTACATCGATCATCAGTGAGCTGCTGGGACAAACAGCAACTTTTT C
pJet1-Forward Sequencing Primer	GCCTGAACACCATATCCATCC
pJet1-Reverse	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC

MATERIAL & METHODEN

Sequencing Primer	
pTrcHISForward	GAGGTATATATTAATGTATCG
pTrcHISReverse	GATTTAATCTGTATCAGG
ko <i>KTI13/ATS1</i> FW	GCTATAACAGGCTTGTATCGATGAGTTGTGTGTATG CGTTTGGGTCTAATCGACGGCCAGTGAATCCCGG
ko <i>KTI13/ATS1</i> RV	ATAGTGGGTATATAGTTACTTATCAGTGCTAGAGCA CGATCCACGTGGTGAGCTTGGCTGCAGGTGACGG
<i>KTI13/ATS1</i> ORF FW	CCACACTTGCATCCGGAACGTGTTGGC
<i>KTI13/ATS1</i> ORF RV	CGCAAGTACGGGCGATAACAAAAGGC
S3- <i>KTI13/ATS1</i>	CTGGAAAACCTCGCGTGTTTGGCGGATGTGCCAC CACGTGGATCGTGCTCCGTACGCTGCAGGTGAC
S2- <i>KTI13/ATS1</i>	TGAATGGACATCTATGTATATGATAGTGGGTATA TAGTACTTATCAGTGATCGATGAATTCGAGCTCG
Spel-HA-Fw	GGACTAGTATGTCTTTAATTAACATCTTTTACCC
XhoI- <i>KTI11</i> -Rv	GGCTCGAGTTAGGCAGCAGCGGCAATAGGC
<i>Kti11-1</i> _Rv-HindIII	CCAAGCTTCTAAGCCAAGTCTTCTTTATCGAAAAC
27060Fw	GGGATCCATGGCCGAACACGGTGAGAC
27060Rv	GGGCCGCTAGGGCCCTATGACGAGGTTGGT

2.1.6 Plasmide

Tabelle 10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Referenz/Quelle
pHMS14	Amp ^R <i>ARS1 CEN4 HIS3 UASGAL1-γ-Toxin(k1ORF4)</i> , pMB1ori	R. Schaffrath
pHMS22	Amp ^R <i>ARS1 CEN4 HIS3 UASGAL1</i> pMB1ori	R. Schaffrath
YCplac33	Amp ^R <i>ARS1 CEN4 URA3</i> , pMB1ori	Gietz und Sugino (1988)
YCplac111	Amp ^R <i>ARS1 CEN4 LEU2</i> , pMB1ori	Gietz und Sugino (1988)
YEplac181	Amp ^R 2μ <i>LEU2</i> , pMB1ori	Gietz und Sugino (1988)
YEplac195	Amp ^R 2μ <i>URA3</i> , pMB1ori	Gietz und Sugino (1988)
pRZ01	pCR-2.1-TOPO Derivat plus 1,5 kb PCR ORF <i>KTI13</i>	diese Arbeit
pRZ13	YCplac111 Derivat plus 1,5 kb <i>XbaI/HindIII</i> aus pRZ01 in <i>XbaI/HindIII</i> YCplac111	diese Arbeit
pRZ48	YCplac111 Derivat + 1410 bp PCR-Fragment <i>pGAL1-(HA)₃</i> mit Primern P21HA-FwE u. P21HA-RVAH aus pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA mit <i>EcoRI/HindIII</i> in YCplac111	diese Arbeit
pRZ49	pRZ48 + 246bp ORF <i>AtKTI11</i> mit <i>Ascl/HindIII</i>	diese Arbeit
pRZ45	pRZ48 + 249bp ORF <i>KTI11</i> mit <i>Ascl/HindIII</i>	diese Arbeit
pRZ56	pDONR211 Derivat + 246bp <i>AtKTI11</i>	diese Arbeit
pRZ57	pK7FWG2,0 Derivat +246 bp <i>AtKTI11</i>	diese Arbeit
pRZ58	pK7m34GW,0 Derivat + <i>p35S</i> aus pEn-L4-2-R1,0 + <i>AtKTI11</i> aus pDONR211 +TAP-tag aus pEN-R2TAPtagL3,0	diese Arbeit
pCB12	Ycplac33-Derivat + <i>KTI11</i> Fragment <i>HindIII/SacI</i> aus pCB07	Bär et al., 2008
pRZ59	pCM190 Derivat + 1161 bp <i>AtKTI13</i> mit <i>BamHI/SfiI</i>	diese Arbeit

pCB27	YEplc195 Derivat + KTI11 Fragment HindIII/SacI aus pCB07	Bär et al., 2008
pCB07	Amp ^R , gap repair zw. <i>SnaBI/Agel</i> -pCB1-Vektorrückgrat und <i>KTI11</i>	C. Bär
pRZ53	pMA03 + <i>KTI11-(c-myc)₃</i> mit HindIII/HindIII	diese Arbeit
pRZ60	pTrcHIS2-TOPO + 249bp <i>KTI11</i>	diese Arbeit
pRZ61	pTrcHIS2-TOPO + 249bp <i>kTI11-C27S</i>	diese Arbeit
pRZ62	pTrcHIS2-TOPO + 249bp <i>kTI11-C47S</i>	diese Arbeit
pRZ63	pTrcHIS2-TOPO + 249bp <i>kTI11-C50S</i>	diese Arbeit
pRZ70	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ80	diese Arbeit
pRZ71	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ81	diese Arbeit
pRZ72	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ82	diese Arbeit
pRZ73	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ83	diese Arbeit
pRZ74	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ84	diese Arbeit
pRZ75	YEplac112 + 2074 bp Fragment KpnI/SacI aus pRZ85	diese Arbeit
pRZ64	pRZ48 + <i>Ascl/HindIII kTI11-C27S</i> Fragment	diese Arbeit
pYM5	Amp ^R pYM4 Derivat <i>HIS3MX6</i> , 3Myc-Epitop	Knop et al. (1998)
pYM3	Amp ^R pFA6a- <i>HIS5MX6</i> Derivat, <i>K. lactis TRP1</i> , 6HA-Epitop	Knop et al. (1998)
pDONR221	Gateway Entry-Vektor; Km ^R	Invitrogen
YDpKI-Leu	Amp ^R pUC9_ Derivat, <i>K. lactis LEU2</i>	Jablonowski (2000)
YDpSp-His	Amp ^R pUC9_ Derivat, <i>S. pombe HIS3</i>	Jablonowski (2000)
YDpKI-Ura	Amp ^R pUC9_ Derivat, <i>K. lactis URA3</i>	Jablonowski (2000)
YDpW	Amp ^R , pUC9_ Derivat, <i>S.cerevisiae TRP1</i> , pMB1ori	Berben et al. (1991)
pDJ41	YEplac195 (<i>2μ/URA3</i>) plus <i>TOT4/KTI12</i>	Jablonowski et al. (2004)
pRZ65	pRZ48 + <i>Ascl/HindIII kTI11-C47S</i> Fragment	diese Arbeit
pRZ66	pRZ48 + <i>Ascl/HindIII kTI11-C50S</i> Fragment	diese Arbeit
pRZ67	pRZ48 + <i>Ascl/HindIII kTI11-C25S</i> Fragment	diese Arbeit
pRZ77	pRZ48 + 201bp Fragment <i>kTI11-C27S-11-1</i> <i>Ascl/HindIII</i>	diese Arbeit
pRZ76	pRZ48 + 201bp Fragment <i>kTI11-1</i> <i>Ascl/HindIII</i>	diese Arbeit
pRZ79	pRZ48 + 246 bp <i>AtkTI11-C26S</i> <i>Ascl/HindIII</i>	diese Arbeit
pJet2	YCplac111 Derivat + 5,6 kb <i>Smal/XhoI</i> ORF <i>ELP1-(HA)₆</i>	J. E. Täubert
pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA	Amp ^R , pFA-Kn MX6-Derivat, <i>S.pombe HIS3</i> , 3HA-Epitop	A. Wach
pMA03	<i>KTI13</i> ::pTrcHIS-TOPO, Amp ^R	M. Arnold
pK7m34GW,0	binärer, MultiSite Gateway Pflanzenvektor; <i>attR4</i> , <i>attR3</i> , <i>T35S</i> , Kan ^R , Sm/Sp ^R	Karimi et al. 2005
pK7FW2.0	binärer Gateway-kompatibler Pflanzenvektor, <i>p35S</i> , <i>attR1</i> , <i>ccdB</i> , <i>attR2</i> , <i>Egfp</i> , <i>T35S</i> , Kan ^R , Sm/Sp ^R	Karimi et al. 2002
pEN-R2TAPtagL3,0	binärer entry Vektor für MultiSite Gateway; <i>attR2</i> , TAP-tag, <i>attL3</i> , Kan ^R	Karimi et al. 2005
pEn-L4-2-R1,0	binärer entry Vektor für MultiSite Gateway; <i>attL4</i> , <i>p35S</i> , <i>attR1</i> , Kan ^R	Karimi et al. 2007
pLF11.1	Single copy library Plasmid; YPH (ATCC 77162, <i>CEN4 LEU2</i>)	Fichtner et al. (2002)

MATERIAL & METHODEN

pCM190	YEplac195 Derivat 2μ <i>URA3</i> <i>pTETO7</i>	Gari et al. (1997)
pCB1	Amp ^R , Ycplac33-Derivat + 2,3 kb <i>MunI/PstI</i> - Fragment aus pLF11.1	C. Bär
pTrcHIS-Topo	Amp ^R , pBR322ori <i>lacIq</i> , <i>E. coli</i> - Expressionsvektor, (<i>HIS</i>) ₆ , <i>Xpress</i>	Invitrogen
pTrcHIS2-Topo	Amp ^R , pBR322ori <i>lacIq</i> , <i>E. coli</i> - Expressionsvektor, <i>c-myc</i> , (<i>HIS</i>) ₆	Invitrogen
p416 MET25	Amp ^R <i>ARSH4 CEN6 URA3</i> , pMB1ori <i>pMET25</i> <i>CYC1-ter</i>	Mumberg et al., 1994
p424 TDH3	Amp ^R 2μ <i>TRP1</i> pMB1ori <i>pTDH3 CYC1-ter</i>	Mumberg et al., 1995
pRZ80	p416 MET25 + 249 bp <i>SpeI/XhoI KTI11</i>	diese Arbeit
pRZ81	p416 MET25 + 249 bp <i>SpeI/XhoI kti11-C27S</i>	diese Arbeit
pRZ82	p416 MET25 + 249 bp <i>SpeI/XhoI kti11-C50S</i>	diese Arbeit
pRZ83	p424 TDH3 + 249 bp <i>SpeI/XhoI KTI11</i>	diese Arbeit
pRZ84	p424 TDH3 + 249 bp <i>SpeI/XhoI kti11-C27S</i>	diese Arbeit
pRZ85	p424 TDH3 + 249 bp <i>SpeI/XhoI kti11-C50S</i>	diese Arbeit
YEplac112	Amp ^R 2μ <i>TRP1</i> , pMB1ori	Gietz und Sugino (1988)

2.1.7 Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Nährmedien wurden nach Sherman et al. (1986) und Maniatis et al. (1989) hergestellt, wobei Ausnahmen gesondert aufgeführt werden. Den Festmedien wurden zusätzlich 2% Agar-Agar zugesetzt.

2.1.7.1 Anzuchtbedingungen für *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden bei 37°C in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% Natriumchlorid) kultiviert. Flüssigkulturen wurden über Nacht auf einem Luftschüttler inkubiert. Für die Selektion plasmid-tragender Zellen wurde dem Medium Ampecillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugesetzt.

Für eine Blau/Weiß-Selektion wurde den Festmedien XGal in einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugegeben. Zur Induktion der Proteinexpression von Lac-Repressor reprimierten Promotoren wurde IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) in einer Endkonzentration von 1 mM dem Medium zugegeben.

2.1.7.2 Anzuchtbedingungen für Hefen

Die Anzucht von Hefen erfolgte, falls nicht anders angegeben, in YEPD-Medium (2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 2% Glucose) bei 30°C. Flüssigkulturen wurden schüttelnd auf einem Luftschüttler inkubiert. Die Selektion auf bestimmte Aminosäure-Prototrophien wurde in synthetischem Minimalmedium (SDm: 0,81% YNB; 2% Glukose oder Galaktose, Aminosäure-Mix) ohne die entsprechende Aminosäure durchgeführt. Für die Anzucht von

Stämmen, die schlecht in Galaktose wuchsen, wurde dem 2%igem Galaktose Medium 1% Raffinose zugesetzt. Weitere spezielle Festmedien waren wie folgt zusammengesetzt:

2.1.7.3 Anzuchtbedingungen für *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens-Kulturen wurden bei 30°C in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% Natriumchlorid) kultiviert. Flüssigkulturen wurden über Nacht auf einem Luftschüttler inkubiert. Für die Selektion plasmid-tragender Zellen wurde dem Medium entsprechend dem Selektionsmarker Ampecillin (100µg/ml), Kanamycin (50µg/ml), Gentamycin (100µg/ml) bzw. Rifampicin (100µg/ml) zugesetzt.

2.1.7.4 Anzuchtbedingungen für Pflanzen

Für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wurde ein Gemisch aus Einheitserde ED Koko (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) und Vermiculite mit 2-3 mm Körnung (Kammlott, Erfurt) verwendet.

2.1.7.5 Anzuchtbedingungen für Pflanzen auf Selektivmedium

Für die Aussaat von transgenen *Arabidopsis thaliana* Samen wurden diese zuerst sterilisiert. Dazu wurden zwischen 50 und 200 Samen in ein Vlies (Miracloth, Calbiochem) eingewickelt und für 2 min in 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Vlies für 12 min in 5%iger Natriumhypochloridlösung geschwenkt, ehe es fünfmal für 5 min mit sterilem Wasser gewaschen wurde. Nach der Sterilisation wurden die Samen auf folgenden Festmedium ausgebracht:

Angabe für 1 Liter:

4,4 g MS-Medium (Murashige & Skoog basal Medium inkl. Gamborg Vitamine)

500 mg MES

1% Saccharose

0,7% Pflanzen Zellkultur Agar (Lab M)

pH 5,7 mit KOH

Kanamycin (50 µg/ml) wurde dem Festmedium zur Selektion zugesetzt (T-DNA Salk-Linien). Stammten die Samen von Pflanzen, welche zuvor mit *Agrobacterium tumefaciens* behandelt wurden, wurde dem Medium das Antibiotika Carbenicilin (500 µg/ml) zusätzlich beigemischt, um an den Samen haftende Agrobakterien zu töten. Die Samen wurden 48 Stunden bei absoluter Dunkelheit und 4°C gelagert, bevor sie die folgenden 14 Tage unter Langtagbedingungen kultiviert wurden (16 Stunden Licht, 23°C; 8 Stunden Dunkelheit, 20°C;

relative Luftfeuchtigkeit 60 %). Grüne, Kanamycin-resistente Pflanzen wurden anschließend auf Einheitserde pikiert (siehe 2.1.7.4).

2.1.8 Anaerobe Methoden

Alle anaeroben Arbeiten wurden in einem anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Die Luftzusammensetzung innerhalb des Zeltes betrug 95% N₂ und 5% H₂. Sauerstoff Kontaminationen wurden kontinuierlich durch Reduktion mit Wasserstoff in einem Palladium-Katalysator (BASF, Ludwigshafen) entfernt. Die verwendeten Gase (Stickstoff/Wasserstoff 95:5; Stickstoff 99,996%, Wasserstoff 99,9995% und Kohlenmonoxid 99,997%) wurden bei Messer-Grieheim (Siegen) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad 5. Alle Geräte und Puffer, die innerhalb des Zeltes verwendet wurden, wurden durch 3-maliges Vakuum, gefolgt von einer Begasung mit N₂/H₂ (95:5), sauerstofffrei durch eine Schleuse in das Zelt eingebracht.

2.2. Methoden

2.2.1 DNA-Isolationen

2.2.1.1 Plasmidisolation aus *E. coli*

Für einfache analytische Zwecke wie Restriktionsanalysen erfolgte die DNA-Isolation mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1983). Dafür wurden 1,5 ml einer stationären Kultur abzentrifugiert (13000 rpm, 2 min) und das Zellpellet in 200 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA) aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH; 1% SDS) zur Zelllyse und 200 µl P3-Puffer (2,55 M KAc pH 4,8) zur Fällung der Proteine zugegeben. Nach Zentrifugation (13000 rpm; 10 min; 4°C) wurden 500 µl des Überstands abgenommen und 1000 µl eiskalter Ethanol (96%) zugegeben. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (13000 rpm; 10 min; 4°C) pelletiert, das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen.

Für die Weiterverwendung bei Sequenzierungen, Klonierungen oder Transformationen erfolgte die Plasmid-Isolation über das E.Z.N.A.Plasmid Miniprep Kit I von Peqlab nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Schnell-Isolation chromosomaler DNA aus Hefezellen

Die Isolation chromosomaler DNA erfolgte nach „Current Protocols of Molecular Biology“ (1998) aus 5 ml einer Übernachtskultur. Nach der Zentrifugation (4000 rpm; 5 min) wurde das Pellet in 500 µl H₂O resuspendiert, wiederum abzentrifugiert (6000 rpm; 1 min) und in 200 µl Aufschlusspuffer (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl Glasperlen und 200 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min auf einem Multivortex. Anschließend wurden 200 µl Wasser hinzugesetzt, nochmals kurz gevortext und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 96%igem Ethanol versetzt und nochmals für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 50°C luftgetrocknet und in 400µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.3 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA

Mit der Methode nach Brandstädter et al. (1994) wurde Gesamt-DNA aus Blattmaterial isoliert. Hierzu wurden 4-5 Blätter in einem 2ml Eppendorff-Reaktionsgefäß mit flüssigen Stickstoff eingefroren und mit einem Glasstab (vorgekühlt) fein zermörsert. Anschließend wurde 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCL pH8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1,5% SDS) dem zerkleinerten Blattmaterial zugegeben. Nach mehrmaligen Vortexen der Suspension wurde diese bei 65°C inkubiert. Daraufhin wurden 300 µl essigsaurer Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure) zugegeben und für 10 min im Eisbad inkubiert. Die folgende Zentrifugation bei 20000 x g für 15 min (4°C) sedimentierte die Zelltrümmer und der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 300µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:35:1) wurden zugegeben und die Phasen durch Zentrifugation (8 min bei 6000 x g; RT) getrennt. Die DNA wurde aus der oberen wässrigen Phase durch 500 µl Isopropanol ausgefällt und für 10 min bei -20°C inkubiert. Die Sedimentation der DNA erfolgte anschließend bei 20000 x g für 10 min (4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 50°C im Trockenschrank getrocknet und in 100µl 10 mM Tris-HCL pH8,0 aufgenommen.

2.2.2 Modifikation und Analyse der DNA

2.2.2.1 DNA-Fällung

Für die Fällung der DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2 Volumen eiskalter Ethanol (96%) zugegeben, einige Male invertiert und 20 min bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (14000 rpm; 15 min; 4°C) des Ansatzes, das Trocknen des Pellets und die Aufnahme in 30 μl (bei DNA für „one step *in vivo* Epitop-Markierung“ in 70 μl) H_2O .

2.2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,4-10 kb erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen, versetzt mit Ethidiumbromid (0,5 mg/l), und 1 x TBE (100 mM Tris; 100 mM Borsäure; 2 mM EDTA) als Laufpuffer. Fragmente unter 0,4 kb wurden in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Fragmente wurden anschließend auf einem UV-Tisch mit Licht einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

2.2.2.3 Restriktion

Die Restriktion der DNA erfolgte mit Typ II Restriktionsendonukleasen (Winnacker, 1987) von MBI Fermentas nach Angabe des Herstellers.

2.2.2.4 Ligation

Ligationen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas durchgeführt. Dazu wurde Fragment-DNA in 2-3fachem molaren Überschuss zur Vektor-DNA in 1x Ligationspuffer (MBI Fermentas) und zusammen mit 5U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.5 Gelelution von DNA-Fragmenten

Die Gelelution von DNA-Fragmenten erfolgte mittels QIAEX II Gel Extraction Kit bzw. MiniElute Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung erfolgte mit Nucleo Spin Kit (Quiagen) nach Vorgabe des Herstellers.

2.2.2.7 Dephosphorylierung

Linearisierte DNA wurde mit Hilfe der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, Fermentas) in 1x Dephosphorylierungspuffer 30min bei 37°C dephosphoryliert. Eine anschließende Inkubation bei 85°C für 15 min inaktivierte das Enzym.

2.2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des BigDye Terminator DNA-Sequenzierungskit (Applied Biosystems). Dazu wurden 2 µl BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer (5x), 4 µl ready reaction premix (2,5x), 200-500 ng DNA und 3,2 pmol Primer zu einem Endvolumen von 20 µl zusammengegeben.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Eppendorf Mastercycler mit folgendem Programm durchgeführt:

95°C	5 Minuten	} 30x
95°C	30 Sekunden	
55°C	30 Sekunden	
60°C	4 Minuten	

Nach der Sequenzierungs-PCR wurde der Ansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 3 M NaAcetat (pH 4,8) versetzt. Nach der Zugabe von 250 µl 96% Ethanol wurde das Gemisch einige Male invertiert und bei 13000 rpm 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 2mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und jeweils bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die Elektrophorese erfolgte mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer).

2.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt für die Analyse von genomischer DNA, zur Amplifikation von Disruptionskassetten (KO-PCR) und für „one-step *in vivo*“ Epitopmarkierungs-Experimente. Die PCR-Bedingungen wurden den eingesetzten Primern und der Länge des erwarteten Fragments angepasst. Folgende Polymerasen wurden eingesetzt:

- *Taq*-Polymerase (Fermentas)
- *Pfu*-Polymerase (Fermentas)
- Fast-Start *Taq* (Roche)
- High-Fidelity *Taq* (Roche) mit Proofreading-Aktivität
- High-Fidelity *Taq* (USB) mit Proofreading-Aktivität

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
95°C	2 min	
95°C	30 s	} 30x
55°C – 63 °C (variabel)	30 s	
72°C	1 min/kb (<i>Taq</i>)	
	2 min/kb (<i>Pfu</i>)	
72°C	10 Minuten	
10°C	Halten	

2.2.2.10 PCR-basierende „one-step *in vivo*“ Epitopmarkierung

Epitopmarkierung von Genen auf chromosomaler Ebene erfolgte direkt über einen PCR-basierenden Ansatz. Es wurde hier das von Knop et al. (1999) vorgestellte System genutzt. Erhaltene Transformanten wurden mittels Western Blot und/oder PCR auf eine korrekte Insertion des Epitops in das Genom getestet.

2.2.2.11 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mittels cloneJET PCR Cloning Kit von Thermo Scientific. Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.2.2.12 PCR-basierende Gendeletion (Knockout)

Die Deletion von Genen erfolgte PCR-vermittelt basierend auf der Methode von Wach et al. (1994). Nach Amplifikation der Disruptionskassetten mittels KO-PCR wurden diese in die Zielstämme transformiert. Durch Rekombination homologer Bereiche der Disruptionskassetten und den 3'/5'-Regionen des Zielgens erfolgte dessen Deletion. Die kodierenden Sequenzen des Gens wurden somit gegen die Deletionskassette ausgetauscht.

2.2.3 Transformationen

2.2.3.1 Transformation von *E. coli* nach Hanahan (1985)

Die Transformation von *E. coli* wurde nach der Methode von Hanahan (1985) durchgeführt. 250 ml SOB-Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Anschließend wurde die Kultur 15 min auf Eis inkubiert und danach bei 7000 rpm (4°C, 10 min) abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem und sterilfiltriertem RF1-Puffer (100 mM RbCl; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂; 15 % Glycerin pH 5,8) resuspendiert und mit 95 ml RF1-Puffer versetzt. Nun erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 1 Stunde. Die folgende Zentrifugation (7000 rpm, 10 min, 4°C,) pelletierte die Kultur. Das Pellet wurde in 20 ml sterilfiltriertem RF2-Puffer (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂ pH 6,8) aufgenommen, resuspendiert und anschließend auf Eis aliquotiert. Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Die Transformation erfolgte durch Zugabe von 1-10 ng Plasmid-DNA zu den gefrorenen Zellen. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 2minütiger Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt (5 min). Nach Zugabe von 250µl LB-Medium erfolgt eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C. Nachfolgend wurde die Suspension auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.3.2 Transformation von Hefen nach Gietz und Schiestl (1995)

Die Transformation von Hefen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode nach Gietz und Schiestl (1995). Aus einer Übernachtskultur wurden 50 ml YEPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, RT), das Zellpellet in 25 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat-Lösung aufgenommen und 10 Minuten bei 30°C inkubiert und zu 100 µl aliquotiert. Für die Transformation wurden die Aliquots erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 360 µl eines Gemisches aus 240 µl 50% PEG, 36 µl 1.0 M LiAc, 50 µl ss Salmonsperm DNA 2 mg/ml und der zu transformierenden DNA resuspendiert. Danach wurde der Ansatz 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend 50 Minuten einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Nach einer erneuten Pelletierung wurden die Zellen in 100 µl Wasser resuspendiert und auf Selektivnährböden ausplattiert.

2.2.3.3 Transformation von Hefen nach Knop et al. (1999)

Herstellung kompetenter Hefen: Für die Hefetransformation nach Knop wurden zuerst kompetente Hefen hergestellt, die bis zur weiteren Verwendung bei 70°C gelagert wurden. Eine 10 ml Übernachtskultur wurde mit 40 ml YEPD Medium versetzt und für weitere 4 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4 °C) und das Pellet mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Sedimentation wurde das Pellet in 10 ml SORB-Puffer (100 mM Li-Ac; 10 mM Tris-HCL pH8,0; 1 mM EDTA-NaOH pH8,0; 1 M Sorbitol) gelöst und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 360 µl SORB-Puffer resuspendiert und Aliquots (200 µl) bei -70 °C eingefroren.

Transformation kompetenter Hefen: Für die Transformation wurden 150 µl PEG* (100 mM Li-Ac; 10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA-NaOH pH 8,0; 40% PEG3350) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 25 µl kompetente Zellen sowie 2 µl Plasmid-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 µl DMSO hinzugegeben, das Gemisch gevortext und für 15 min bei 42 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm für 5 min sedimentiert und in 70 µl sterilen Wasser aufgenommen.

2.2.3.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*:

Eine 8ml LB-Lösung (+ 50 µg/ml Rifampicin, 25 µg Gentamycin) wurde mit dem *Agrobacterium* Stamm C58C1Rif^R[pMP90M] angeimpft und über Nacht bei 28°C schüttelnd kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in 192 ml LB überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 schüttelnd bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Agrobakterien bei 4000 rpm für 15 min bei 4°C sedimentiert und das Pellet in 20 ml kalten LB aufgenommen. Diese Suspension wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt (200 µl Aliquots) und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*:

Die kompetenten Agrobakterien wurden mit 1µg Plasmid-DNA versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 800 µl LB zugegeben und die Suspension für 2 Stunden bei 28°C geschüttelt. Anschließend wurde auf Agar-haltigen LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (Rifampicin 100 µg/ml, Gentamycin 40 µg/ml, Kanamycin 50µg/ml) ausplattiert und für mindestens 2 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.3.5 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* nach der Blütentauchmethode (floral dip) (Clough und Brent, 1998). Hierzu wurde eine plasmid-transformierte Agrobakterien Kolonie in 2 ml LB-Medium (Rifampicin 100µg/ml, Gentamycin 40µg/ml, Kanamycin 50µg/ml) überführt und über Nacht schüttelnd bei 28°C inkubiert. Die Übernachtkultur wurde anschließend 200 ml LB-Medium (Rifampicin 100µg/ml, Gentamycin 40µg/ml, Kanamycin 50µg/ml) zugeführt und erneut über Nacht schüttelnd kultiviert. Danach erfolgte die Sedimentation der Agrobakterien bei 5000 x g für 10 min. Das Pellet wurde in 30 ml 5%iger Saccharose-Lösung (inkl. 0,02% Silwet L-77) aufgenommen und Blütenstände von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die kurz vor ihrer Blüte standen, wurden für 10 s in die Agrobaktériensuspension getaucht. Nach einer 24 stündigen Dunkelperiode erfolgte die Kultivierung der Pflanzen bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und 23°C gefolgt von 8 Stunden Dunkelheit bei 20°C; relative Luftfeuchtigkeit 60%).

2.2.3.6 Transformation von *Arabidopsis thaliana* Zellkultur (PSB-D)

Verwendet wurde die *Arabidopsis thaliana* Zellkulturlinie PSB-D.

Tag 1: Eine 2 ml Agrobakterien-Kultur wuchs über Nacht schüttelnd in YEB-Medium bei 28°C. Einer 7 Tage alten Arabidopsis Zellkultur (20 ml) wurden 80 ml frisches MSMO-Medium zugeführt (1:5 Verdünnung)

Tag 2: Die 2 ml Agrobakterienkultur wurde in 20 ml YEB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika überführt (Rifampicin 100 µg/ml, Gentamycin 40 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml).

Tag 3: Die Agrobakterienkultur wurde bei 4000 rpm für 15 min sedimentiert, mit 20 ml MSMO-Medium gewaschen und erneut bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 20 ml MSMO-Medium gewaschen und die OD bei 600 nm bestimmt. Nun wurden die Agrobakterien erneut sedimentiert (400 rpm, 15 min) und das Pellet wurde in genau so viel MSMO-Medium aufgenommen, bis eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht war.

In eine 6 well Multiwell-Platte wurden pro Well 3 ml der 2 Tage alten Arabidopsis Kultur zusammen mit 200 µl der Agrobakterienkultur (OD 1,0) und 6 µl Acetoseringone (Stocklösung 100 mM) gegeben, mit Micropore Surgical Tape (3M, St. Paul, USA) verschlossen und auf einem Schüttler (130 rpm, 25°C) für 2 Tage inkubiert.

Tag 6: Die Arabidopsis/Agrobakterien Suspension (ca. 3 ml) wurde in einen 25 ml Erlenmeyerkolben überführt, der bereits 7 ml frisches MSMO mit den Antibiotika Vancomycin (500 µg/ml), Carbenicillin (500 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) enthielt. Vancomycin und Carbenicillin sollen nun die Zellsuspension von Agrobakterien befreien. Kanamycin ist der

MATERIAL & METHODEN

Selektivmarker für transformierte Arabidopsis-Zellen. Die Zellen wurden für 9 Tage schüttelnd inkubiert (130 rpm und 25 °C).

Tag 15: Die 10 ml Kultur wurde in einen 100 ml Kolben überführt, der bereits 30 ml frisches MSMO (inkl. der Antibiotika: Vc, Cb und Km) enthielt. Der Kolben wurde für 7 Tage schüttelnd (130 rpm, 25 °C) inkubiert.

Tag 22: Der Kolben wurde vom Schüttler genommen und für 10 min stehen gelassen. Die Arabidopsiszellen sedimentierten und wurden vorsichtig mit einer 20 ml Glaspipette aufgenommen und in einen neuen 100 ml Kolben mit 35 ml frischem MSMO (Vc, Cb, Km) überführt. Von nun an sollte die Kultur Agrobakterienfrei sein. Um dies zu überprüfen wurden 1 ml der Kultur auf eine YEB-Platte ohne Antibiotika plattiert und für 3 Tage inkubiert. Sind keine Agrobakterien-Kulturen sichtbar, ist die Arabidopsis Kultur bakterienfrei.

Tag 29: Die *Arabidopsis*-Kultur wurde erneut vom Schüttler genommen und den Zellen wurde es ermöglicht zu sedimentieren. Mit einer 20 ml Glaspipette wurden die Zellen vom Boden des Kolben abgesaugt und in 45 ml frisches MSMO (100 ml Kolben; nur noch Kanamycin als Selektionsmarker) überführt. Die Kultur wurde von nun an schüttelnd (130 rpm) bei 25 °C inkubiert und die Zellen alle 7 Tage in frisches MSMO (+ Km) Medium überführt

YEB: 0,5% Lab Lemco
 0,5% Pepton
 0,5% Saccharose
 2 mM MgSO₄

MSMO (1l): 4,43 g MS-Salz (Murashige'and Skoog's minimal organics)
 30 g Saccharose
 500 µl Naphtylelessigsäure (1 mg/ml Stammlösung in 100 mM NaOH)
 50 µl Kinetin (1 mg/ml Stammlösung in DMSO)
 pH 5,7 mit KOH

2.2.3.7 Transformation von *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellkultur

Tag 1: Es wurden 2 ml, 3 ml und 4 ml einer 7 Tage alten BY-2 Kultur in jeweils 40 ml (250 ml Erlenmeyerkolben) frisches MS-Medium (inklusive Vitaminen) überführt und schüttelnd (130 rpm) bei 28 °C inkubiert. Parallel dazu wurden 5 ml YEB-Medium (Antibiotika: Rifampicin 100 µg/ml, Gentamycin 40 µg/ml, Spectinomycin 100µg/ml) mit einer Plasmid-transformierten *Agrobacterium tumefaciens* Kolonie angeimpft und bei 28 °C ebenfalls schüttelnd inkubiert.

Tag 3: Von der Agrobakterienkultur wurden 500 µl in 5 ml YEB-Medium (ohne Antibiotika) umgeimpft und über Nacht wiederum inkubiert.

Tag 4: Es wurden jeweils 4 ml der 4 Tage alten BY-2 Kulturen in eine Petrischale (8 cm) überführt und mit verschiedenen Konzentrationen von Agrobakterien $OD_{600} = 1,0$ (10 µl bis 500 µl der YEB über Nacht Kultur) vermischt. Die Petrischalen wurden anschließend für 2 Tage bei 25 °C ohne schütteln inkubiert.

Tag 6: Die BY-2/Agrobakterien Suspension wurde nun auf MS-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (Kanamycin 100 µg/ml, Carbenicillin 500 µg/ml, Vancomycin 200 µg/ml) ausplattiert. Die Agrobakterien werden durch die Antibiotika Vc und Cb abgetötet. Nach ca. 14 Tagen waren die ersten Calli sichtbar. Diese wurden auf neues Selektivmedium (Kanamycin 100 µg/ml, Carbenicillin 500 µg/ml, Vancomycin 200 µg/ml) überführt und für 14 Tage bei 25 °C inkubiert, um die möglicherweise verbliebenen Agrobakterien abzutöten. Danach ist eine Umsetzung der Kanamycin resistenten Calli alle vier Wochen auf Kanamycin-haltigen Nährplatten erforderlich.

MS-Medium (1l): 4,43 g MS-Salz (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture)
 0,2 g KH_2PO_4
 30 g Saccharose
 pH 5,8 KOH
 (Festmedien wurden 6,5 g Pflanzen-Kultur-Agar zugegeben)

BY-2 Vitamin-Stammlösung (50 ml): 0,02g 2,4D (Auxin)
 0,05 g Thiamin
 5 g Myo-Inositol
 Steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

1 ml der BY-2 Vitamin-Stammlösung wurde nach dem Autoklavieren dem MS-Medium (1L) zugegeben.

2.2.4 Analyse von Proteinen

2.2.4.1 Präparation von Zellextrakten aus Hefe

Für die Präparation von Zellextrakten für Westernanalysen wurden 50 ml YEPD-Flüssigkulturen bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen. Die Zellsuspension wurde nun bei 4000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert (4°C). Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei 0-4°C durchgeführt, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Das Zellpellet wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, gewaschen und erneut bei 4000 rpm für 5 Minuten sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl B60-Puffer aufgenommen

MATERIAL & METHODEN

(50 mM HEPES-KOH pH 7,3; 60 mM Kaliumacetat; 5 mM Magnesiumacetat; 0,1% Triton X100; 10% Glycerol; 1 mM Natriumfluorid; 20 mM Glycerophosphat; 1 mM DTT; Proteinase-Inhibitor: Complete) und nach Zugabe von 500µl Glasperlen 4x3 Minuten auf einem Vibrax-Schüttler bei maximaler Leistung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm für 5 Minuten präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 15 min). Wiederum wurde der Überstand in ein vorbereitetes Eppi überführt und enthielt nun den von Zelltrümmern bereinigten Protein-Rohextrakt. Dieser wurde entweder für Ko-Immunopräzipitationsexperimente oder direkt für Westernblott-Experimente eingesetzt. Für Letzteres wurden 100µl des Rohextraktes mit 6x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris; 20% Glycerin; 0,004% Bromphenolblau; 10% β -Mercaptoethanol; 4% SDS pH 6,8) versetzt und bei 95°C für 10 Minuten inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben durch eine SDS-Gelelektrophorese analysiert oder bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Präparation von Zellextrakten aus *E. coli*

Die Herstellung von *E. coli* Proteinextrakten erfolgte aus 2 Liter Kulturen. 2 Liter LB-Medium (1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% Natriumchlorid) wurden mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C schüttelnd (160 rpm) angezogen. Anschließend wurde die Protein-Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann bei 7000 rpm (4 °C, 10 min) abzentrifugiert und mit 1 Liter Sörensen-Puffer (33 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 6,8; 34 mM KH₂PO₄) gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 2ml pro g_(Pellet)Lysis-Puffer (33 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 6,8; 34 mM KH₂PO₄) aufgenommen (für Ko-Immunpräzipitationsexperimente zwischen Kti11-Kti13 in *E. coli* wurde B60-Puffer verwendet) und mit 1 mg/ml Lysozym versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30 minütige Inkubation, gefolgt durch sechsmaligen (10 s) Sonifizieren (Branson Sonifier S-250A, USA) der Proben. Die Nukleinsäuren wurden mit Protaminsulfat (Endkonzentration 0,05%) durch 15 minütige Inkubation ausgefällt. Die folgende Zentrifugation sedimentierte Nukleinsäuren und Zelltrümmer (30 min; 10000 g).

2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration in Proteinextrakten bestimmen zu können, wurde die Methode von Bradford (1976) mit der „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Farbstoff, Biorad Laboratories GmbH) angewandt. Hierfür wurden 799 µl Wasser mit 200 µl Farbreagenz und 1 µl Proteinrohextrakt gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde

dann spektrometrisch bei 595 nm Wellenlänge gegen eine Standarddeichkurve von 1-20 µg/ml BSA ermittelt.

2.2.4.4 Ko-Immunopräzipitation

Die Antikörperkopplung an Protein-A-Sepharose (PAS) erfolgte wie folgt: 200 µl PAS wurden mit 2 ml Glycin-OH-Puffer (1,45 M Glycin, 3 M NaCl, pH 8.9 mit NaOH) versetzt und für 60 Minuten bei RT quellen gelassen. Anschließend wurden 100 µg primärer Antikörper (α-c-myc oder α-HA Antikörper) hinzugegeben und für 60 Minuten bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Nach Zugabe von 10 ml 0,2 M Natrium-Borat (pH 9.0) wurde 2 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Dieser Schritt wurde 2mal wiederholt. Nach Zugabe von 10 ml 0,2 M Natrium-Borat (pH 9.0), versetzt mit 20 mM Dimethylpimelimidat, wurde für 30 Minuten bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation (2 min, 1000 rpm) pellitierte die Antikörper gekoppelte PAS, der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2mal mit 10 ml 0,2 M Ethanolamin (pH 8.0) gewaschen. Nach der dritten Zugabe von 10 ml 0,2 M Ethanolamin (pH 8.0) wurde dieses Gemisch für 2 Stunden bei RT auf dem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde für 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die PAS-AK wurde mit 2 ml PBS-Puffer (100 mM Na-P-Puffer pH 7.2 [0,5 M Na₂HPO₄ mit 0,5 M NaH₂PO₄]), versetzt mit 5 mg/ml BSA, für 30 Minuten auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die PAS-AK mit 2 ml PBS-Puffer und 0,02% Natriumazid versetzt und kühl aufbewahrt.

Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte wie in Punkt 2.2.4.1 beschrieben. 300 µl Rohextrakt wurden mit 100 µl PAS-AK in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermengt und für 90 Minuten auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. In einer vorgekühlten Zentrifuge wurde die PAS-AK zentrifugiert (1000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und das PAS-AK-Pellet 4mal mit 1 ml B60-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Trennung der an PAS-AK gebundenen Proteine, indem 100 µl 10%iger SDS-Puffer hinzugegeben wurde. Dieser Ansatz schüttelte für 10 Minuten bei RT. Anschließend wurde das Gemisch durch PCR-Filterpipettenspitzen für 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert und in einem Eppendorff-Tube aufgefangen. Nach Zugabe von 6x Lämmli-Puffer (Endkonzentration ist einfach) wurde für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und weiter in der SDS-Page analysiert.

2.2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine können mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel (30% Acrylamid-Stammlösung; 0,8% Bisacrylamid; Verhältnis 37,5:1) ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt werden. Die Protein-SDS-Komplexe

durchlaufen zuerst das 5%ige Sammelgel mit 1x Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS), in dem sie aufkonzentriert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt dann im sich anschließenden 8-16%igen Trenngel in 1x Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS). Die Gelelektrophorese wurde in 1x Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris) für 1-1,5 Stunden bei konstanter Spannung von 200 Volt durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte entweder durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels oder durch Immunologischen Nachweis mit Antikörpern.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die SDS-Gele wurden über Nacht in der Coomassie Färbelösung (20% Ethanol, 2% Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250) schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden durch eine 30 minütige Entfärbung (5% Ethanol, 7,5% Essigsäure).

2.2.4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Westernanalyse)

Damit Proteine immunologisch nachgewiesen werden können, müssen sie für die entsprechenden Antikörper zugänglich gemacht werden. Bei dieser Methode werden die im SDS-Page nach ihrer Molekulargröße aufgetrennten Proteine auf eine synthetische Trägermembran transferiert. Für die Western Blot Analysen wurden 25-50 µg Gesamtproteinextrakt in eine Tasche geladen und im 8-15%igen Trenngel aufgetrennt. Als Orientierungshilfe wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (MBI Fermentas prestained) mitgeführt. Nun erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Immobilon P: Millipore, Immobilon SQ: Millipore) bei 4 °C im Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol v/v). Es lag eine konstante Spannung von 100 V für 1-1,5 Stunden, je nach Proteingröße, an. Der korrekte Transfer wurde anhand des prestained Molekulargewichtsstandard (Fermentas) überprüft und die PVDF Membran für eine halbe Stunde in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 137 mM Natriumchlorid; 0,3% Tween), versetzt mit 5% Milchpulver (v/w), blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper, verdünnt in TBST + 5% Milchpulver, auf die Membran gegeben und diese für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper für mindestens 1 Stunde (Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus IgG bzw. Anti-Kaninchen IgG; Verdünnung 1:3000 in TBST + 5% Milchpulver). Nun wurde erneut 3mal in TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Detektion der Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugate erfolgte mit der DAB/NiCl₂-Färbelösung (5 ml 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 µl DAB/NiCl₂-Stocklösung [40 mg/ml DAB, 20 mg/ml NiCl₂ in H₂O])

MATERIAL & METHODEN

innerhalb von 10 Minuten. Bei erwarteten schwachen Signalen wurde die ECL-Nachweismethode zur Detektion angewandt (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham). Hierfür wurde Lösung 1 und 2 in einem Verhältnis von 40:1 vermischt und für 5 Minuten auf der Membran belassen. Anschließend erfolgte die Entwicklung des ECL-Films in der Dunkelkammer (Filme von CEA, Fixierer und Entwickler von Kodak).

Verwendete primäre Antikörper:

- anti-c-myc (polyklonal, Kaninchen, 1:3000)
- anti-HA (monoklonal, Maus, 1:3000)
- anti-Xpress (monoclonal, Maus, 1:5000)
- anti-Calmodulin (1:1000, Upstate)

Verwendete sekundäre Antikörper:

- anti-Maus IgG HRP (Kaninchen, 1:3000)
- anti-Kaninchen IgG HRP (Maus, 1:3000)

2.2.4.8 Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)

Die Tandemaffinitätsreinigung wurde nach der Vorschrift von Van Leene et al. (2007) durchgeführt. 13 g Pflanzenmaterial einer exponentiell gewachsenen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurde das Material mit einem Mörser zu feinem Puder gemahlen und in gleichen Volumina (w/v) im Extraktionspuffer (13 ml) gelöst (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 60 mM Glycerophosphat, 0,1% (v/v) Nonidet P-40, 0,1 mM Natriumvanadat, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 g/ml Leupeptin, 10 g/ml Aprotinin, 5 g/ml Antipain, 5 g/ml Chymostatin, 5 g/ml pepstatin, 10 g/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 0,1 mM Benzamidin, 1 M *trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidin)butan (E64), 5% (v/v) Ethylenglycol). Der mechanische Zellaufschluss wurde durch Mixen mit dem Ultra-Turax (IKA Works, Wilmington; 3 x 30 s bei max Geschwindigkeit) erreicht. Die lösliche Proteinfraction wurde durch 2 maliges Zentrifugieren (36900 x g für 20 min, gefolgt von 178000 x g für 45 min) erhalten. Der Proteinextrakt wurde anschließend mit 500 µl IgG-Sepharose 6 Fast Flow beads (GE Healthcare, mit 10 ml Extraktionspuffer zuvor equilibriert) vermengt und auf dem Rotator bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Die Beads wurden dann auf eine 1 ml Mobicol Säule (MoBiTec, Göttingen) transferiert, mit 10 ml Wasch-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 5% Ethylenglycol) und 10 ml TEV-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 M E64, 5% (v/v) Ethylenglycol) gewaschen. Die Beads wurden in ein Eppendorff Reaktionsgefäß überführt und 500 µl TEV-Puffer sowie 100 U AcTEV (Invitrogen) hinzugegeben. Es folgte eine 1 stündige Inkubation bei 16 °C auf dem Rotator. Nach 30 min wurden nochmals 100 U

MATERIAL & METHODEN

AcTEV dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Die IgG Beads wurden anschließend in eine Mobicol Säule überführt und das Eluat wurde in einem Eppendorff Tube aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit 750 µl Calmodulin-Bindepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 10 mM Mercaptoethanol, 1 mM Imidazol, 2mM CaCl₂, 1 mM Magnesiumacetate, Complete EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Roche Diagnostics), 5% (v/v) Ethylenglycol) gewaschen und der Durchfluss mit der zuvor eluierten Fraktion vereint. Die CaCl₂ Konzentration der eluierten Fraktionen wurde auf 2 mM eingestellt und mit 500 µl Calmodulin Agarose Beads (Stratagene, La Jolla, CA) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für eine Stunde auf dem Rotator. Die Calmodulin Beads wurden daraufhin in eine Mobicol Säule überführt und mit 10 ml Calmodulin Bindepuffer gewaschen. Gebundene Protein-Komplexe wurden durch Zugabe von 2,5 ml Calmodulin Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 10 mM Mercaptoethanol, 1mM Imidazol, 25mM EGTA, 5% (v/v) Ethylenglycol) eluiert und anschließend mit TCA (25%, v/v) präzipitiert. Das Proteinpellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton (50 mM HCL) gewaschen und in 20 µl 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proteinprobe wurde auf ein 4-12%iges Gradienten-Gel NuPAGE (Invitrogen) geladen. Proteinbanden wurden durch Colloidal Coomassie Brilliant Blue Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und durch Massenspektrometry durch das VIB Department of Plant Systems Biology (Universität Gent, Belgien) analysiert.

2.2.4.9 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von (HIS)₆ markierten Proteinen erfolgte mittels Nickel Nitrilotriacetat-Agarose (Ni-NTA-Agarose) der Firma Amersham Bioscience. Das Pellet einer 2 Liter *E. coli* Kultur wurde zunächst wie in 2.2.4.2 beschrieben aufgeschlossen. Pro Milliliter Rohextrakt wurden 250 µl 50%ige Nickel-NTA-Agarose auf eine Säule gegeben und mit 10 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O pH8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol, Protease-Inhibitor: Complete) equilibriert. Der Rohextrakt wurde auf die Säule gegeben und für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Rotator mit der Agarose inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Proteine mit 60 ml Wasch-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol, Protease Inhibitor:Complete) entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in 10 Schritten mit jeweils 500 µl Elution-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O pH 8,0; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol, Protease-Inhibitor:Complete). 5 µl der Elutionsfraktionen wurden jeweils mit SDS-Probenpuffer (6x SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris; 20 % Glycerin; 0,004 % Bromphenolblau; 10 % β-Mercaptoethanol; 4 % SDS pH6.8) versetzt und im Polyacrylamid-Gel untersucht. Die Elutionsfraktionen, die das entsprechende Protein enthielten, wurden vereinigt und in der Gelfiltration weiter gereinigt.

2.2.4.10 Präparative Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration wurde mit einem Äkta Purifier 10 (GE Healthcare) unter Verwendung einer HiLoad 16/60 Superdex 200 Säule (GE Healthcare) bei 4 °C durchgeführt. Die Säule wurde vor Beginn der Gelfiltration mit dem Laufpuffer (50 mM NaH₂PO₄ x H₂O pH 8,0; 300 mM NaCl) equilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Der Durchfluss wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt.

2.2.4.11 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden am konvokalen Mikroskop LSM510 (Zeiss) oder am Fluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss) durchgeführt. Gemessen wurde gegen die Absorption des Entsalzungspuffers (50 mM Tris.HCl, pH8.0, 150 mM NaCl).

2.2.4.12 Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden in einer PD10 Sephadex G25 Säule (GE Healthcare) entsalzt. Die Säule wurde 3-mal mit jeweils 10 ml Entsalzungspuffer (50 mM Tris.HCl, pH8.0, 150 mM NaCl) equilibriert. Dann wurden 2,5 ml der konzentrierten Protein-Probe (Kti11) auf die Säule gegeben. Schließlich wurde mit 3,5 ml Entsalzungspuffer eluiert und der Durchfluss aufgefangen.

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore, USA) mit einer Ausschlussgröße von 10.000 kDa verwendet. Die Konzentrierung der Proteinlösung erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg).

2.2.4.13 UV-VIS Absorptions-Spektroskopie

Das UV-visible Absorption-Spektrum wurde mit Licht im Wellenlängenbereich von 300-700 nm im Beckman Du640 Spektrometer aufgezeichnet.

2.2.5 Wachstumstests

2.2.5.1 Exotoxin-Test auf Festmedium (Killer-Eklipse-Assay)

Kishida et al. (1996) beschrieben eine Möglichkeit, um *S. cerevisiae* Stämme auf das Verhalten gegenüber Zymocin zu untersuchen. Hierzu wurde eine Einzelkolonie in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und 5 µl davon auf eine YEPD-Platte getropft. An den Rand

dieses Tropfens wurde anschließend der Killertoxin produzierende *K. lactis* Stamm AWJ137 inokuliert. Die Platte wurde nun 24 Stunden bei 30°C bebrütet und es zeigte sich bei Sensitivität gegen das Toxin ein Hemmhof. Bei Resistenz wuchsen beide Stämme ineinander.

2.2.5.2 γ -Toxin-Test

Der Test auf Sensitivität bzw. Resistenz gegen intrazellulär exprimiertes γ -Toxin erfolgte auf induzierenden und reprimierenden Plattentypen entsprechend dem verwendeten *GAL1*-Promotorsystem (Galaktose/Glucose) (Frohloff et al., 2001). Dazu wurde eine Einzelkolonie des zu untersuchenden Hefestammes in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert und daraus 3 serielle Verdünnungen hergestellt. Von diesen Suspensionen wurden je 5 μ l auf die Testplatten aufgetropft und bei 30°C parallel auf Glukose- bzw. Galaktose-Platten inkubiert.

2.2.5.3 Diphtherie-Toxin-Assay

Dieser Test wurde analog zum γ -Toxintest durchgeführt. Die toxische Untereinheit des Diphtherie-Toxins befindet sich unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotersystems. Dazu wurde eine Einzelkolonie des zu untersuchenden Hefestammes in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert und daraus 3 serielle Verdünnungen hergestellt. Von diesen Suspensionen wurden je 5 μ l auf die Testplatten aufgetropft und bei 30°C parallel auf Glukose- bzw. Galaktose-Platten inkubiert.

2.2.5.4 *SUP4*-Suppressions-Assay

Die Funktionalität von Elongator oder relevanten Faktoren in der tRNA-Modifikation kann mit diesem Test untersucht werden (Huang et al., 2005). Dazu wurde der Stamm UMY2936 verwendet. Dieser trägt neben einer *ochre*-Mutation im *ade2-1* Allel (Enzym der Adenin-Biosynthese; Phosphoribosylamino-imidazol-carboxylase) eine mutierte *SUP4* tRNA^{Tyr} (trägt im Anticodon eine Transversion von G₃₄ nach U₃₄). Liegt *SUP4* Elongator-abhängig modifiziert vor, wird das *ochre* Stopp Codon in *ade2-1* dekodiert. Es wird ein Ade2 Vollängenprotein gebildet und die Hefestämme erscheinen weiß. Befindet sich eine Mutation in Elongator- oder Elongator-relevanten Genen, so ist *SUP4* hypomodifiziert, eine Dekodierung des Stopp Codons findet nicht statt und die Hefekolonie erscheint rot (Akkumulation eines Zwischenprodukts der Adenin-Biosynthese).

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Charakterisierung des pflanzlichen Kti11 Homologs

In den vergangenen 10 Jahren konnte der Elongator-Komplex nicht nur in Hefe identifiziert werden. Arbeiten in *Arabidopsis thaliana*, *C. elegans* sowie in humaner Zellkultur zeigten ihn strukturell hoch konserviert. Über seine potentiellen Regulatoren und Interaktoren (z. Bsp. Kti11-13, Sit4; Hrr25, siehe Tab. 1) ist in diesen Organismen relativ wenig bekannt. Ein Teilziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung eines potentiellen Kti11 Homologs in *Arabidopsis thaliana*.

3.1.1 Komplementationsanalyse des potentiellen Kti11 Homologs aus *A. thaliana*

3.1.1.1 γ -Toxin Assay

Mögliche Kti11 Homologe sollten in *Arabidopsis* identifiziert und anschließend auf Komplementation der Kti11 Funktion in Hefe untersucht werden. Die Datenbanksuche (Protein BLAST@NCBI) nach potentiellen Homologen erzielte in *Arabidopsis thaliana* lediglich einen Treffer. Das Genprodukt von At2g15910 zeigt eine 47%ige Aminosäuresequenz-Identität mit dem Hefe Kti11Protein (Abb. 7).

1 87

```

S. c.  MSTYDEIEI EDMIFEPENQ MFTYPCPCGD RFQIYLDLDMF EGKVAVCPS CSLMIDVVFV KEDLAEYYEE AGIQPPEPIA AAA
A. t.  MSYDDVEI EDMEWNEEIQ AYTYPCPCGD LQITKEDLR LGEEIANCPS CSLYITVIYN MEDFQNDTKK NNEPKTRHPV AVA
H. s.  MAVFHDEVEI EDFQYDEDESE TYFYPCPCGD NFSITKEDLE NGEDVATCPS CSLIIKVIYD KDQFVCGETV PAPSANKELV KC
M. m. MAVFHDEVEI EDFQYDEDESE TYFYPCPCGD NFAITKEDLE NGEDVATCPS CSLIIKVIYD KDQFMCGETV PAPTINKELV KC
D. m. MSIYHDEVEI EDFEYDEEEE MYYYPCCPGD RFQISKEELI EGEEVATCPS CSLVIKVIYD PEMFKAEED EES-ALNEKLG DLKLEKN
    
```

Abbildung 7: Sequenzvergleich möglicher Kti11 Homologe in Eukaryoten.

S. c. (*Saccharomyces cerevisiae*) **A. t.** (*Arabidopsis thaliana*), **H. m.** (*Homo sapiens*), **M. m.** (*Mus musculus*) und **D. m.** (*Drosophila melanogaster*).

Für die Durchführung der Komplementationsstudien wurde die cDNA (cDNA Klon U60504) von At2g15910 plasmid-kodiert von der Arabidopsis Genbank (NASC; European Arabidopsis Stock Center) geordert und in Hefe-Expressionsvektoren subkloniert (pRZ48). Der hierbei verwendete Vektor trägt stromaufwärts vom Klonierungsort ein 3HA-Epitoptag für spätere Westernanalysen sowie einen galaktose-regulierbaren Promoter (P_{GAL1}). Das resultierende Plasmid (pRZ49) wurde zusammen mit dem γ -Toxinvektor pHMS14 oder dem Leervektor pHMS22 in einen *kti11* Δ Stamm (RZY40) ko-transformiert. pHMS14 enthält das

Gen für die γ -Untereinheit des Zymocins unter Kontrolle des regulierbaren *GAL1*-Promotors (Frohloff *et al.*, 2001) und bietet so die Möglichkeit, die Expression des γ -Toxins durch Glukose zu reprimieren oder durch Galaktose zu induzieren. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, sind alle Stämme in der Lage, auf Glukose zu wachsen. Auf Galaktose sind alle mit pHMS22 ($-\gamma$ -tox) transformierten Stämme befähigt zu wachsen. Hingegen sind die mit pHMS14 und pRZ45 (*KTI11*) oder pRZ49 (*At2g15910*; wird im folgenden als *AtKTI11* bezeichnet) ko-transformierten Stämme auf Galaktose im Wachstum gehemmt und somit Toxin sensitiv. Der Leervektor-transformierte Stamm (LV) kann durch γ -Toxin Expression im Wachstum nicht gehemmt werden und ist Toxin insensitiv (Fichtner und Schaffrath, 2002). Mit diesem Versuch konnte also gezeigt werden, dass *At2g15910* Hefe *Kti11* funktionell ersetzen kann.

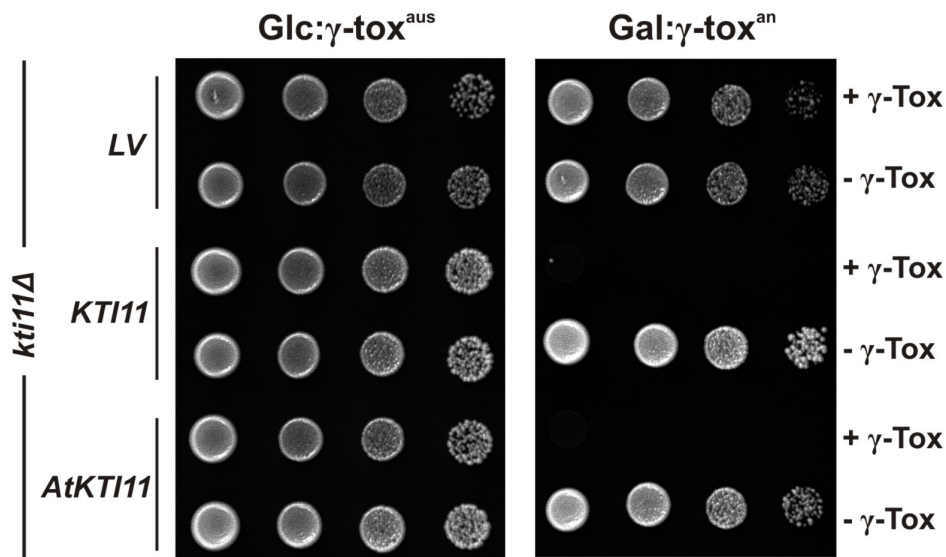


Abbildung 8: γ -Toxin-Test von *AtKTI11*.

Ein *kti11Δ*-Stamm (RZY40) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), Leervektor YCplac111 (LV) oder mit pRZ49 (*AtKTI11*) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors; $+\gamma$ -Tox) oder pHMS22 (Leervektor: *GAL1*-Promotor ohne γ -Toxin-Gen; $-\gamma$ -Tox) ko-transformiert. Die *AtKTI11* sowie *KTI11* transformierten Stämme sind Toxin-sensitiv, während der Leervektor transformierte Stamm (LV) Toxin insensitiv ist. Serielle Zellverdünnungen wurden jeweils auf 2% glukose-haltigem (reprimierend) und 2% galaktose-haltigem (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 2 Tage bei 30°C.

3.1.1.2 tRNA Suppressions-Assay

Anhand des *nonsense* Reporter-Gens *ade2-1* (vorzeitige *ochre*-Stoppcodon-Mutation), und der tRNA^{Tyr}-Suppressormutante (*SUP4*; trägt im Anticodon eine Transversion von G₃₄ nach U₃₄) konnte gezeigt werden, dass Elongator und *Kti11-Kti13* für die *SUP4* Suppressor Funktion notwendig sind (Huang *et al.*, 2005). Für das effektive Überlesen der *nonsense*-

Mutation im *ade2-1*-Allel durch *SUP4* ist eine Elongator-abhängige Modifikation (mcm⁵U - 5-methoxycarbonylmethyl-Uridin) des U₃₄ an der Suppressor-tRNA nötig (Abb. 9). Liegt die *SUP4* tRNA modifiziert vor, so ist sie in der Lage, das A-endende Stopp-Codon (UAA) innerhalb des *ade2-1* Gens als Tyrosin zu dekodieren. Bei Hypomodifizierung (z. B. in *elpΔ* Stämmen) ist *SUP4* nicht in der Lage, das Stopp-Codon zu dekodieren. Dies hat eine Verkürzung des *ADE2* Genprodukts zur Folge und führt zum Funktionsverlust. Das *ADE2*-Gen kodiert für ein Enzym der Adenin-Biosynthese (Phosphoribosylamino-imidazol-carboxylase), und die Suppression der *ade2-1* Mutation erlaubt es den Stämmen, auf Adenin-Mangel-Medien zu wachsen. Farblich erscheinen diese Stämme weiß. Hingegen führen Mutationen in Elongator- oder Elongator-relevanten zu roten Hefekolonien und resultieren in Adenin Auxotrophie (Huang et al., 2005).

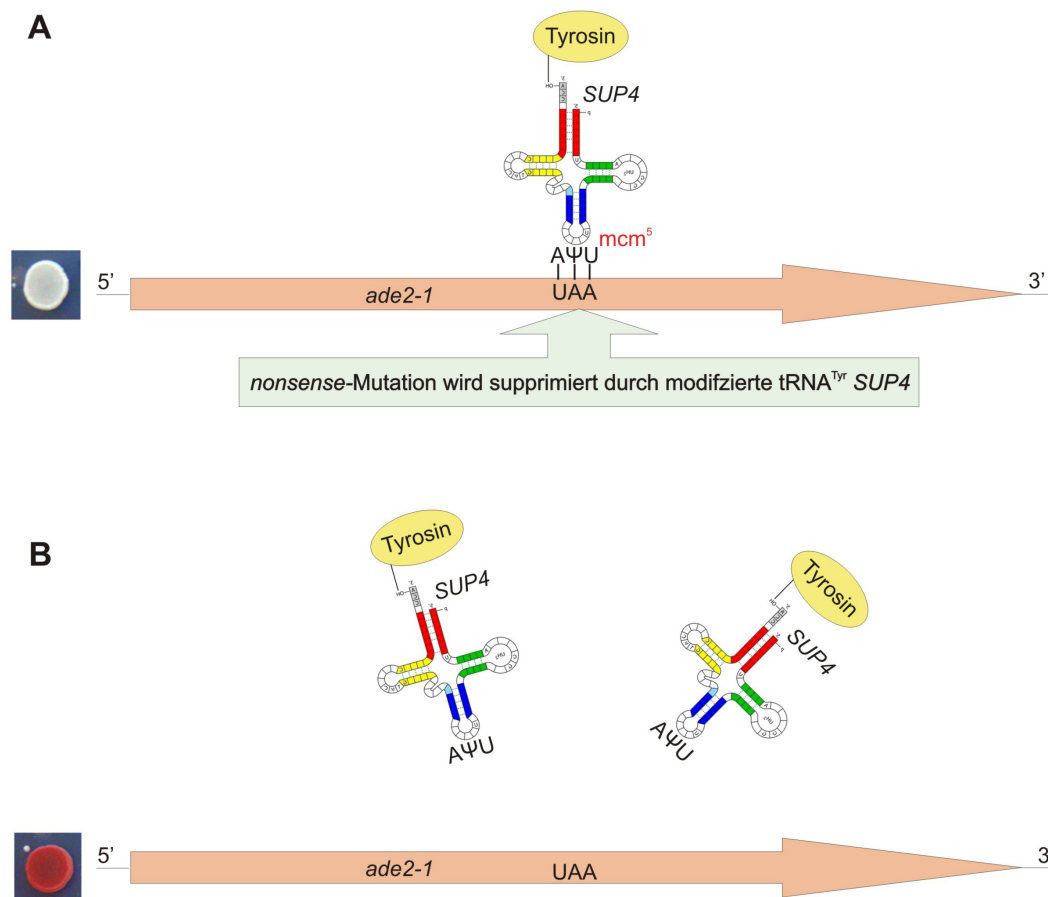


Abbildung 9: Stopp-Codon Suppression des *ade2-1*-Allels durch *SUP4*.

A: In Stämmen mit funktionellen Elongator-Komplex liegt die *SUP4* tRNA modifiziert (mcm⁵) vor und erlaubt eine Dekodierung des Stopp-Codons durch Einbau von Tyrosin in die wachsende Polypeptidkette. Die Hefestämme erscheinen dementsprechend weiß gefärbt. **B:** In Elongator oder Kti11-Kti13 defizienten Stämmen liegt *SUP4* hypomodifiziert vor. Dadurch ist eine Stopp Codon Suppression im *ade2-1* Allel und damit der Einbau von Tyrosin in die Polypeptidkette nicht möglich. Die Hefestämme sind rot-pigmentiert.

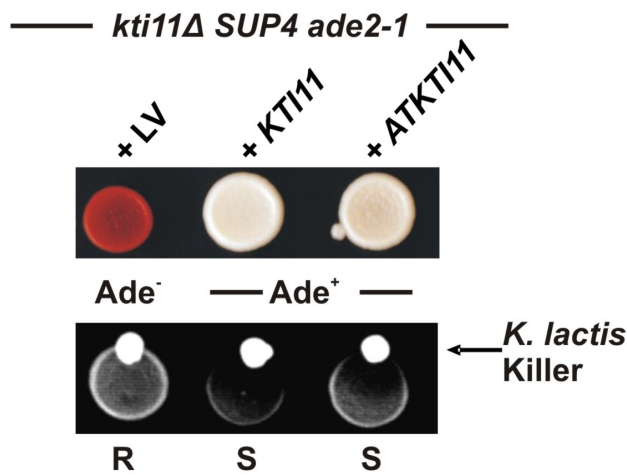


Abbildung 10: *AtKTI11* ermöglicht ochre-Suppression durch *SUP4*.

Oben: In einen *ade2-1 SUP4 kti11Δ* Stamm (UMY2936) wurden ein Leervektor YCplac111 (LV) oder die Plasmide pRZ45 (*KTI11*), pRZ49 (*AtKTI11*) transformiert. Stämme wurden auf YEPD getropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. **Unten:** *ATKTI11* vermittelt Toxin-Sensitivität. Killer-Eklipse-Assay von Leervektor (LV), pRZ45 (*KTI11*) und pRZ49 (*ATKTI11*) transformierten Stämmen mit dem Zymocin produzierenden Killer Stamm AWJ137. Der Leervektor transformierte Stamm ist Toxin resistent (R), hingegen verleihen *KTI11* und *ATKTI11* Toxin-Sensitivität (S) und bilden einen Hemmhof aus.

Im *SUP4*-Assay wurde nun untersucht, ob *AtKTI11* eine *kti11Δ* Mutation funktionell komplementieren kann. Hierzu wurde der Stamm UMY2936 (*kti11Δ::KanMX6 SUP4 ade2-1*) entweder mit dem Leervektor YCplac111 (LV) oder den Plasmiden pRZ45 (*KTI11*) und pRZ49 (*AtKTI11*) transformiert und nach erfolgter Selektion auf galaktose-haltige Platten getropft. Hier wird ersichtlich, dass *kti11Δ*-Zellen (LV) eine tief-rote Färbung aufweisen (Abb. 10). Hingegen erscheinen die mit dem Wildtyp- oder dem *AtKTI11*-Allel transformierten Stämme weiß. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der tRNA Modifikation durch *KTI11* Deletion durch gleichzeitige Anwesenheit des pflanzlichen Orthologs *AtKTI11* komplementiert werden kann.

3.1.1.3 *AtKti11* ermöglicht Ribosylierung von eEF2 durch das Diphtherie-Toxin

Mutationen im Gen von *KTI11* führen, neben dem Verlust der Elongator-abhängigen tRNA Modifikation, zum Verlust der Diphthamid-Modifikation am eukaryotischen Elongationsfaktor eEF2 (Liu und Leppla, 2003). Durch Komplementationsanalysen sollte nun untersucht werden, ob *AtKti11* das Hefe *Kti11* Protein funktionell ersetzen kann. Hierzu wurde jeweils ein Leervektor (LV, Ycplac111), *KTI11* (pRZ45) oder *AtKTI11* (pRZ49) zusammen mit dem Diphtherietoxin kodierenden Plasmid pLYM101 in einen *KTI11* Deletionsstamm (RZY40) ko-transformiert. pLYM101 kodiert für die katalytisch aktive Untereinheit des Diphtherie-Toxins unter Kontrolle des regulierbaren

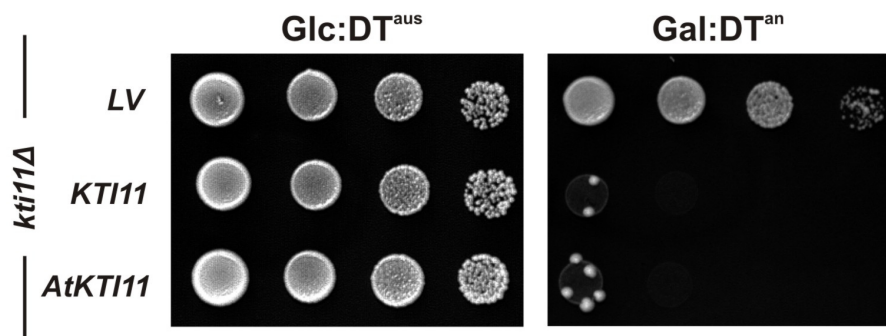


Abbildung 11: *AtKTI11* verleiht Diphtherie-Toxin Sensitivität.

Ein *kti11Δ* Stamm (RZY40) wurde entweder mit einem Leervektor YCplac111 (LV), oder den Plasmiden pRZ45 (*KTI11*) oder pRZ49 (*AtKTI11*) und dem Diphtherie-Toxin Vektor pLYM101 (Diphtherie Toxin: DT-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors;) ko-transformiert. Toxin-sensitive Stämme sind in ihrer Zellproliferation gestört, resistente Stämme sind zum Wachstum auf Galaktose befähigt. Die *KTI11* und *AtKTI11* transformierten Stämme sind Toxin-sensitiv, während der Leervektor-transformierte Stamm resistent ist. Getropft wurde jeweils auf 2% Glukose (reprimierend) und 2% Galaktose (induzierend). Die Zellen wuchsen 2 Tage bei 30° C.

GAL1-Promotors und bietet so die Möglichkeit, die Expression durch Glukose zu reprimieren oder durch Galaktose zu induzieren. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, führt eine *kti11* Deletion zur Resistenz gegenüber dem Diphtherietoxin. Hingegen sind *KTI11* und *AtKTI11* transformierte Stämme in Anwesenheit des Diphtherietoxins in ihrem Wachstum gehemmt und prägen Sensitivität aus. Das bedeutet, dass in beiden Stämmen der Translationselongationsfaktor 2 modifiziert vorliegt. Demnach ist *AtKTI11* in der Lage, sowohl die *kti11Δ* Fehlfunktion in der tRNA-Modifikation zu komplementieren (siehe 3.1.1.1 und 3.1.1.2), als auch die defekte Diphthamid-Biosynthese wiederherzustellen.

3.1.2 Interaktionsstudien von AtKti11 in Hefe

Nachdem die funktionelle Komplementation von *kti11Δ* Zellen durch *AtKTI11* gezeigt werden konnte, sollten nun Interaktionsstudien von AtKti11 mit bekannten Kti11 Interaktoren (Elp1-Elp3, Dph1 und Dph2, Kti13) in Hefe durchgeführt werden. Hierzu wurden Stämme konstruiert, die AtKti11 (pRZ49) oder Kti11 (pRZ45) (plasmidkodiert) und die zu untersuchenden Proteine (Elp2, Elp6, Dph1, Dph2, Kti13 und Kti12) in Epitop-markierter Form exprimierten. Die Plasmide pRZ45 und pRZ49 wurden in die Stämme RZY52 (Dph1-c-myc), RZY53 (Dph2-c-myc), FFY2t-a (Elp2-c-myc), FFY4t-a (Kti12-c-myc), FFY6t-a (Elp6-c-myc) und RZY06 (Kti13-c-myc) transformiert und auf Erhalt selektiert (Leu). In Ko-Immünpräzipitationen konnten erwartungsgemäß die Diphthamid-Biosynthese Proteine Dph1

und Dph2 durch Kti11 präzipitiert werden (Abb. 12). Eine physikalische Interaktion dieser Proteine konnte ebenfalls mit AtKti11, wenn auch stark abgeschwächt, nachgewiesen werden (Abb. 12). Überraschenderweise zeigte AtKti11 ein im Vergleich zu Kti11 verlangsamtes Laufverhalten im SDS-Acrylamid-Gel. Dies deutet primär auf ein größeres Molekulargewicht hin (ca. 6kDa größer als Kti11). Da das berechnete Molekulargewicht von AtKti11 (9,43 kDa) dem von Kti11 (9,38 kDa) jedoch nahezu identisch ist, könnte das unterschiedliche Laufverhalten auf eine AtKti11 spezifische posttranslationale Modifikation hinweisen.

Weitere Interaktionsstudien mit Elongator-Untereinheiten (Elp2, Elp6) und Elongator-relevanten Faktoren (Kti12, Kti13) zeigten, dass im Gegensatz zu Kti11 (Wechselwirkungen mit Elp2, Elp6, Kti12 und Kti13 nachweisbar), Atkti11 lediglich mit der Core-Elongator-Untereinheit Elp2 und Kti13 interagiert. Die Atkti11-Kti13 Proteinwechselwirkung ist von der Intensität vergleichbar mit der Kti11-Kti13 Interaktion. Hingegen ist eine abgeschwächte Elongator Interaktion (AtKti11-Elp2) erkennbar (Abb. 13). Eine Interaktion zwischen AtKti11 und Kti12 oder Elp6 war nicht nachweisbar. Bär et al. konnten 2008 zeigen, dass Ko-Präzipitationen von Kti11 mit Kti12 und dem HAP-Elongator-Komplexes möglich sind, diese aber höchst-wahrscheinlich indirekt über den Core-Elongator-Komplex vermittelt werden, also indirekte Interaktionen darstellen. AtKti11 zeigte in den hier durchgeführten Ko-Ips eine abgeschwächte Bindung an den Core-Elongator-Komplex. Bezieht man die Daten von Bär et al. mit ein, so ist es denkbar, dass aufgrund der schwächeren AtKti11-Core-Elongator Interaktion der indirekt präzipitierte HAP-Komplex unterhalb der Western Nachweisgrenze liegt.

Damit wird ersichtlich, dass trotz verminderter Bindungsintensität des pfl. Kti11 Orthologs an den Elongator und der Dph-Proteine die Funktion des Hefeproteins durch *AtKTI11* ersetzt werden kann (Komplementationsstudien 3.1.1.2 und 3.1.1.3).

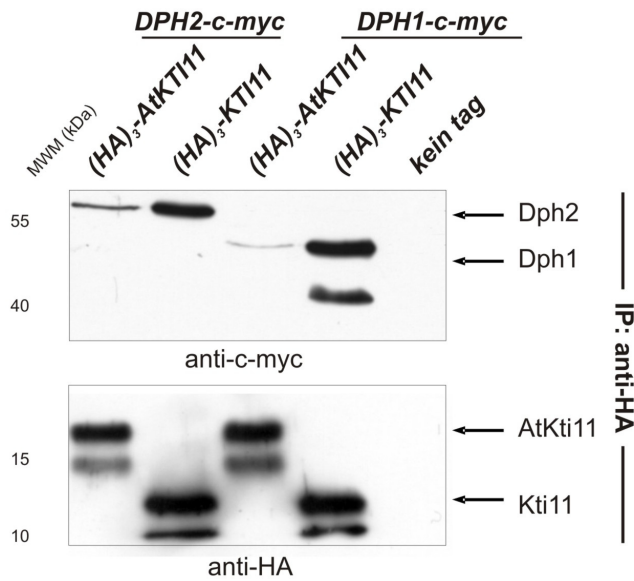


Abbildung 12: AtKti11 interagiert mit Dph1 und Dph2.

Ko-Immunopräzipitation von Dph1, Dph2 mit AtKti11 und Kti11. Von den Stämmen RZY52 (Dph1-c-myc) und RZY53 (Dph2-c-myc), die plasmidcodiert entweder (HA)₃-Kti11 (pRZ45) oder (HA)₃-AtKti11 (pRZ49) exprimierten, wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Dph1 und Dph2) und Anti-HA-AK (Kti11 und AtKti11) detektiert.

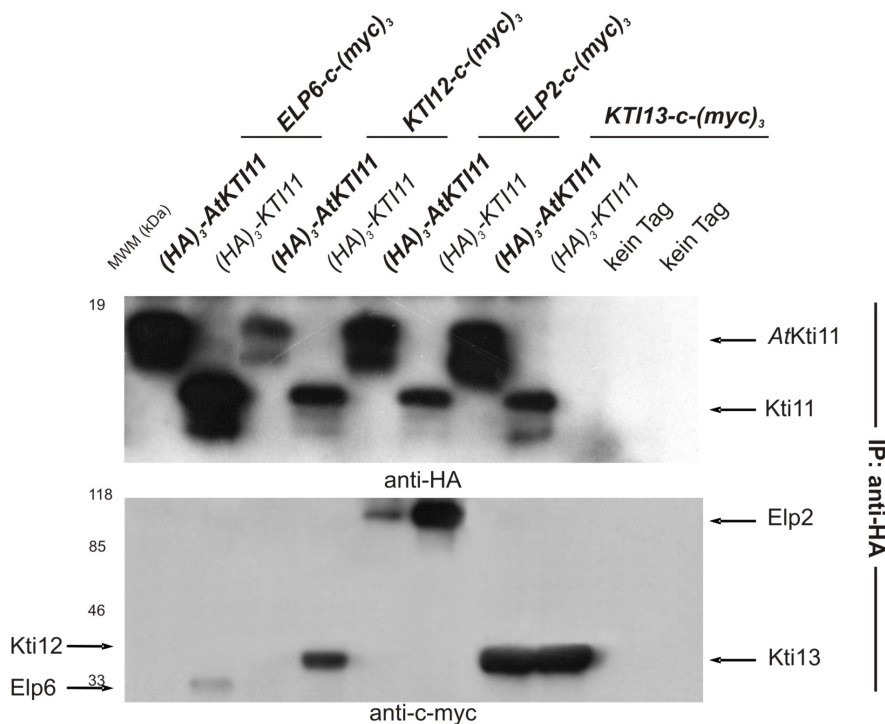


Abbildung 13: AtKti11 interagiert mit Kti13 und Elp2

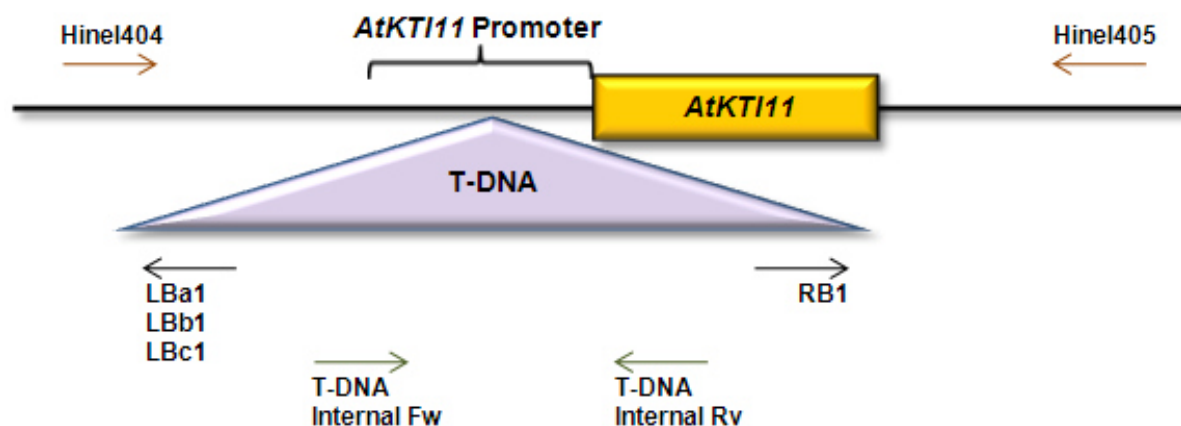
Ko-Immunopräzipitation von Elp6, Kti12, Elp2 und Kti13 mit AtKti11 oder Kti11. Von den Stämmen FFY6t-a (Elp6-c-myc), FFY4t-a (Kti12-c-myc), FFY2t-a (Elp2-c-myc) und RZY06 (Kti13-c-myc), die plasmidcodiert entweder (HA)₃-Kti11 (pRZ45) oder (HA)₃-AtKti11 (pRZ49) exprimierten, wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-myc-AK (Elp2, Epl6, Kti12 und Kti13) und Anti-HA-AK (Kti11 und AtKti11) detektiert.

3.2 Charakterisierung von *AtKti11* in *Arabidopsis thaliana*

Nachdem der *Arabidopsis thaliana* ORF At2g15910 als Kti11 Ortholog identifiziert werden konnte, sollten nun sowohl phänotypische als auch biochemische Untersuchungen helfen, neue Erkenntnisse über At2g15910 in der Pflanze zu erlangen. Von großem Interesse war hierbei die Etablierung stabiler *AtKT11* T-DNA- sowie Überexpressions-Linien. Mit Hilfe der Arabidopsis Genbank (TAIR) wurde nach verfügbaren T-DNA Insertionslinien im chromosomalen Genbereich von At2g15910 gesucht. Lediglich eine T-DNA-Insertionslinie im Promoterbereich (ca. 60 Basen vor dem Translationsstartsignal; ATG) von *AtKT11* war vorhanden (T-DNA-Insertionslinie Salk_039327; erhalten vom NASC-seed stock centre). Die Samen wurden geordert und für die Untersuchung auf Kanamycin-haltigen Pflanzenmedium ausgebracht. Ca. 40 Samen keimten und zeigten im frühen Entwicklungsstadium keinen beobachtbaren Phänotyp. Nach 2 Wochen wurden die jungen Pflanzen pikiert und jeweils ein Blatt für die Präparation chromosomaler DNA isoliert. Daran durchgeführte PCRs sollte die genomische Integration der T-DNA an beschriebener Stelle bestätigen.

3.2.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionslinie Salk_039327

Die genomische DNA inklusive des *ORFs* von *AtKT11* sowie 550 Basenpaar strom-aufwärts und -abwärts des Start- und Stopp-Codons wurde mit dem Primerpaar hinel404 und hinel405 amplifiziert (Lage der Primer, siehe Abb. 14). Für heterozygote oder Wildtyp Pflanzen wurde ein PCR Fragment von 1372 Bp erwartet. Eine T-DNA Insertion im Promoterbereich sollte für homozygote Pflanzen aufgrund der Größe der T-DNA kein PCR-Signal ermöglichen. In allen überprüften Pflanzen wurde eine PCR Bande von ca. 1400 Bp detektiert. Dies bedeutet, dass alle 40 Pflanzen heterozygote oder Wildtyp Pflanzen waren. Um hier zwischen beiden Formen unterscheiden zu können, wurden PCRs mit weiteren Primerkombinationen von hinel404/405 und LBa1/b1/c1 (bindet im linken Grenzbereich der T-DNA) oder RB1 (bindet im rechten Grenzbereich der T-DNA) durchgeführt. Keine der durchgeführten PCRs war erfolgreich (mit Ausnahme der Positivkontrolle), was bedeutet, dass entweder Wildtyp-Pflanzen vorlagen oder die T-DNA an anderer Stelle im Genom inseriert vorlag. Daraufhin wurden zusätzliche PCR mit T-DNA internen Kontrollprimern (TDNA-internal Fw/TDNA-internal Rw) durchgeführten. Diese ergab für 24 Pflanzen eine genomische T-DNA-Insertion. Daraus wurde geschlossen, dass die Linie zwar eine T-DNA Insertion trägt, diese sich aber nicht im annotierten Genbereich von *AtKT11* befindet.



Primer Fw	Primer Rv	erwartete Fragment Länge	Erfolgreich ja (+); nein (-)
HineI 404	HineI 405	1372	+
HineI 404	Lba1	500-800	-
HineI 404	Lbb1	500-800	-
HineI 404	Lbc1	500-800	-
HineI 405	Lba1	500-800	-
HineI 405	Lbb1	500-800	-
HineI 405	Lbc1	500-800	-
HineI 404	RB1	500-800	-
HineI 405	RB1	500-800	-
TDNA-internal Fw	TDNA-internal Rv	400	+

Abbildung 14: Darstellung der chromosomalen Primerbindestellen.

HineI404/405 Primer binden ca 500 Bp vor bzw. hinter dem offenen Leseraster von At2G15910. Lba1-Lba3 binden in der linken border-Sequenz der TDNA. RB1 bindet in der rechten Border Sequenz der TDNA. TDNA internal Fw und Rv binden innerhalb der T-DNA Sequenz.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden keine weiteren Experimente mit dieser T-DNA Linie durchgeführt.

3.2.2 AtKti11 Lokalisierung in BY2 Tabak Zellkultur

Um ein besseres Verständnis von AtKti11 Funktionen in der Pflanze zu erlangen, sollte die zelluläre Verteilung einer GFP fusionierten AtKti11 Variante untersucht werden. Hierzu wurde *AtKT111* zuerst in den pDONR 221 (Invitrogen) kloniert (BP Rekombinase Reaktion). Das resultierende Plasmid (pRZ56) wurde anschließend eingesetzt, um *AtKT111* in einer LR Rekombinase-Reaktion in den GFP tragenden Zielvektor pK7FWG2,0 (Abb. 15) umzuklonieren (pRZ57). Die Expression des Fusionsproteins AtKti11-GFP wird durch den konstitutiven S35 Promoter gesteuert. Anschließend wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* zunächst eine stabile *GFP-AtKT111* Tabak-Zellkulturlinie etabliert. Kanamycin-resistente Calli (T-DNA Selektion) wurden auf ihre GFP Expression hin überprüft und die drei Fluoreszenz-stärksten Linien (Selektion via Fluoreszenzmikroskopie) für folgenden mikroskopischen Untersuchungen verwendet.

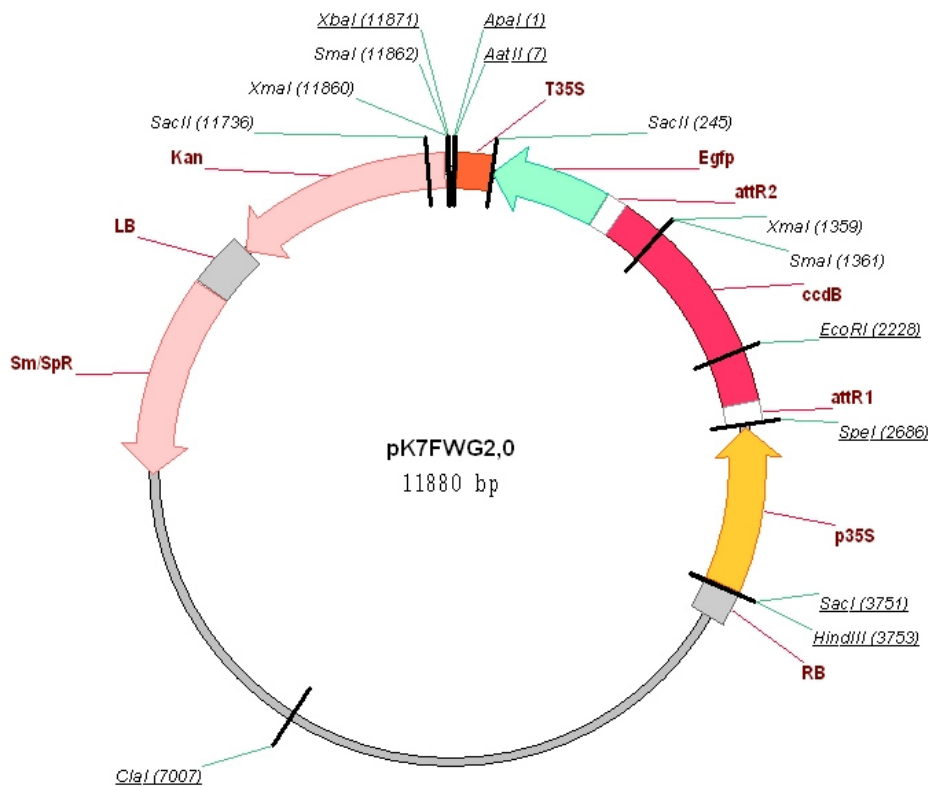


Abbildung 15: Plasmidkarte des Expressionsvektors pK7FW2.0.

AtKT111 wurde mit Hilfe der Gateway Technologie unter die Kontrolle des S35 Promoters (p35S) kloniert und wird als GFP (Egfp) Fusionsprotein exprimiert.

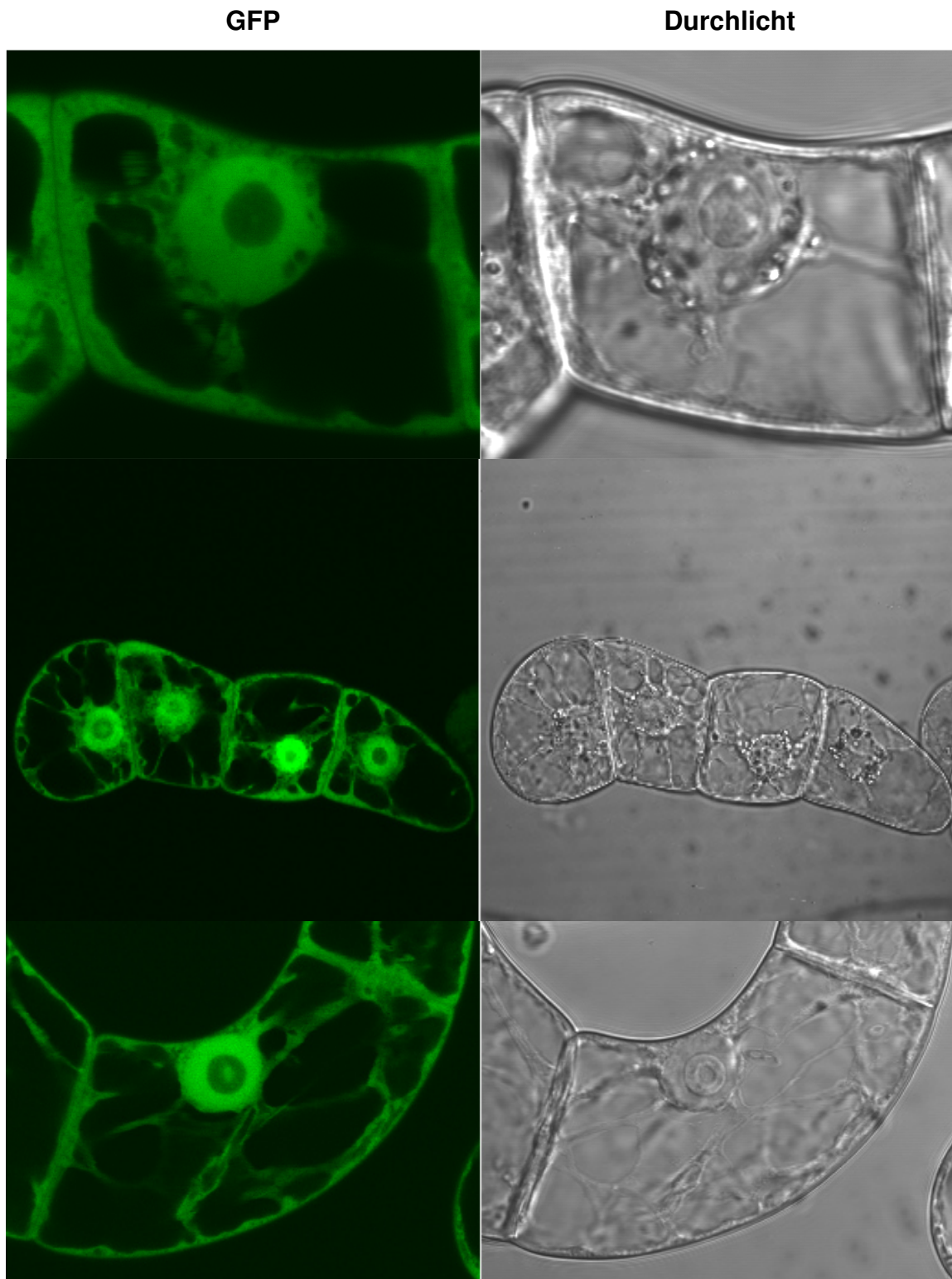


Abbildung 16: AtKti11-GFP exprimierende BY-2 Tabak-Zelllinie.

Die AtKti11-GFP Verteilung in Tabak Zellkultur wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Links: GFP Fluoreszenz. Rechts: Durchlichtmikroskopie. AtKti11 ist im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert. Keine Fluoreszenzsignale im Zellwandbereich, Vakuole und Nukleolus.

Aufgrund der in Abb. 16 gezeigten Fluoreszenzverteilung von AtKti11-GFP innerhalb der Zelle kann von einer Lokalisierung im Zytoplasma und Zellkern ausgegangen werden. In der

Vakuole, der Zellwand und dem Nucleolus konnten keine Fluoreszenz Signale beobachtet werden.

3.2.3 AtKti11 Lokalisierung in *Arabidopsis thaliana*

Die Verteilung von AtKti11 sollte nun auch in *Arabidopsis thaliana* analysiert werden. Blühende *Arabidopsis* Pflanzen wurden mit Hilfe der „floral dip“ Methode mit dem Plasmid pRZ57 (*AtKTI11-GFP*) transformiert und die Samen auf Kanamycin-haltigem Medium ausgesät. Resistente Pflanzen wurden vor dem Pikieren auf ihre GFP Signalintensität überprüft und 10 Pflanzen wurden für die mikroskopischen Untersuchungen verwendet. Die bereits in Tabak Zellkultur beobachtete Verteilung von AtKti11 im Zytoplasma und Zellkern konnte ebenfalls in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln beobachtet werden (Abb. 17). Eine AtKti11 Verteilung in anderen Pflanzenorganen wurde aufgrund der Autofluoreszenz von Chlorophyll nicht durchgeführt.

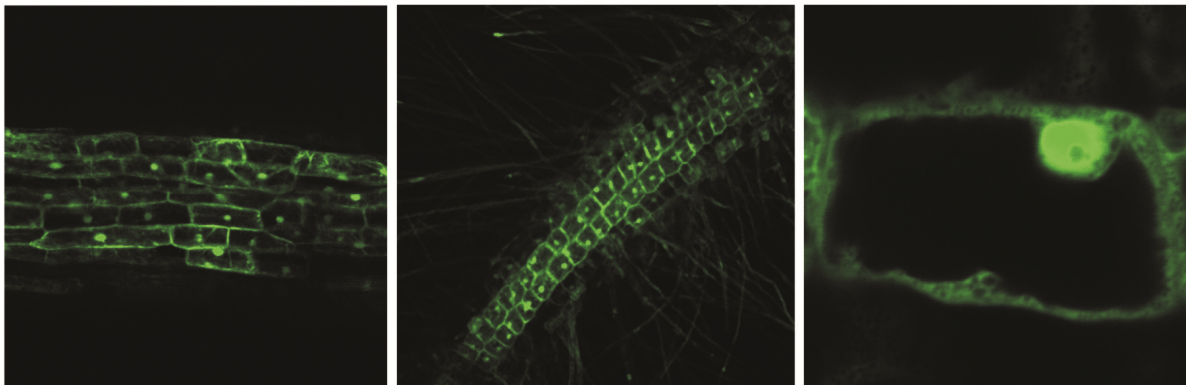


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie von AtKti11-GFP exprimierenden *A. thaliana* Linien.

Die AtKti11-GFP Verteilung in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Sichtbar ist die GFP-Fluoreszenz innerhalb des Wurzelbereichs. AtKti11-GFP ist im Zytoplasma und Zellkern zu detektieren. Keine Fluoreszenzsignale finden sich im Zellwandbereich, der Vakuole und dem Nucleolus.

3.2.4 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von AtKti11 aus *A. thaliana* Zellkultur

Proteinaufreinigungen von Kti11 in Hefe haben gezeigt, dass Kti11 mit verschiedensten Proteinen interagiert. Untereinheiten des Dph-Komplexes (Dph1; Dph2) werden ebenso von Kti11 gebunden, wie Untereinheiten des Elongator-Komplexes, ribosomale Proteine, der eukaryotische Elongationsfaktor eEF2 oder das tRNA modifikations-relevante Protein Kti13. Um mögliche Interaktionspartner von AtKti11 in der Pflanze zu identifizieren, fusionierten wir AtKti11 mit einem C-terminalen TAP-Epitop. Das hier verwendete TAP-Epitop besteht aus 2 IgG-Binde-Domänen vom *Staphylococcus aureus* Proteine A (ZZ), welche durch eine TEV-

Protease-Schnittstelle von der Calmodulin-Bindedomäne getrennt vorliegen (Rigaut *et al.*, 1999).

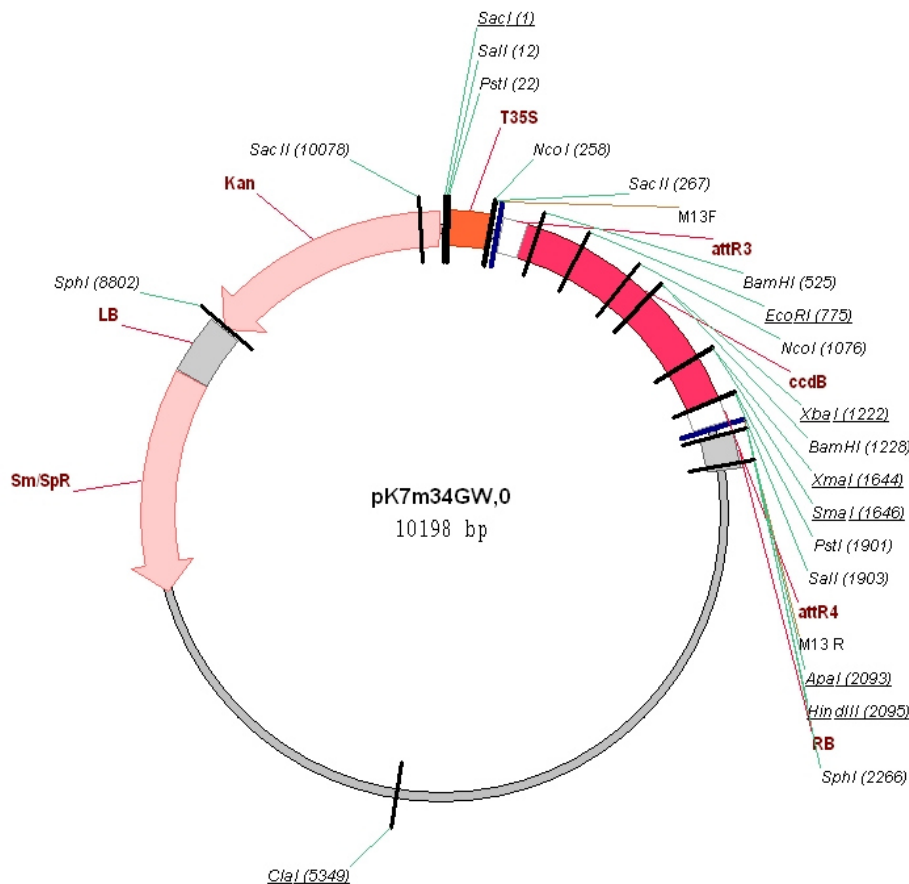


Abbildung 18: Plasmidkarte des binären Vektors pK7m34GW,0.

Durch die vorhandenen attR-sites können beliebige Fragmente (z. B. p35S, TAP-Epitop) aus Gateway kompatiblen Vektoren mit Hilfe der „multi-site Gateway“ Technologie in den Vektor pK7m34GW,0 kloniert werden.

Die „multi-site Gateway“ Technologie wurde genutzt um einen S35 Promoter (enthalten in „pentryL4R1 p35s“, Karimi *et al.* 2005), *AtKTI11* (vorliegend in pRZ56) und das Tap-Epitop (enthalten in „pentryR2L3 TAP“, Karimi *et al.* 2005) in den Zielvektor pK7m34GW (Abb. 18) zu klonieren. Das resultierende Plasmid (pRZ58) trägt stromaufwärts vom *AtKTI11* Translationsstart den S35 Promoter und stromabwärts das TAP-Epitop. Eine anschließende 2-tägige Ko-Kultivierung von pRZ58 transformierten *Agrobacterium tumefaciens* mit *Arabidopsis thaliana* Zellkultur ermöglichte die Etablierung stabiler *Arabidopsis thaliana* Zellkulturlinien. Die Selektion transformierter *Arabidopsis* Calli erfolgte auf Kanamycin-Resistenz. Verschiedene Calli wurden auf ihre *AtKti11*-Tap Expression untersucht (Abb. 19) und die Linie (Spur 6; Abb. 19) mit der stärksten Expression wurde für die folgende Proteinaufreinigung verwendet.

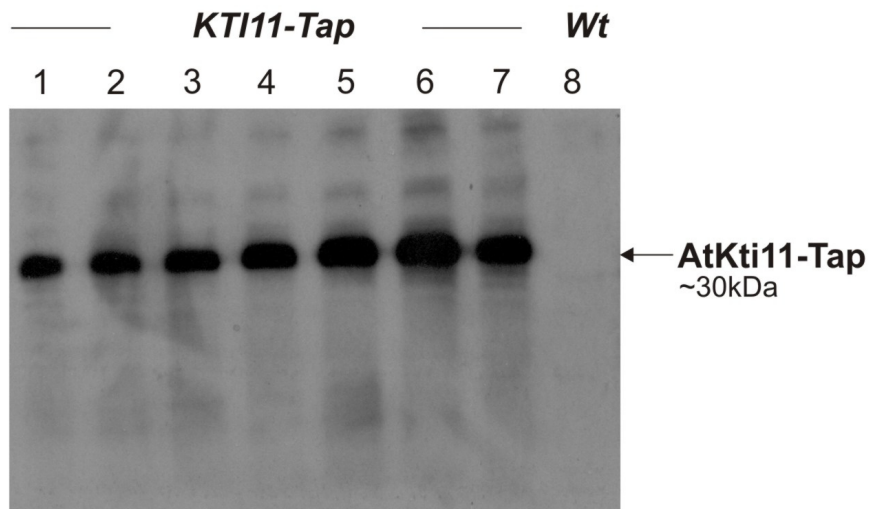


Abbildung 19: AtKti11-TAP Expressionslevel verschiedener Zellkulturlinien.

Gleiche Mengen an Proteinrohextrakt verschiedener AtKti11-TAP Zellkulturlinien wurden auf ihr AtKti11-TAP Expressionsniveau per Western-Analyse mit α -Calmodulin Antikörper überprüft. Spur 6 (entspricht Linie 6) zeigt die stärkste Signalintensität und wurden für die Proteinaufreinigung verwendet.

Zwei voneinander unabhängige Tap-Aufreinigungen mit jeweils 13 g Zellmasse wurden nach der Vorschrift von van Leene et al. (2007) durchgeführt. Nach Zellaufschluss wurden die erhaltenen Eluate zusammen mit Negativkontrollen (NTAP-BUB3: Spindel-Checkpoint Protein, NTAP-ATK5: *Arabidopsis thaliana* Kinesin 5; bereitgestellt von H. Nelissen, Gent) auf ein SDS-Gel geladen (Abb. 20) und Banden, die in den Negativkontrollen nicht sichtbar waren, ausgeschnitten und per Massenspektroskopie untersucht. Die Beladung des SDS-Gels und die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden vom VIB Department of Plant Systems Biology (Universität Gent) durchgeführt.

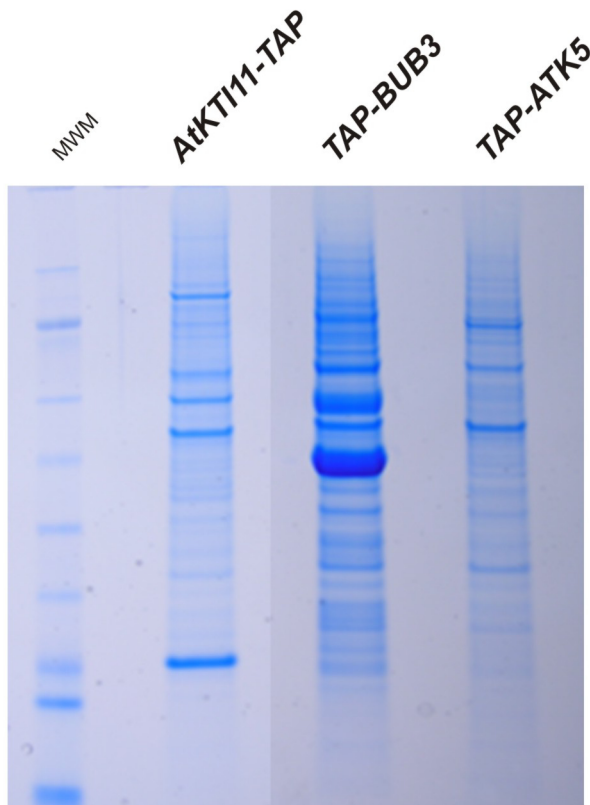


Abbildung 20: Eluate verschiedener TAP-Aufreinigungen im SDS-Gel.

Dargestellt sind die Eluate der TAP-Aufreinigungen von AtKti11, Bub3 und Atk5. Die Eluate von Bub3 und Atk5 stammen von Aufreinigungen des VIB Department of Plant Systems Biology (Universität Gent) und dienen als Negativkontrollen.

Die Ergebnisse der massenspektroskopischen Analyse beider unabhängig voneinander durchgeführten Tap-Aufreinigungen sind in Tabelle 11 und 12 dargestellt. Eine große Anzahl an Proteinen mit einem geringen Protein Score wurde in den massenspektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen. Der Protein Score gibt die gesamte Anzahl an nachgewiesenen Peptiden pro Protein an und ist ein Maß für die Stärke der Protein-Interaktion. Daher ist es wahrscheinlich, dass Proteine mit einem Protein Score von unter 100 lediglich Verunreinigungen darstellen. Das Auftreten von Calmodulin-Bindeproteinen innerhalb dieser Protein-Gruppe (At3g29310, At4g33050) unterstützt diese Vermutung. Die vom Hefe Kti11 bekannten Interaktoren (Elp1-Elp2-Elp3) konnten nun erstmals auch in der Pflanze nachgewiesen werden. Dabei ist der hohe Protein Score zu beachten, der auf eine spezifische Bindung hindeutet. Ebenfalls wurde ein weiterer möglicher Interaktionspartner von AtKti11 in der Pflanze identifiziert (Genprodukt von At1g27060). Proteinsequenzvergleiche mit der Hefedatenbank deuten darauf hin, dass es sich dabei um ein Kti13 Homolog handeln könnte (Aminosäuresequenz-Identität beider Proteine liegt bei ca. 18%). Diese Hypothese sollte durch Komplementationsanalysen in Hefe getestet werden.

Tabelle 11: Ergebnisse der ersten AtKti11-Tap-Aufreinigung.

Peptide Count gibt die Anzahl unterschiedlich gefundener tryptischer Peptide pro Protein an. Der Protein Score gibt die insgesamt Anzahl der pro Protein nachgewiesenen Peptide an.

At Nummer	Proteinname	Hefe Homolog	Peptide Count	Protein Score
At5g50320	ELO3	Elp3	28	1140
At1g27060	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	Ats1/Kti13?	16	703
At5g13680	ELO2	Elp1	36	761
At1g49540	ELP2	Elp2	25	659
At3g29310	Calmodulin-Bindeprotein ähnlich (Fragment)		10	72
At3g53260	Phenylalanin-Amoniumlyase (PAL2)		8	72
At3g28880	Ankyrin Repeat Protein		13	71
At5g22035	Ubiquitin spezifische Protease		9	71
At1g08110	Lactoylglutathion Lyase		8	70
At1g78840	F-box Protein		13	69
At3g18730	Tetratricopeptide-repeat-containing protein		18	69
At5g08415	lipoic acid synthase family protein	LIP5	11	69
At5g55300	DNA Topoisomerase I	TOP1	18	66
At4g30230	Hyothetisches Protein		9	62

Tabelle 12: Ergebnisse der zweiten AtKti11-Tap-Aufreinigung.

Peptide Count gibt die Anzahl unterschiedlich gefundener tryptischer Peptide pro Protein an. Der Protein Score gibt die gesamte Anzahl der pro Protein nachgewiesenen Peptide an.

At Nummer	Proteinname	Hefe Homolog	Peptide Count	Protein Score
At5g50320	ELO3	Elp3	28	1140
At5g13680	ELO2	Elp1	36	829
At1g27060	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	Ats1/Kti13?	11	579
At1g49540	ELP2	Elp2	24	673
At2g05830	eukaryotischer Elongationsfaktor 2B (ähnlich)	Mri1	4	63
At2g18410	Elp5	Elp5	4	46

At4g28230	exprimiertes Protein		2	34
At2g05910	expremiertes Protein		8	68
At4g33050	Calmodulin-Bindeprotein (Fragment)		8	67
At3g27130	hypothetisches Protein		11	67
At2g37420	Kinesin-Motor-Protein (ähnlich)	KIP1	16	66
At1g11420	Agenet-Domänen enthaltene Protein		8	66
At5g02230	Dehalogenase ähnliche Hydrolase		10	63

3.3 Komplementationsanalyse der *kti13*Δ Mutante mit dem At1g27060 Gen aus *Arabidopsis thaliana*

Protein-Interaktionsstudien mit TAP-markierten AtKti11 in *Arabidopsis thaliana* hatten neben dem Core-Elongator Komplex ein bislang uncharakterisiertes Protein als Bindepartner identifiziert. Sequenzähnlichkeiten von At1g27060 mit Hefe Kti13 (18%ige Aminosäureidentität) und potentiellen Kti13 Homologen aus dem Menschen (Human; hDelGEF) und der Maus (Mouse; mDelGEF) deuten auf ein potentielles Homolog in *A. t.* hin (Abb. 21). Eine besonders hohe Dichte identischer Aminosäuren tritt vermehrt N-terminal auf (grüne Boxen). Jedoch konnte ebenfalls im C-Terminus ein stark konservierter Bereich identifiziert werden (rote Box). In Cross-Komplementationsstudien sollte eine mögliche funktionelle Substitution des Hefe Kti13 Proteins durch das Genprodukt von At1g27060 untersucht werden. Hierfür wurde die kodierende Gensequenz von *AtKTI13* in das Plasmid pRZ48 subkloniert (pRZ59). Anschließend wurden die Plasmide pRZ59 (*AtKTI13*) + YCplac111 (LV111), YCplac111 (LV111) + pCM190 (LV190), pRZ13 (*KTI13*) + pCM190 (LV190) und pRZ59 (*AtKTI13*) + pRZ49 (*AtKTI11*) mit dem γ -Toxin kodierenden Vektor pHMS14 in einen *kti13*Δ Stamm (Y00388) ko-transformiert und Transformanten auf glukosehaltigem (γ -Toxin reprimierend) und galaktosehaltigem (γ -Toxin induzierend) Minimalmedium getüpfelt. Der mit einem *KTI13* Wildtypallel transformierte Stamm (pRZ13 + YCplac33) ist auf γ -Toxin induzierenden Bedingungen im Wachstum inhibiert und prägt somit Toxin Sensitivität aus (Abb. 22).

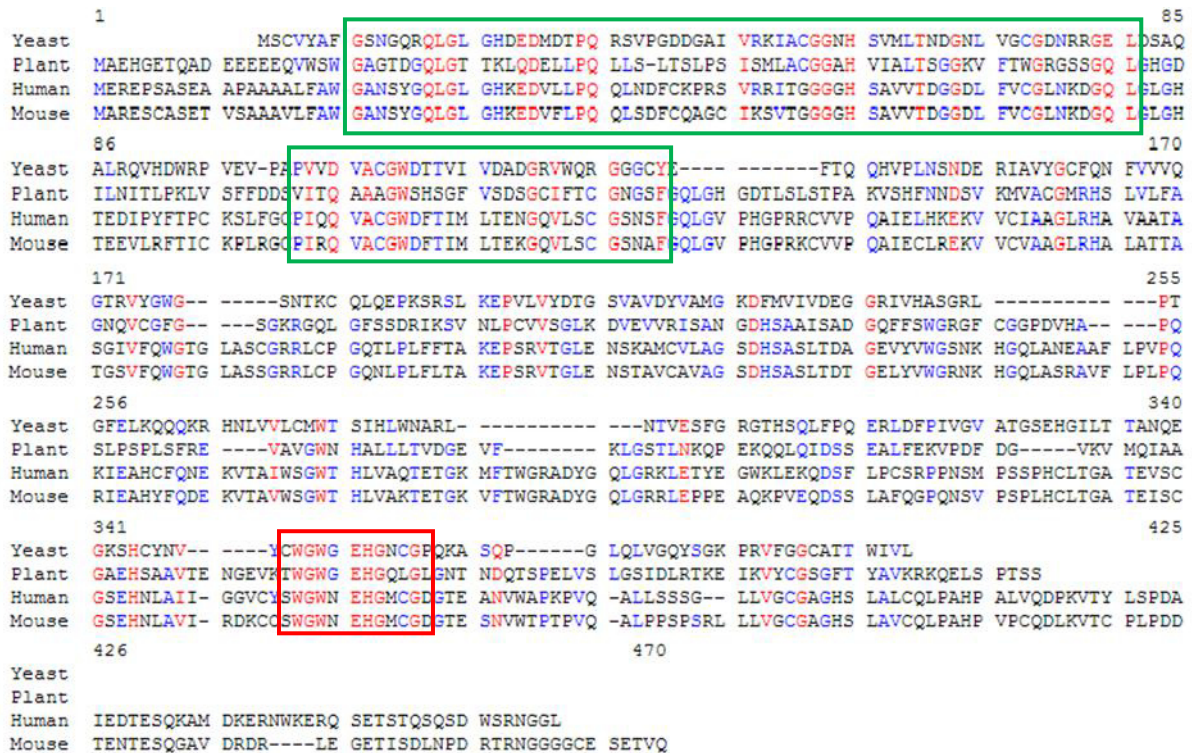


Abbildung 21: Sequenzvergleich möglicher Kti13 Homologe.

Kti13 aus *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) wurde mit möglichen Homologen aus *Arabidopsis thaliana* (plant; At1g27060), *Homo sapiens* (human; hDelGEF) und *Mus musculus* (mouse; mDelGEF) verglichen. Das potentielle pflanzliche Kti13 Homolog besitzt eine 18%ige Aminosäureidentität zum Hefe Protein. Im N- und C-terminalen Bereich von Kti13 befinden sich stark konservierte Regionen (grüne und rote Vierecke).

Ein Wachstumsarrest durch γ -Toxin Induktion konnte im Deletionsstamm (LV111 + LV33) nicht beobachtet werden (Abb. 22). Eine *AtKTI13* (*AtKTI13* + LV111) Expression hingegen führt zu einer partiellen Komplementation des Deletionsphänotyps. Interessanterweise resultiert eine zusätzliche *AtKTI11* Genkopie in diesem Stamm (*AtKTI13* + *AtKTI11*) in einer verstärkten Wachstumsinhibition durch das γ -Toxin (Abb. 22). Dieser additive Effekt deutet auf eine Interaktion beider Proteine hin. Diese neuen Erkenntnisse sollten durch den *SUP4* Suppressionsassay gestützt werden. Hierzu wurde das *AtKTI13* Gen (pRZ59) in einem *kti13Δ ade2-1 SUP4* (UMY2940) Stammhintergrund transformiert (Abb. 23). Der mit Hefe *KTI13* (pRZ13) transformierte *kti13*-Deletionsstamm zeigt, wie zu erwarten, eine Weißfärbung, während der mit dem Leervektor (LV; pCM190) transformierte Stamm aufgrund der fehlenden Modifikation an der Suppressor tRNA *SUP4* eine Rotfärbung aufweist (Abb. 23). Betrachtet man den *AtKTI13* (pRZ59) transformierten Stamm, so wird hier ein intermediärer Phänotyp sichtbar (leicht rosa Färbung). Auch hier verstärkt eine zusätzliche *AtKTI11* Kopie (pRZ49) die *AtKTI13* Komplementation (weiße Koloniefarbe). Diese Daten weisen darauf hin, dass *AtKTI13* die Hefe Kti13 Funktion partiell ersetzen kann und das *AtKTI11* diesen Effekt verstärkt.

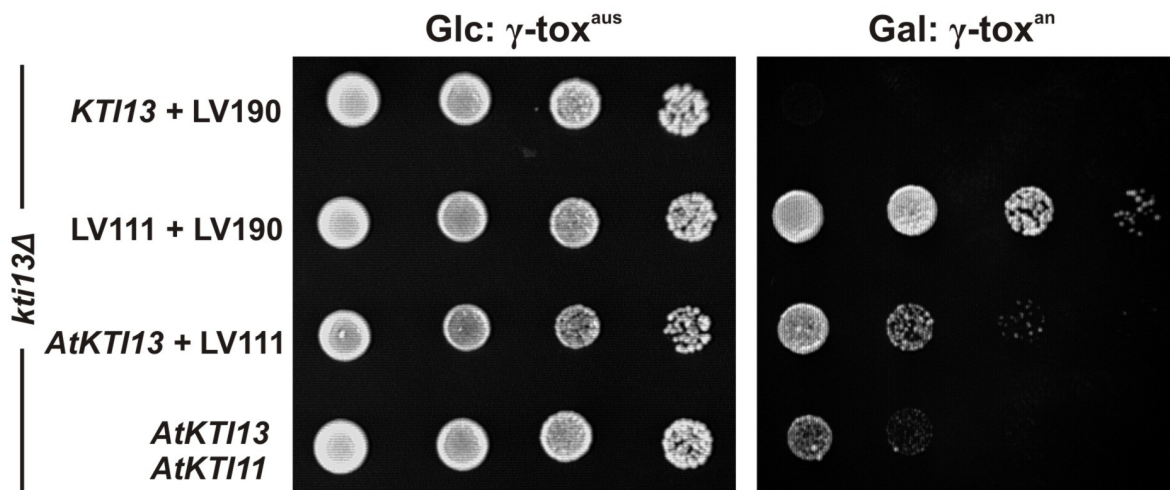


Abbildung 22: Cross-Komplementationsanalyse von *AtKTI13* in Hefe mithilfe des γ -Toxin Tests.

Ein *kti13Δ*-Stamm wurde mit einem *KTI13*-Wildtypallel (pRZ13) + Leervektor (LV190, pCM190), Leervektor (LV111; YCPLac111) + Leervektor (LV190; pCM190), *AtKTI13* (pRZ59) + Leervektor (LV111; YCplac111) oder *AtKTI11* (pRZ49) + *AtKTI13* (pRZ59) Allel zusammen mit dem Vektor pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *Kti13* sowie *AtKTI13* + *AtKTI11* sind Toxin-sensitiv. Ein *Kti13Δ* Stamm transformiert mit einem Leervektor ist Toxin resistent. Eine Expression des *AtKTI13* Allels resultiert in partieller Toxin Resistenz. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

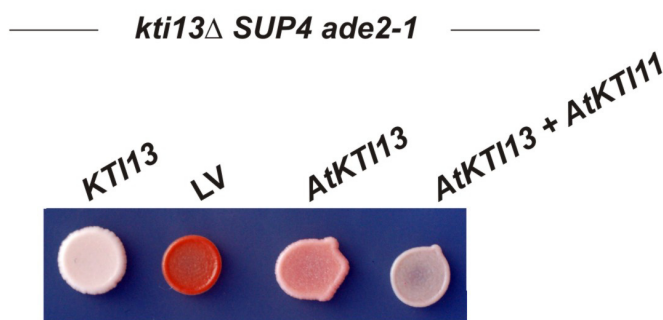


Abbildung 23: *AtKTI13* ermöglicht partielle ochre-Suppression durch *SUP4*.

In einen *ade2-1 SUP4 kti13Δ* Stamm (UMY2940) wurden folgende Plasmide transformiert: pRZ59 (*AtKTI13*), pRZ13 (*KTI13*), Leervektor (LV YCplac111) und pRZ59 (*AtKTI13*) + pRZ50 (*AtKTI11*). Die Stämme wurden auf YEPD (0,5% Hefeextrakt) getropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

3.4 Charakterisierung der Kti11 – Kti13 Interaktion

Eine physikalische Interaktion zwischen Hefe-Kti11 und Kti13 konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Zabel *et al.*, 2008). Diese Interaktion erfolgt Elongator-unabhängig und wird durch Mutationen im C-terminalen Bereich von Kti13 gestört. Bis heute

ist nicht geklärt, ob beide Proteine eine direkte Interaktion eingehen oder weitere Proteine für diese Wechselwirkung benötigt werden. Diese Fragestellung sollte in diesem Teilabschnitt untersucht werden. Um dies zu klären, wurde ein *E. coli* Expressionsplasmid konstruiert, dass sowohl ein Kti13-Xpress- als auch ein Kti11-(HA)-markiertes Protein codiert (pRZ53; Vektorrückgrad pTrcHis). Beide Gene werden als polycystronische mRNA transkribiert. Die rekombinante Expression der Proteine erfolgte in einem *E. coli* Rosetta Expressionsstamm. Die gewonnenen Protein-Rohextrakte wurden für Ko-Immünpräzipitationsstudien mit immobilisierten anti-HA Antikörpern eingesetzt. Interessanterweise war es möglich, mit Hilfe von HA-markiertem Kti11, Xpress-markiertes Kti13 zu kopräzipitieren (Abb. 24). In der Negativkontrolle (ausschließlich Kti13 markiert) konnte kein Kti13 nachgewiesen werden. Xpress-Kti13 war in beiden Rohextrakten gleichmäßig exprimiert. Beide rekombinant exprimierten Proteine sind also zu einer Interaktion befähigt und benötigen hierfür keine weiteren Hefepoteine.

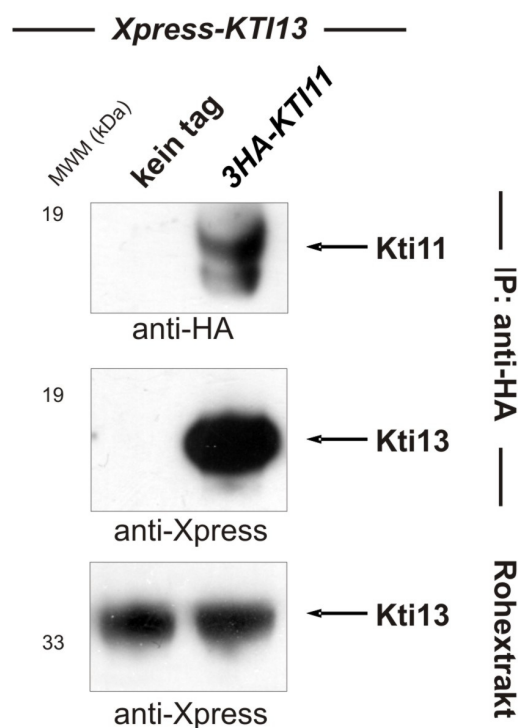


Abbildung 24: Protein Interaktion von rekombinant exprimierten Kti11 und Kti13.

Ko-Immünopräzipitation von HA-markierten Kti11 und Xpress-markierten Kti13. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt von *Xpress-Kti13* oder *Xpress-Kti13/HA-KTI11* Zellen für die Ko-Immünopräzipitation mit Anti-HA-AK eingesetzt. Die Immünpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit anti-Xpress-AK (Kti13) und anti-HA-AK (Kti11) detektiert. Kti13 ist in beiden Rohextrakten detektierbar.

3.5 Biochemische und phänotypische Charakterisierung von Kti11

In den vergangenen Jahren gelang es, sowohl genetisch als auch biochemisch neue Erkenntnisse über Kti11 zu erlangen. So zeigte sich einerseits der Einfluss von Kti11 in Elongator abhängigen Prozessen, andererseits ist Kti11 essentieller Bestandteil der Diphthamid-Biosynthese. Erste Strukturaufösungen erschienen im Jahr 2005 durch Sun *et*

al., gefolgt durch Yu *et al.* (2008). Hierbei zeigte sich, dass Kti11 in der Lage ist, mit Hilfe von 4 konservierten Cysteinen ein Zink-Ion zu koordinieren.

In diesem Teilabschnitt sollte die biologische sowie biophysikalische Relevanz der Cystein-Reste in Kti11 näher charakterisiert werden. Hierfür sollte zuerst das Kti11 Wildtyp-Protein rekombinant in *E. coli* gereinigt werden. Hierfür wurde die kodierende Sequenz von *KTI11* amplifiziert und in den Expressionsvektor pTrcHis2 (Invitrogen) kloniert. Dieser trägt stromabwärts vom Klonierungsort ein myc- sowie (His)₆-Epitop (pRZ60). Die Expression erfolgte im *E. coli* Rosetta Expressionsstamm bei 37°C mit anschließender zwei-Schritt-Aufreinigung. Zuerst wurde Kti11-myc-(His)₆ über eine Nickel-NTA-Matrix angereichert. Die einzelnen Schritte (Durchfluss, Waschschrte 1, 3 und 6; Elutionfraktion 3; Elution einer parallel mitgeführten Kontrolle (Kontrolle)) wurden durch Coomassie Färbung nach der SDS-PAGE untersucht (Abb. 25). Wie in den 3. Elutionsfraktion ersichtlich, konnte ein Großteil der Wirtsproteine erfolgreich entfernt werden. Interessanterweise waren die Elutionsfraktionen nicht farblos, sondern zeigten eine auffällige rot-braune Färbung. Abbildung 26 zeigt den direkten

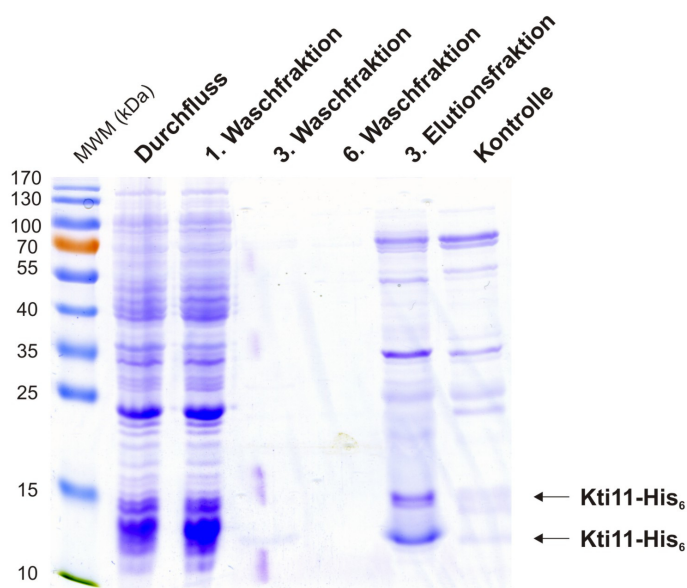


Abbildung 25: Nickel-NTA Elutionsprofil von Kti11.

Dargestellt sind einzelne Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatografie von poly-His markierten Kti11.

Vergleich einer Elutionsfraktion von Kti11 (rechts) und dem parallel gereinigten Kti13 (links). Eine braune Färbung weist in der Regel auf Eisenbindung hin. Um auszuschließen, dass die beobachtete Färbung der Elutionsfraktionen durch Verunreinigung mit eisenbindende *E. coli* Wirtsproteine hervorgerufen wurde, führte ich eine Gelfiltration mit den Elutionsfraktionen 1-6 durch. Der Verlauf der Gelfiltration ist in Abb. 27 zu sehen. Große Wirtsproteine eluieren bei 30-70 ml Elutionsvolumen, hingegen eluiert Kti11 bei ca 80- 90ml. Das Elutionsvolumen von 80-90ml entspricht den Fraktionen 34-39 (Abb. 28). Hierbei ist zu sehen, dass im Vergleich zur Nickel-NTA-Aufreinigung (Abb. 25) die Kontamination mit Wirtsproteinen signifikant abgenommen hat. Alle Kti11 enthaltenden Elutionsfraktionen zeigten auch nach der

Gelfiltration eine braune Färbung. Dies bestätigt unsere Vermutung einer Eisenbindung innerhalb des Proteins und sollte nun mit Hilfe von UV-Vis Spektroskopie (UV-sichtbares Licht; Wellenlängenbereich von 300-700nm) weiter geklärt werden.

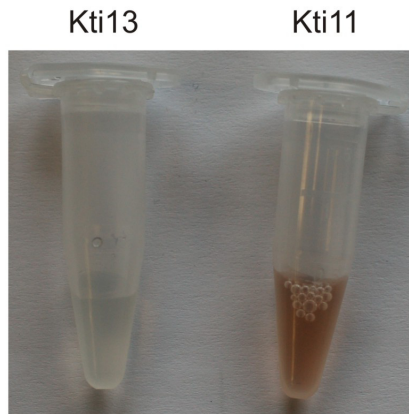


Abbildung 26: Gegenüberstellung von gereinigten Kti13 und Kti11.

Kti13 eluiert farblos von der Nickel-NTA Säule. Kti11 hingegen weist eine bräunliche Färbung auf.

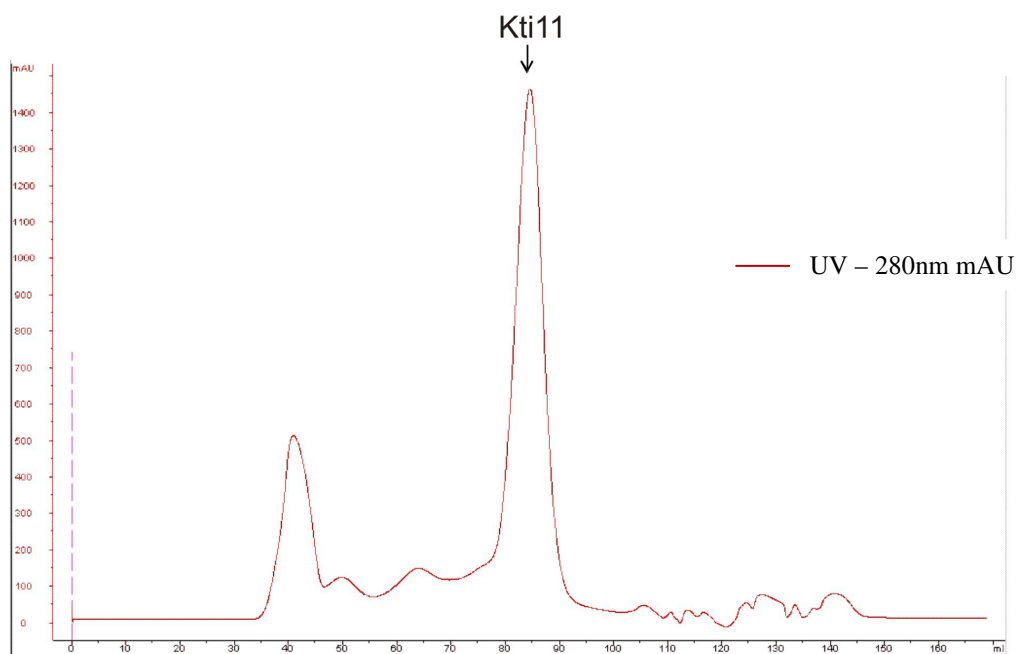


Abbildung 27: Gelfiltration von rekombinant gereinigtem Kti11-(His)₆.

Dargestellt ist das Elutionsprofil der Kti11-(His)₆ enthaltenden Fraktionen nach Nickel-NTA Affinitäts-Chromatographie auf einer Superdex 200 Säule. Der Peak bei 80-90 ml Elutionsvolumen entspricht Kti11.

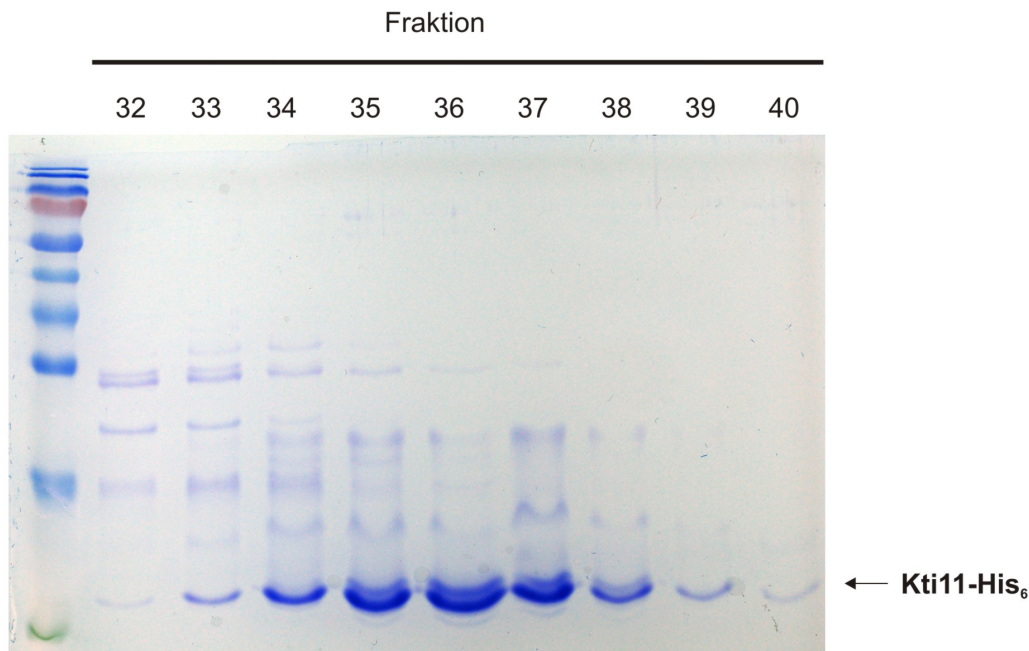


Abbildung 28: Analyse von rekombinant gereinigtem Kti11-(His)₆ nach Gelfiltration.

Links: Dargestellt sind die Elutionsfraktionen 32-40 der Gelfiltration auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel. Jeweils 10µl jeder 2ml Fraktion wurden pro Tasche geladen. Kti11-(His)₆ ist mit einem Pfeil markiert.

3.5.1 UV-Vis Spektrum von gereinigtem Kti11-(His)₆

Viele Eisenverbindungen besitzen die Eigenschaft, bei Licht bestimmter Wellenlängen zu absorbieren und ein charakteristisches Absorptionsspektrum zu generieren. Diese Eigenschaft sollte nun für die weitere Charakterisierung von Kti11 genutzt werden. Für rekombinant exprimiertes Kti11-(His)₆ wurde das Absorptionsspektrum von 300-700 nm aufgezeichnet (Abb. 29; oxidiert). Hierbei fallen zwei Absorptionsmaxima bei ca. 350 und 480 nm sowie eine flach abfallende Schulter bei 560-590 nm auf. Wir verglichen das Spektrum mit denen von eisenbindenden Proteinen und fanden Übereinstimmungen mit Absorptionsspektren von Rubredoxinen. Diese koordinieren mit Hilfe von 4 Cysteinen ein singuläres Eisenion, welches in zwei Redoxzuständen existieren kann (Fe^{2+} = reduziert; Fe^{3+} = oxidiert). Für Kti11 sollte nun überprüft werden, ob das Protein ebenfalls in verschiedenen Redoxzuständen vorliegen kann. Hierzu wurde der gereinigten Kti11-(His)₆ Proteinprobe unter anaeroben Bedingungen 1 mM der reduzierend wirkenden Substanz Natriumdithionit (DTH) zugesetzt. Ein sofortiger Farbumschlag von braun zu farblos war zu beobachten. Ein durchgeführter Wellenlängen-Scan von 300-700 nm konnte keine Absorptionsmaxima im Wellenlängenspektrum mehr aufzeigen (Abb. 29, reduziert). Dies deutet auf eine Reduktion des in Kti11 gebundenen Eisenions von Fe^{3+} zu Fe^{2+} hin. Nach Reoxidation mit

Luftsauerstoff erfolgte wiederum ein Farbumschlag nach braun und das typische Absorptionsspektrum von oxidierten Rubredoxinen wurde erneut sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die hier gezeigten Daten geben erste Hinweise für eine Eisenbindung von Kti11 aus *E. coli*. Als nächstes sollte die Frage adressiert werden, ob Cystein-Substitutionen einen Einfluss auf die Eisenbindung haben.

UV-Vis Spektrum von Kti11

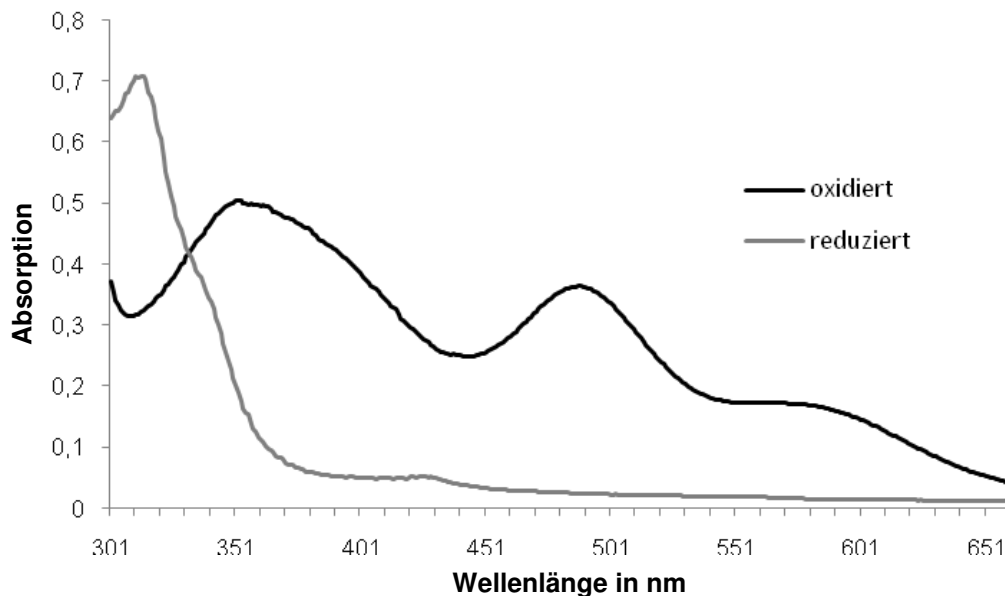


Abbildung 29: UV-Vis Absorptionsspektrum von rekombinant gereinigtem Kti11.

Dargestellt sind das UV-Vis Spektrum (300nm-700nm) von Kti11 unter oxidativen Bedingungen (schwarze Linie) und das UV-Vis Spektrum von Kti11 unter anaeroben Bedingungen nach Reduktion mit 1µm der reduzierenden Substanz DTH (graue Linie). Kti11 wurde in einer Konzentration von 10mg/ml eingesetzt.

3.5.2 Biochemische Charakterisierung von Cystein-Substitutionsmutationen

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss von Cystein-Substitutionen auf die Eisenbindung in Kti11 untersucht werden. Hierzu wurde mit Hilfe der Primermutagenese das jeweilige Cystein-Codon nach Serin substituiert. Die Lage der Cystein-Reste ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt.

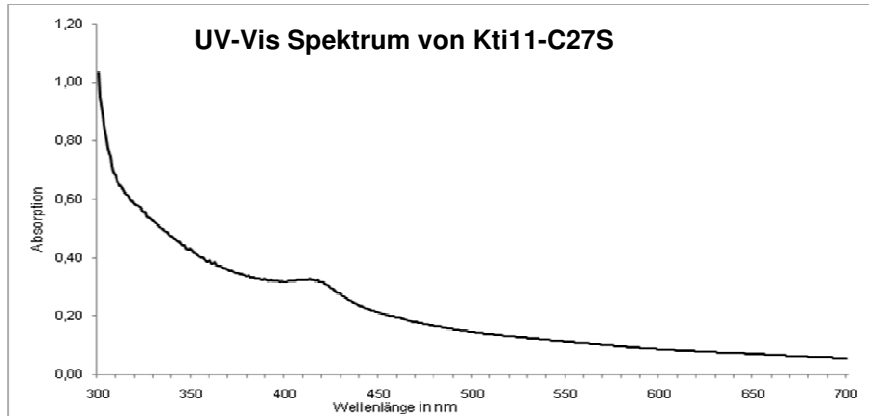


Abbildung 30: Schematische Darstellung von Kti11.

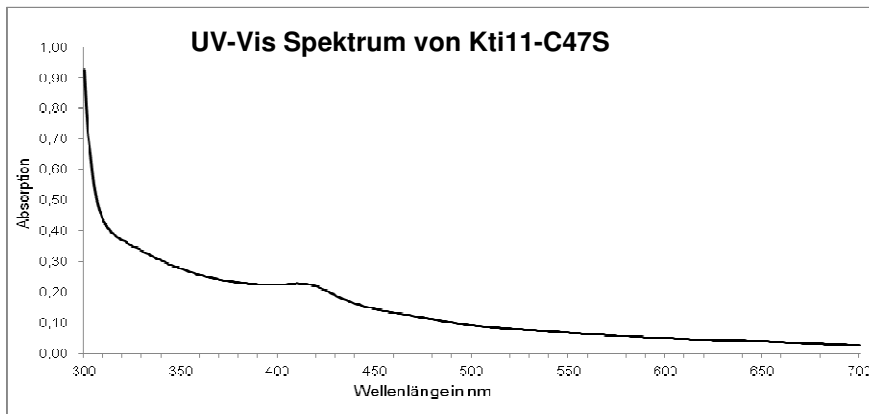
Eingezeichnet ist die ungefähre Lage der Zink/Eisen-Bindedomäne (orange). Dargestellt sind 4 konservierte Cystein-Reste, welche an der Koordinierung des Zink- oder Eisenions beteiligt sind.

Wie das Wildtyp-Gen wurden die mutierten *KTI11* Allele in den *E. coli* Expressionvektor pTrcHis2 (Invitrogen) kloniert (pRZ61=*KTI11-C27S*; pRZ62=*KTI11-C47S*; pRZ63=*KTI11-C50S*).

A



B



C

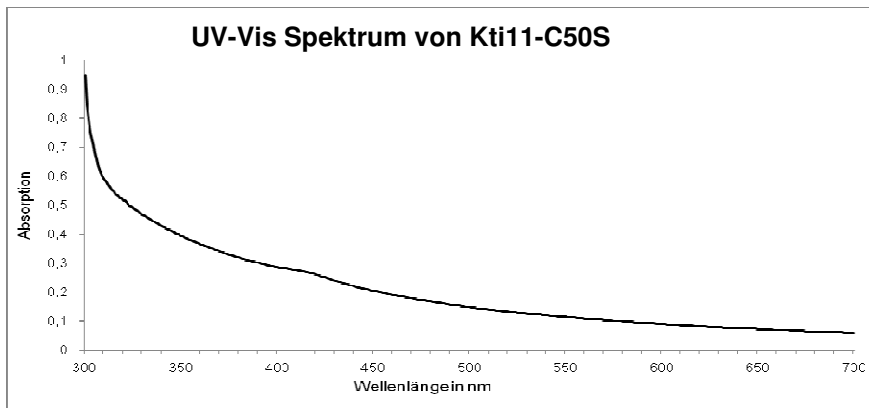


Abbildung 31: UV-Vis Absorptionsspektrum von rekombinant exprimierten Kti11-Varianten.

A: UV-Vis Spektrum von Kti11-C27S im Wellenlängenbereich von 300nm-700nm. **B:** UV-Vis Spektrum von Kti11-C47S im Wellenlängenbereich von 300nm-700nm. **C:** UV-Vis Spektrum von Kti11-C50S im Wellenlängenbereich von 300nm-700nm.

Die Proteinexpression erfolgte jeweils in einer 2 Liter *E. coli* Kultur (Expressionsstamm, Rosetta). Nach Ni-NTA Chromatographie wurden die Kti11 enthaltenden Eluate, welche alle keine auffällige Braunfärbung aufwiesen, vom enthaltenen Imidazol über eine

Entsalzungssäule (Sephadex G25 Säule) getrennt. Anschließend durchgeführte UV-Vis Experimente (UV-Visible; Absorption im Wellenlängenbereich von 300-700 nm) zeigten für die getesteten Varianten Kti11-C27S, Kti11-C47S und Kti11-C50S keine Kti11 charakteristischen Absorptionsmaxima bei 350 und 480 nm (Abb: 31), sodass eine Eisenbindung durch diese Mutationen wahrscheinlich verhindert wird (Abb: 31A, B, C).

3.5.3 Eisenbindung von Kti11 in Hefe

Um auszuschließen, dass die Fe-Bindung nur eine Eigenschaft des rekombinant exprimierten Kti11-(His)₆ ist, sollte das Protein aus Hefe gereinigt und die Eisenbindung mittels ⁵⁵Fe Markierung gemessen werden.

Die dazu erforderlichen Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Lill in Marburg durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde ein *kti11Δ* (RZY34) Stamm mit verschiedenen Epitop markierten, plasmidkodierten *KTI11* Allelen ($(HA)_3$ -*KTI11* (pRZ73), $(HA)_3$ -*kti11-C27S* (pRZ74) und $(HA)_3$ -*kti11-C50S* (pRZ75) transformiert und auf deren Erhalt selektiert. Transformanten wurden anschließend in Flüssigkultur in Anwesenheit von radioaktivem Eisen ⁵⁵Fe für 40 Stunden schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde eine Proteinextraktion durchgeführt und die epitopmarkierten Kti11-Varianten mittels Immunpräzipitation mit immobilisierten anti-HA-Antikörpern präzipitiert. Die Radioaktivität der Präzipitate wurde mittels Szintillationszähler ermittelt. Dabei ergab sich für Kti11 ein Wert, der achtfach über dem Hintergrund lag. Die gemessene Radioaktivität der Kti11 Varianten (C27S und C50S) befand sich im Bereich des Hintergrundes (Abb. 33). Somit bindet Kti11 anscheinend auch in Hefe Eisen. Diese Bindung wird durch Mutation einzelner Cystein-Reste verhindert.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob die gemessene Radioaktivität von einem singulären Eisenion stammt oder ob ein Eisen-Schwefel-Cluster in Kti11 gebunden vorliegt. Für diese Untersuchungen wurden Hefestämme verwendet, die es ermöglichen, den Eisen-Schwefel-Cluster Biosyntheseweg zu inhibieren (durchgeführt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Lill, Marburg). Kritisch dabei ist, dass nahezu alle hier involvierten Proteine essentiell sind. Blockiert man den Biosyntheseweg, so durchlaufen die Hefezellen drei bis vier weitere Zellteilungen, bevor sie arretieren. Diese kurze Phase ist ausreichend, um Veränderungen in der Eisenbindung von [Fe-S]-Cluster Proteinen bestimmen zu können. Für die durchzuführenden Experimente wurde das Plasmid pRZ73 ($(HA)_3$ -*KTI11*) in die Stämme GAL-NFS1 und GAL-NAR1 transformiert (Mühlenhoff et al., 2004; Balk et al., 2004). Das Gen *NFS1* (Cystein Desulfurase, hauptsächlich mitochondrial lokalisiert) oder *NAR1* (Komponente der cytoplasmatischen [Fe-S] Maschenerie) befinden sich in diesen Stämmen unter der Kontrolle des regulierbaren *GAL1* Promoters. Damit sind diese Gene unter reprimierenden Bedingungen (Glukose) transkriptionell herunterreguliert (Daten nicht

gezeigt). Wie in Abbildung 32 (rechts) sichtbar wird, verändert sich die Menge an gebundenen ^{55}Fe in den $(\text{HA})_3\text{-Kti11}$ Präzipitaten unter Glukose-Repression nicht. Somit kann eine [Fe-S]-Cluster Bindung in Kti11 ausgeschlossen werden. Schlussendlich kann festgehalten werden, dass Kti11 ein einzelnes Eisenion koordiniert.

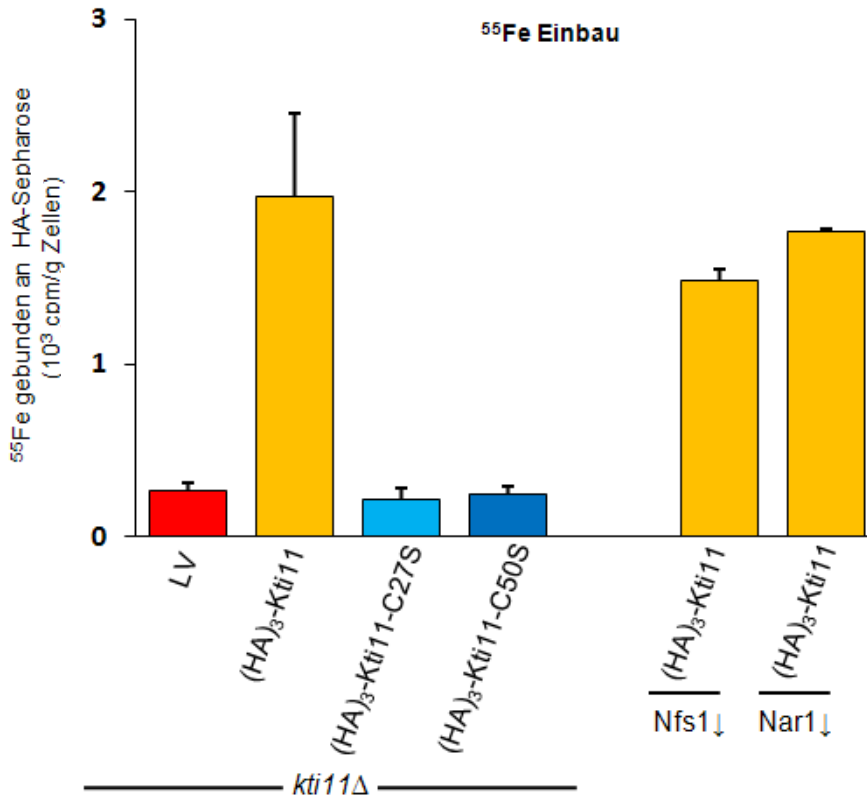


Abbildung 32: Eisenbindung von Wildtyp-Kti11 und mutierten Varianten in Hefe.

Links: Ein *kti11* Δ -Stamm (RZY34) wurde mit einem HA-Epitop-markierten $(\text{HA})_3\text{-KTI11}$ -Wildtypallel (*pRZ73*), LV (Leervektor; *YCplac112*), $(\text{HA})_3\text{-Kti11-C27S}$ (*pRZ74*) oder $(\text{HA})_3\text{-Kti11-C50S}$ (*pRZ75*) transformiert. Die Stämme wuchsen für 40 Stunden in SC Medium in Anwesenheit von radioaktiv markierten ^{55}Fe . Die anschließend durchgeführte Immunfällung mit anti-HA-Antikörpern präzipitierte die Epitopmarkierten Kti11-Varianten. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillationszähler bestimmt.

Rechts: Die Messung wurde entweder in einem *P_{GAL1}-NFS1* oder *P_{GAL1}-NAR1* Stammhintergrund durchgeführt. Die Stämme wurden für 24 h in SC Galaktose Medium in Anwesenheit von ^{55}Fe angezogen und wurden anschließend für 16 h in glukosehaltiges Minimalmedium überführt. $(\text{HA})_3\text{-Kti11}$ wurde anschließend durch Immunpräzipitation gefällt und die Radioaktivität mittels Szintillationszähler bestimmt.

3.5.4 Phänotypische Charakterisierung der Cystein-Substitutionsmutanten

Im folgenden Abschnitt sollte der Einfluss der Cystein nach Serin Mutationen auf die Kti11 Protein Funktionen untersucht werden. Dazu wurden die ORFs der durch Primermutagenese

hergestellten Cystein-Codon nach Serin Mutanten *KTI11-C27S* (pRZ61), *KTI11-C47S* (pRZ62) und *KTI11-C50S* (pRZ63) per PCR amplifiziert und in das Plasmid pRZ48 (P_{GAL1} - $(HA)_3$) subkloniert. Hierdurch befinden sich die mutagenisierten Allele unter der Kontrolle des *GAL1*-Promoters und werden HA-Epitop-markiert exprimiert ($pGAL1$ - $(HA)_3$ -*KTI11-C27S*=pRZ64; $pGAL1$ - $(HA)_3$ -*KTI11-C47S*=pRZ65; $pGAL1$ - $(HA)_3$ -*KTI11-C50S*=pRZ66). Die *KTI11-C25S* Substitution wurde mit Hilfe der Primermutagenese neu synthetisiert und ebenfalls in das Plasmid pRZ48 kloniert ($pGAL1$ - $(HA)_3$ -*KTI11-C25S*=pRZ67). Die Mutanten werden nachfolgend als *C25S*, *C27S*, *C47S* und *C50S* bezeichnet. Als erstes wurde das Verhalten der Mutanten auf intrazellulär exprimiertes γ -Toxin getestet. Ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) wurde mit dem Vektor pHMS14 (γ -Toxin) und jeweils mit einem der folgenden Plasmide ko-transformiert: pRZ45 (*KTI11*), Leervektor (LV; YCplac111), pRZ67 (*C25S*), pRZ64 (*C27S*), pRZ65 (*C47S*) und pRZ66 (*C50S*). Eine Selektion für den Erhalt der Plasmide erfolgte auf Minimalmedium (His^- , Leu^-). Die Plasmid-tragenden Stämme wurden in einer seriellen Zellverdünnung auf glukose- (γ -Tox^{aus}) und galaktose- (γ -Tox^{an}) haltige Minimalmediums-Platten getüpfelt.

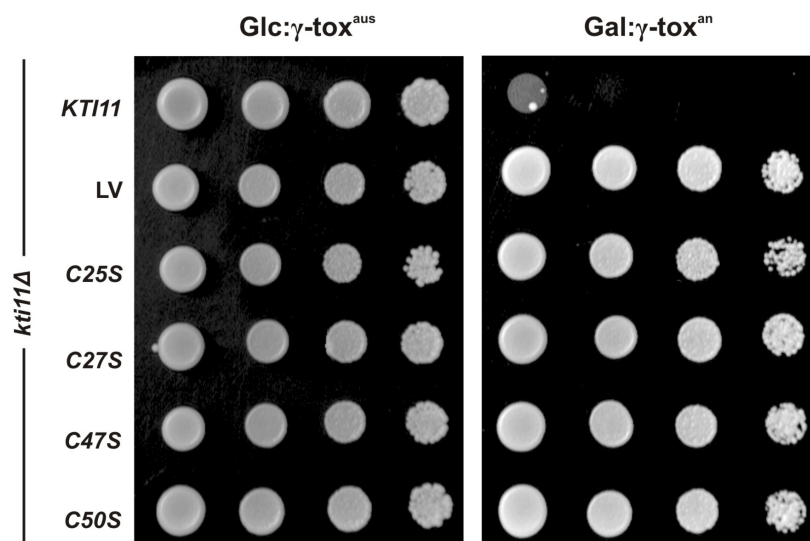


Abbildung 33: γ -Toxin-Test verschiedener *kti11* C:S Substitutions-Mutanten im *kti11* Δ

Hintergrund.

Ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), Leervektor (LV, YCpLac111), *C25S* (pRZ67), *C27S* (pRZ64), *C47S* (pRZ65) oder *C50S* (pRZ66) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promoters) ko-transformiert. *KTI11* ist Toxin-sensitiv. LV (Leervektor), *C25S*, *C27S*, *C47S* und *C50S* sind Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltigen (reprimierend) und 2% galaktose-haltigen (induzierend) Minimalmedium getropft Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

In Abb. 33 wird deutlich, dass keine der Cystein nach Serin Mutanten γ -Toxin Sensitivität vergleichbar dem Wildtyp (*KTI11*) ausprägt. Alle Allele sind phänotypisch nicht von einer *kti11* Disruption (LV) zu unterscheiden. Werden die Allele jedoch in den isogenen Wildtypstamm (W303) transformiert, so sind *C25S*, *C27S* und *C47S* Toxin-resistent und

zeigen einen dominant negativen Phänotyp (Abb. 34). *C50S* hingegen reagiert mit einem Wildtyp-ähnlichen Wachstumsarrest auf Galaktose-haltigen Platten und stellt damit eine rezessive Mutation dar.

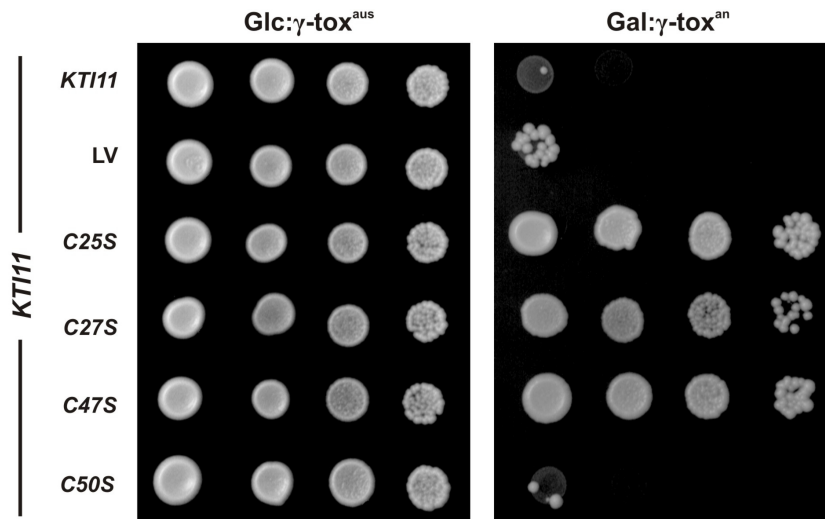


Abbildung 34: γ -Toxin-Test verschiedener *kti11* C:S Substitutions-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund.

Ein Wildtypstamm (W303) wurde mit einem *KTI11* Allel (pRZ45) Leervektor (LV, YCplac111), *C25S* (pRZ67), *C27S* (pRZ64), *C47S* (pRZ65) oder *C50S* (pRZ66) und pHMS14 ko-transformiert. Der Leervektor transformierte Stamm und *C50S* sind Toxin-sensitiv. *C25S*, *C27S* und *C47S* sind Toxin resistent und zeigen einen dominant negativen Phänotyp. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltigen (reprimierend) und 2% galaktose-haltigen (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

Es stellte sich die Frage, ob eine erhöhte intrazelluläre *KTI11* Kopienzahl den dominant negativen Effekt eines *C27S* Allels supprimieren kann. Hierdurch könnten Rückschlüsse auf eine Konkurrenz der Allele zueinander gezogen werden. Für diesen Test wurde ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) mit dem γ -Toxin Vektor pHMS14 und jeweils den Plasmiden *C27S* (pRZ64) + *KTI11* (pCB12; *cen*), *C27S* (pRZ64) + *KTI11* (pCB27, 2 μ) und LV (YCplac111) + *KTI11* (pCB27, 2 μ) ko-transformiert. *KTI11*(*oe*) befindet sich auf einem YEplac195-Derivat und steht unter der Kontrolle seines nativen Promoters. Da es sich um ein 2 *micron* (2 μ) Plasmid handelt (autonome Replikation), liegen zahlreiche *KTI11* Kopien in der Zelle vor (überexprimiert). Interessanterweise führt eine *KTI11* Überexpression in einem *C27*-Allel tragenden Stamm (*C27S* + *KTI11*(*oe*)) zu einer abgeschwächten Toxin-Resistenz (Abb. 35). Der *C27S* + *KTI11* tragende Stamm ist hingegen vollständig resistent (keine *KTI11* Überexpression). Der Kontrollstamm LV (YCplac111) + *KTI11*(*oe*) prägt Toxin Sensitivität aus, sodass ein Einfluss des 2 μ -Plasmids ausgeschlossen werden kann. Damit scheinen beide Allele (*C27S* und *KTI11*) in Konkurrenz zueinander zu stehen.

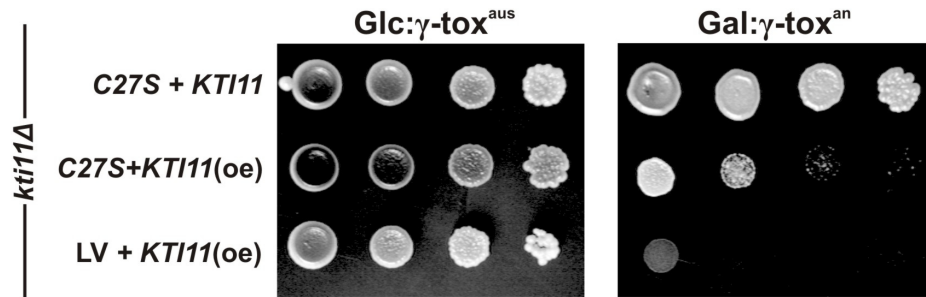


Abbildung 35: Suppression der C27S Dominanz durch *KTI11* Überexpression im γ -Toxin-Test.

Ein *kti11* Δ -Stamm (RZ33) wurde mit *C27S* (pRZ64) + *KTI11* (pCB12, *cen*), *C27S* (pRZ64) + *KTI11(oe)* überexprimiert (pCB27) oder Leervektor (LV; YCplac111) + *KTI11(oe)* (pCB27) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *C27S* + *KTI11* ist Toxin-resistent (dominant negativ). *C27S* + *KTI11(oe)* zeigt partielle Toxin Resistenz, Leervektor (LV) + *KTI11(oe)* resultiert in Toxin Sensitivität. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltiges (reprimierend) und 2% galaktose-haltiges (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

Analog zu den durchgeführten γ -Toxin Tests wurden die mutierten Allele auf ihre Funktionalität in der Diphthamid-Biosynthese durch Expression des Diphtherie-Toxins (DT) untersucht. Als erstes wurde ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) mit dem Diphtherie-Toxin kodierenden Vektor *plym101* und jeweils den Plasmiden pRZ45 (*KTI11*), pRZ67 (*C25S*), pRZ64 (*C27S*), pRZ65 (*C47S*) oder pRZ66 (*C50S*) ko-transformiert. Als Wachstumskontrolle wurde ein Leervektor (LV, YCplac111) und *plym101* transformierter *kti11* Δ -Stamm verwendet. Getüpfelt wurde auf glukose-(DT^{aus}) und galaktose-(DT^{an}) haltige Minimalmediums-Platten. Alle getesteten *KTI11* Varianten prägen DT-Resistenz aus und ähneln damit phänotypisch einem *kti11* Δ -Stamm (LV). Die Sensitivitätskontrolle (*KTI11*) ist im Wachstum gehemmt (Abb. 36).

Die mutagenisierten *KTI11* Allele wurden ebenfalls im isogenen Wildtypintergrund auf ihr Verhalten gegenüber dem Diphtherie-Toxin untersucht. Hierzu wurde ein Wildtypstamm (W303) mit den mutierten *KTI11* Allelen zusammen mit dem Diphtherie-Toxin Vektor *plym101* ko-transformiert. Nach 3 tägiger Inkubation zeigte sich ein Wachstumsarrest der Stämme, die mit den mutierten *KTI11* Allelen transformiert wurden (Abb. 37). Der verwendete Kontrollstamm (*kti11* Δ + LV) ist auf Galaktose durch DT-Toxin Induktion nicht arretierbar. Somit kann resümiert werden, dass alle Cystein Varianten rezessive „*loss-of-function*“ Allele in der Diphthamid Biosynthese darstellen.

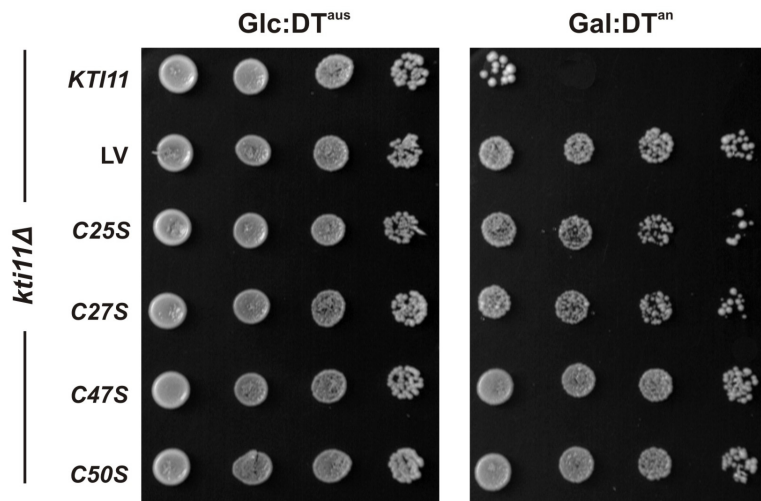


Abbildung 36: DT-Test verschiedener *kti11* C:S Substitutions-Mutanten im *kti11*Δ Hintergrund.

Ein *kti11*Δ-Stamm (RZY33) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), LV (Leervektor, YCplac111), *C25S* (pRZ67), *C27S* (pRZ64), *C47S* (pRZ65) oder *C50S* (pRZ66) und *plym101* (DT-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *KTI11* ist Toxin-sensitiv. LV (Leervektor), *C25S*, *C27S*, *C47S* und *C50S* sind Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukosehaltiges (reprimierend) und 2% galaktosehaltiges (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

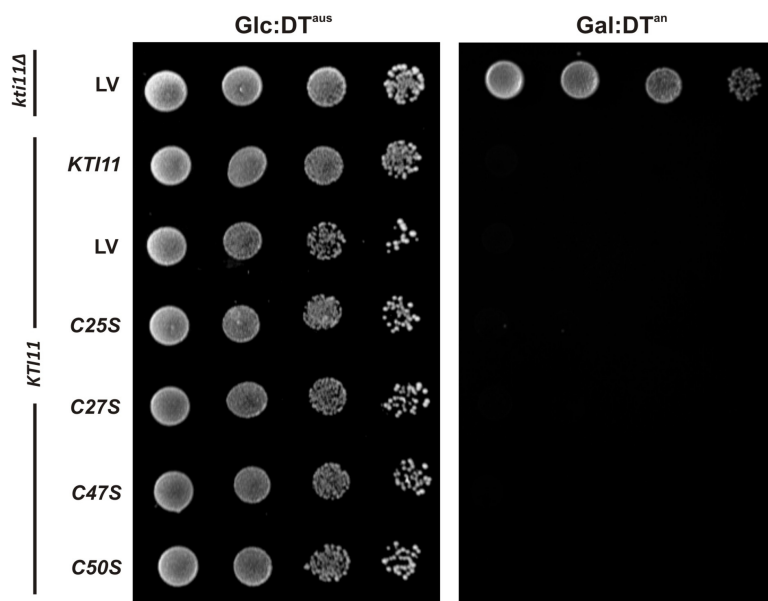


Abbildung 37: DT-Test verschiedener *kti11* C:S Substitutions-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund.

Ein Wildtypstamm-Stamm (W303) wurde mit *KTI11* (pRZ45), einem Leervektor (LV, YCplac111), *C25S* (pRZ67), *C27S* (pRZ64), *C47S* (pRZ64) oder *C50S* (pRZ66) und *plym101* ko-transformiert. Als Wachstumskontrolle diente ein Leervektor (LV; YCplac111) transformierter *kti11*Δ-Stamm (RZY33). Alle getesteten Stämme (*KTI11*, LV, *C25S*, *C27S*, *C47S* und *C50S*) sind im Wildtypstamm (W303) Toxin-sensitiv. Der Leervektor (LV) transformierte *kti11*Δ-Stamm ist erwartungsgemäß D-Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukosehaltiges (reprimierend) und 2% galaktosehaltiges (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

3.5.5 Interaktionsstudien der Cystein-Mutanten mit Elp3, Dph1 und Kti13

Die phänotypisch charakterisierten *KTI11* Allele sollten nun auf ihre Interaktionsfähigkeit mit den bekannten Kti11 Interaktoren Elp3, Kti13 und Dph1 überprüft werden. Für die durchzuführenden Ko-Immunpräzitationsstudien wurden die Stämme RZY52 (*DPH1-c-myc*), RZY06 (*KTI13-c-myc*) und FFY3t (*ELP3-c-myc*) jeweils mit den Plasmiden pRZ64 ((*HA*)₃-*C27S*), pRZ65 ((*HA*)₃-*C47S*), pRZ66 ((*HA*)₃-*C50S*) und pRZ45 ((*HA*)₃-*KTI11*) transformiert. Interaktionsstudien mit der Kti11 Proteinvariante C25S wurden nicht durchgeführt, da sich das Allel phänotypisch nicht von C27S oder C47S Mutationen unterscheidet.

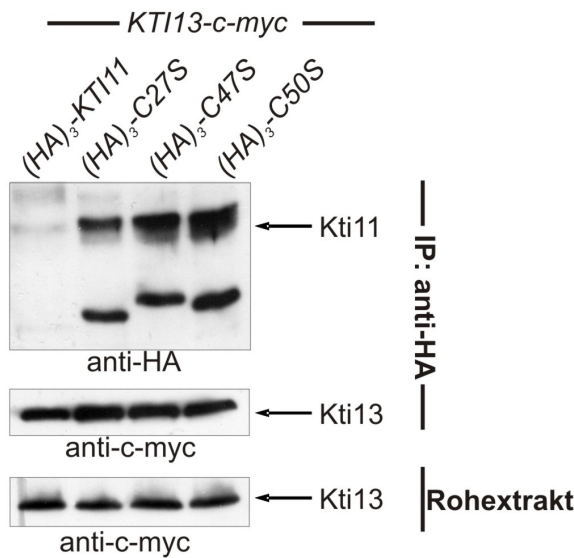


Abbildung 38: Cystein-Mutationen in Kti11 beeinflussen nicht die Kti13 Interaktion.

Ko-Immunpräzitation von Kti13 mit Kti11 und mutierten Kti11 Cystein:Serin Varianten. Der *Kti13-c-myc* exprimierende Stamm RZY06 wurde jeweils mit den Plasmiden pRZ45 ((*HA*)₃-*KTI11*), pRZ64 ((*HA*)₃-*C27S*), pRZ65 ((*HA*)₃-*C47S*) oder pRZ66 ((*HA*)₃-*C50S*) transformiert und für die Ko-Immunpräzitationen eingesetzt. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Immunpräzitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (*Kti13*) und Anti-HA-AK (*Kti11* und *Kti11*-Varianten) detektiert. *Kti13-c-myc* wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc Antikörpern nachgewiesen.

Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten Ko-Immunpräzitation der Kti11 Varianten mit Kti13 sind in Abb. 38, dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Kti11-Varianten (C27S, C47S und C50S) in der Lage sind, mit Kti13 zu interagieren. Die detektierten Signale sind dabei vergleichbar der Interaktionen zwischen dem Kti11 Wildtyp-Protein und Kti13 (Abb. 38). Somit haben Mutationen in Cysteinen der Zink/Eisen-Bindedomäne von Kti11 keinen Einfluss auf die Kti13 Interaktion. Bemerkenswert ist das unterschiedliche Laufverhalten der Cystein nach Serin Proteinvarianten im SDS-Gel (Abb. 38). Dieses unterschiedliche Laufverhalten könnte durch Ausbildung unterschiedlicher Disulfidbrücken (trotz

reduzierender Bedingungen in der SDS-PAGE) innerhalb der Cystein-Varianten erklärbar sein.

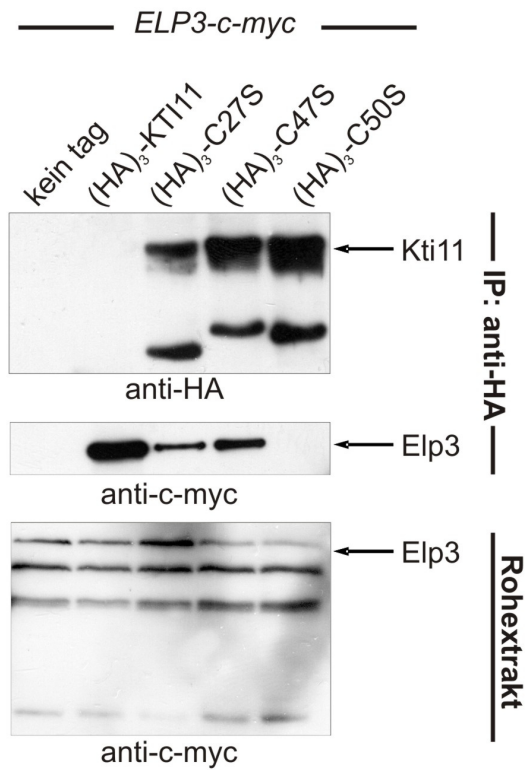


Abbildung 39: Cystein-Mutationen in Kti11 beeinflussen Elp3 Interaktion.

Ko-Immunpräzipitation von Elp3 mit Kti11 und mutierten Kti11 Cystein:Serin Varianten. Der Elp3-c-myc exprimierende Stamm FFY3t wurde jeweils mit den Plasmiden pRZ45 ($(HA)_3$ -KTI11), pRZ64 ($(HA)_3$ -C27S), pRZ65 ($(HA)_3$ -C47S) oder pRZ66 ($(HA)_3$ -C50S) transformiert und für die Ko-Immunpräzipitationen eingesetzt. Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Elp3) und Anti-HA-AK (Kti11 und Kti11-Varianten) detektiert. Elp3-c-myc wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc Antikörpern nachgewiesen.

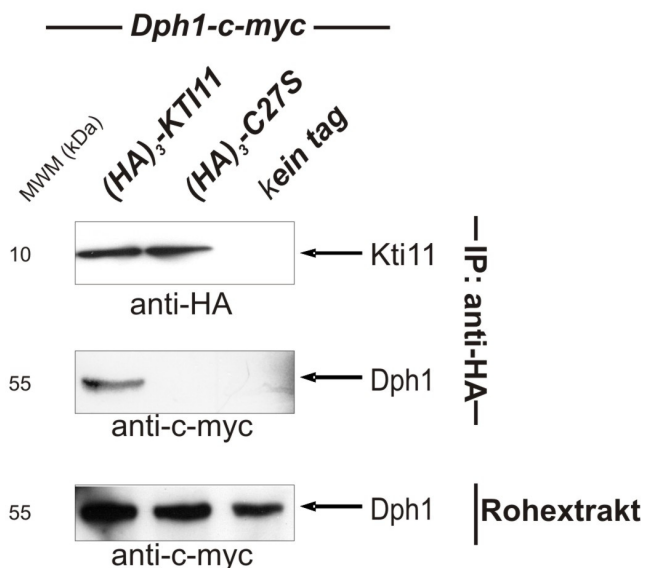


Abbildung 40: C27S Mutation in Kti11 verhindert die Dph1 Interaktion.

Ko-Immunpräzipitation von Dph1 mit Kti11 und der mutierten Kti11 C27S Variant. Der Dph1-c-myc exprimierende Stamm RZY52 wurde jeweils mit den Plasmiden pRZ45 ($(HA)_3$ -KTI11) und pRZ64 ($(HA)_3$ -C27S) transformiert und für die Ko-Immunpräzipitationen eingesetzt. Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Dph1) und Anti-HA-AK (Kti11 und Kti11-Variant C27S) detektiert. Dph1-c-myc wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc Antikörpern nachgewiesen.

Das Kti11 Wildtyp-Protein ist im anti-HA Western Blot als schwache Bande sichtbar. Hingegen scheint eine Cystein-Mutation möglicherweise die Proteinstabilität zu erhöhen, da diese Proteinvarianten starke Signale im anti-HA Western-Blot erzeugten (Abb. 38). Denkbar wäre, dass Kti11 durch Zugabe des SDS-Ladepuffers und des folgenden Denaturierungsschrittes bei 95°C destabilisiert wird. Da Kti11 Kti13-c-myc ko-präzipitieren konnte, muss Kti11 während des Präzipitationsexperimentes als intaktes Protein an der immobilisierten anti-HA Sepharose gebunden vorliegen haben. Da die Destabilisierung nur für das Wildtyp-Protein beobachtet wurde, ist eine Metallion-abhängige Destabilisierung während der Denaturierung der Proteinproben denkbar.

Die Interaktionsstudien der Kti11 Varianten mit der enzymatischen aktiven Untereinheit Elp3 des Elongator-Komplexes wurden in dem Stamm FFY3t durchgeführt. Dieser kodiert für ein C-terminal c-myc markiertes Elp3 Protein (FFY3t). In diesen Stamm wurden die bereits zuvor verwendeten HA-Epitop-markierten *KTI11*-Allele (pRZ45=*KTI11*; pRZ64=*C27S*; pRZ65=*C47S* und pRZ66=*C50S*) transformiert. Die Genprodukte der dominant-negativen Allele (*C27S* und *C47S*) sind zur Protein Interaktion mit Elp3 fähig (Abb. 39). Für *C50S* hingegen konnte keine physikalische Interaktion mit Elp3 detektiert werden (Abb. 39).

Im Gegensatz zur intakten Elp3 Wechselwirkung hatte *C27S* die Interaktionsfähigkeit mit dem Diphthamidbiosynthese-Protein Dph1 verloren (Abb. 40). Dadurch könnte der rezessive Phänotyp im Diphtherie-Toxin-Assay erklärt werden. Für diese Ko-Immünpräzipitation wurde der Dph1-c-myc tragende Stamm RZY52 mit den Plasmiden pRZ45 (*(HA)₃-KTI11*) oder pRZ64 (*(HA)₃-C27S*) transformiert und für die Experimente eingesetzt.

Die erhaltenen phänotypischen und biophysikalischen Daten der *KTI11* Allele sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der phänotypischen und biophysikalischen Daten der mutierten *KTI11* Cystein nach Serin Varianten.

n. g. = nicht getestet; + = Interaktion nachweisbar; - = Interaktion nicht nachweisbar

Allel	Phänotypisierung		Proteininteraktion		
	γ -Tox	D-Tox	Elp3	Kti13	Dph1
<i>KTI11</i>	sensitiv	sensitiv	+	+	+
<i>kti11-C25S</i>	dominant; resistent	rezessiv; resistent	+	+	n. g.
<i>kti11-C27S</i>	dominant; resistent	rezessiv; resistent	+	+	-
<i>kti11-C47S</i>	dominant; resistent	rezessiv; resistent	+	+	n. g.
<i>kti11-C50S</i>	rezessiv; resistent	rezessiv; resistent	-	+	n. g.

3.5.6 Verlust des dominant negativen-Phänotyps durch Kti11 Verkürzung

Bär et al. konnten 2008 zeigen, dass eine C-Terminale Kti11 Verkürzung ($\Delta 15$ Aminosäuren) zur Resistenz gegenüber dem *K. lactis* Zymocin führt (Allel: *kti11-1*; Glu67::Stopp). Durchgeführte Ko-Immunitätspräzipitationen offenbarten, dass die Elongator-Bindung in Kti11-1 gestört ist. Interessanterweise ist die Sensitivität einer Zielzelle gegenüber dem Diphtherie Toxin durch *kti11-1* Mutation nicht beeinflusst. Dementsprechend vermuten die Autoren, dass der Verlust der Elongator-Interaktion womöglich die Zymocin Resistenz hervorrufen könnte.

Wir kombinierten die rezessive Mutation von *kti11-1* mit der dominanten Mutation in *KT11-C27S* (daraus ergibt sich die Allel-Bezeichnung *C27S-11-1*) mittels Primermutagenese um zu überprüfen, ob ein Verlust der Elp3 Interaktion den dominanten Effekt der Aminosäuresubstitution C:S supprimiert. *C27S-11-1* wurde in das Plasmid pRZ48 (*pGAL1-(HA)₃*) kloniert (pRZ77) und zusammen mit dem γ -Toxin kodierenden Vektor pHMS14 sowohl in einen Wildtypstamm (W303) als auch in einen *kti11* Disruptionsstamm (RZ33) transformiert. Als Kontrollen wurden pRZ76 (*kti11-1*), pRZ45 (*KT11*) und der Leervektor (LV, YCplac111) zusammen mit pHMS14 ebenfalls in die zuvor genannten Stämme transformiert. Nach drei-tägiger Inkubation auf Galaktose zeigte sich, dass der *kti11* Δ Stamm, transformiert mit *kti11-1*, *C27S-11-1* und Leervektor, γ -Toxin resistent war, während *KT11* erwartungsgemäß Sensitivität vermittelte (Abb. 41).

Der analog durchgeführte γ -Toxin-Assay im Wildtyp-Hintergrund zeigte, dass *C27S-11-1* auf galaktose-haltigen Platten im Wachstum gehemmt wird und damit Toxin-sensitiv ist (Abb. 42). Das dominant-negative Allel *C27S* ist wie zu erwarten Toxin-resistent, während die Anwesenheit des Leervektors (LV) oder des *kti11-1* Allels keinen Einfluss auf den γ -Toxin induzierten Wachstumsarrest nehmen. Dies bedeutet, dass der beobachtete dominant-negative Phänotyp einer *C27S*-Substitution durch c-terminale Verkürzung von Kti11 unterdrückt werden kann.

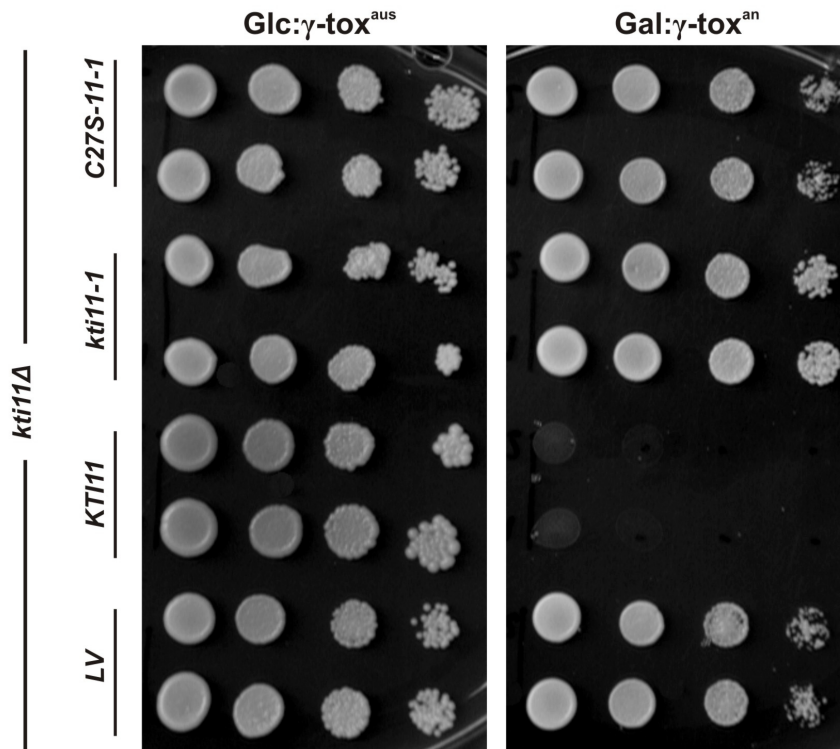


Abbildung 41: γ -Toxin-Test verkürzter *kti11* Mutanten im *kti11* Δ Hintergrund.

Ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), Leervektor (LV; YCplac111), *kti11-1* (pRZ76) oder *C27S-11-1* (pRZ77) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *KTI11* ist Toxin-sensitiv. LV (Leervektor), *kti11-1*, und *C27S-11-1* sind Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltiges (reprimierend) und 2% galaktose-haltiges (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30° C inkubiert.

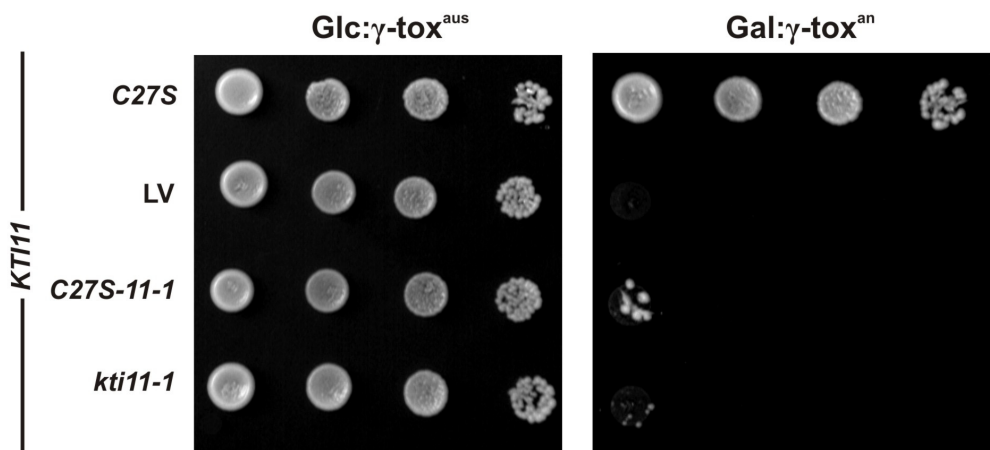


Abbildung 42: γ -Toxin-Test verkürzter *kti11* Allele im Wildtyp-Hintergrund.

Ein Wildtypstamm (W303) wurde mit einem Leervektor (LV; YCplac111), *kti11-1* (pRZ76); *C27S-11-1* (pRZ77) oder *C27S* (pRZ64) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *C27S* ist Toxin-resistent. Leervektor, *kti11-1*, und *C27S-11-1* sind Toxin sensitiv. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltiges (reprimierend) und 2% galaktose-haltiges (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30° C inkubiert

Durch Interaktionsstudien wurde bestätigt, dass die Proteinvariante C27S-11-1 wie Kti11-1 eine gestörte Elp3 Bindung aufweist. Dies ist in Abb. 43 zu erkennen. Die mit immobilisierten anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-Immunpräzipitationen zeigen (Stamm FFY3t [Elp3-c-myc] transformiert mit pRZ45=(HA)₃-KTI11; pRZ76=(HA)₃-kti11-1 und pRZ77=(HA)₃-C27S-11-1), dass Kti11 mit der Elongator-Untereinheit 3 wechselwirkt. Erwartungsgemäß konnte zwischen (HA)₃-Kti11-1 und Elp3-c-myc keine Interaktion nachgewiesen werden. Die fehlende Protein-Wechselwirkung zwischen (HA)₃-C27S-11-1 und Elp3-c-myc (Abb. 43) bestätigt somit unsere Hypothese, dass ein dominant-negativer Phänotyp im γ -Toxin-Assay einer intakten Kti11-Elongator-Interaktion bedarf.

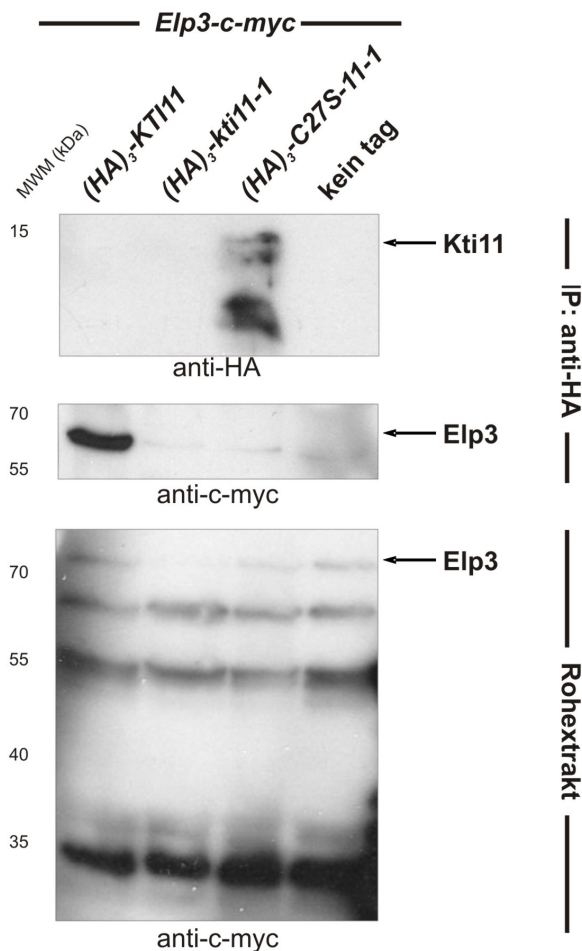


Abbildung 43: Eine C-terminale Kti11 Verkürzung beeinflusst die Elp3-Interaktion.

Ko-Immunpräzipitation von verkürzten Kti11-Varianten mit Elp3. Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt von (HA)₃-Kti11, (HA)₃-Kti11-1, und (HA)₃-C27S-11-1 exprimierenden Zellen, welche das entsprechende myc-Epitop markierte Elp3 Protein exprimieren, eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Elp3) und Anti-HA-AK (Kti11 und Kti11-Varianten) analysiert. Elp3 wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc Antikörpern nachgewiesen

3.5.7 Dominant-negativer Phänotyp durch Cystein-Substitution in AtKti11

Im Folgenden wollten wir klären, ob Cystein-Mutationen im pflanzlichen *KTI11* Homolog ebenfalls einen dominant negativen Effekt zeigen. Dafür wurde eine der C27S Mutation entsprechende Cystein-Austauschmutante in *AtKTI11* eingefügt (das entsprechende Cystein im pflanzlichen Homolog ist C26) und in das Plasmid pRZ45 (*pGAL1*-(HA)₃) kloniert (pRZ79). Das Allel wird im Weiteren als *AtC26S* bezeichnet. Die Vorgehensweise ist analog zu 3.5.4.

AtC26S wurde im γ -Toxin-Test untersucht. *C27S* (pRZ64), *AtC26S* (pRZ79) und *KTI11* (pRZ45) kodierende Plasmide wurde jeweils in einen *kti11* Δ -(RZY33) und Wildtyp-Stamm (W303) zusammen mit pHMS14 transformiert und auf galaktose- bzw glukose-haltiges Minimalmedium getropft. *C27S*, *AtC26S* und der Leervektor (LV) transformierte *kti11* Δ -Stamm sind Toxin resistent (Abb. 44). Ein *KTI11*-Allel führt erwartungsgemäß zum Wachstumsarrest (Abb. 44). Das Genprodukt von *AtC26S* ist demnach nicht funktionell.

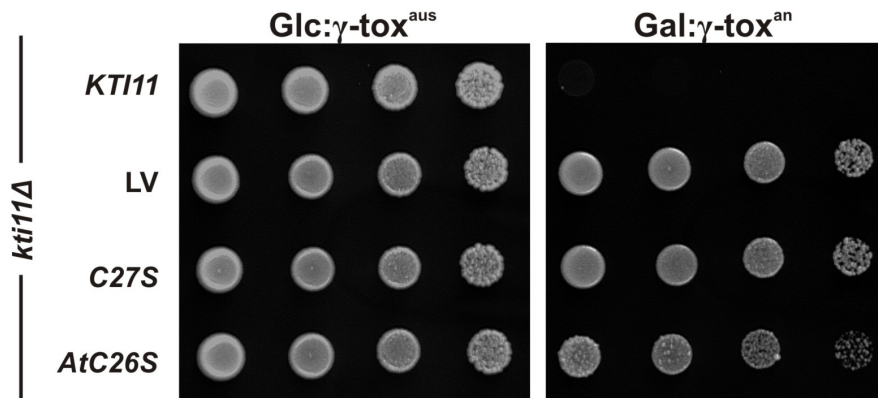


Abbildung 44: γ -Toxin-Test von *C27S* und *AtC26S* im *kti11* Δ -Hintergrund.

Ein *kti11* Δ -Stamm (pRZ33) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), Leervektor (LV, YCplac111), *C27S* (pRZ64) oder *AtC26S* (pRZ79) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *KTI11* ist Toxin-sensitiv. *C27S* und *AtC26S* sind Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltigen (reprimierend) und 2% galaktose-haltigen (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

In Abbildung 45 wurden die Allele im Wildtyp-Hintergrund analysiert. Dieser Test ergab, dass *AtC26S* vergleichbar dem Hefeallel *C27S*, trotz Anwesenheit des *KTI11* Gens, Toxin-Resistenz ausprägt. Damit zeigen beide Cystein Substitutionsmutanten einen dominant negativen Effekt.

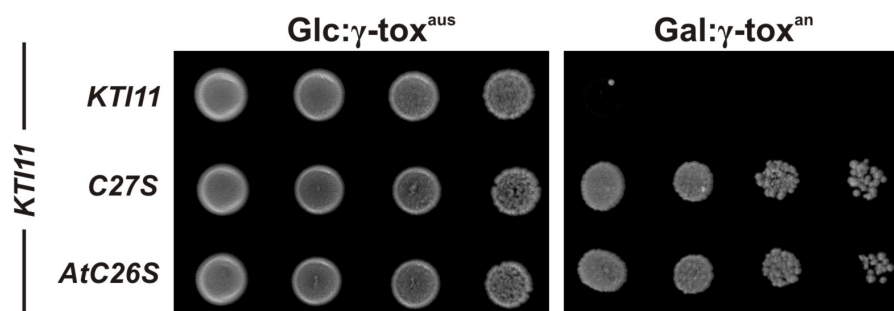


Abbildung 45: γ -Toxin-Test von *C27S* und *AtC26S* im Wildtyp-Hintergrund.

Ein *kti11* Δ -Stamm (RZY33) wurde mit einem *KTI11*-Wildtypallel (pRZ45), *C27S* (pRZ64) oder *AtC26S* (pRZ79) und pHMS14 (γ -Toxin-Gen unter Kontrolle eines *GAL1*-Promotors) ko-transformiert. *KTI11* ist Toxin-sensitiv. *C27S* und *AtC26S* sind Toxin resistent. Serielle Zellverdünnungen wurde jeweils auf 2% glukose-haltigen (reprimierend) und 2% galaktose-haltigen (induzierend) Minimalmedium getropft. Die Zellen wuchsen 3 Tage bei 30° C.

3.6 Interaktionsstudien von Kti11 mit mutierten Elp3 Varianten

Elp3 stellt die hoch konservierte (von Archaea bis Mensch) katalytische Untereinheit des Elongator-Komplexes dar (Wittschieben et al. 1999). Sowohl Sequenzanalysen als auch experimentelle Ansätze identifizierten in Elp3 eine Histonacetyltransferase- sowie eine Radikal-SAM Domäne (Wittschieben et al., 1999; Sofia et al., 2001; Paraskevopoulou et al., 2006, Onuma, Doktorarbeit 2011). Eine Acetylierung aller 4 Histone konnte für Elp3 *in vitro* nachgewiesen werden (Wittschieben et al., 1999). Für das Elp3 Homolog aus Archaea wurde gezeigt, dass es ein Eisen-Schwefel-Cluster (mit Hilfe seines Adomet-Motivs) binden und S-Adenosyl-Methionin (SAM) spalten kann (Paraskevoulou et al., 2006). Hierbei entsteht typischerweise ein hoch-reaktives 5-Deoxyadenosyl-Radikal mit dem Bindungen aufgebrochen werden können. In Abb. 46 ist Elp3 schematisch dargestellt. N-terminal befindet sich die Radikal-SAM-Domäne, C-terminal die HAT-Domäne. Die Radikal-SAM-Domäne enthält 7 konservierte Cystein Reste, wobei C108, C118 und C121 an der Koordinierung eines Eisen-Schwefel-Clusters [4Fe-4S] beteiligt sind (Onuma, 2011). Die Cystein-Reste C224-C277 (Abb. 46) könnten ein 2. [Fe-S] Bindemotiv darstellen (unveröffentlichte Daten O. Onuma). Welche funktionellen Auswirkungen Mutationen in den genannten Cysteinen haben, konnte durch O. Onuma weitestgehend geklärt werden. So wurde gezeigt, dass die Mutationen innerhalb des Adomet-Motivs (C108A; C118A; C121A) in Zymosin-Resistenz resultieren (Abb. 47). Dagegen resultieren Alanin-Substitutionen der Cysteine C224, C236, C249 und C277 nicht in einem Funktionsverlust des Proteins (Einzel- und Doppelmutanten sind Zymocin sensitiv, Abb. 48), sodass eine biologische Relevanz dieser 2. putativen Bindedomäne fraglich ist.

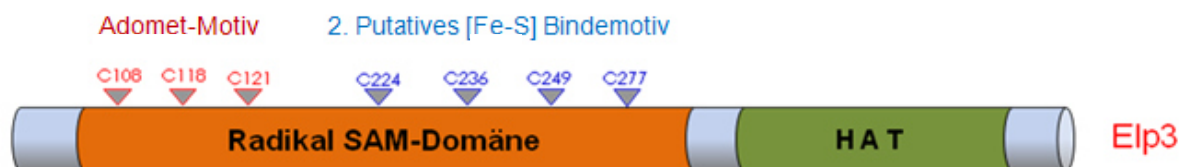


Abbildung 46: Schematische Darstellung von Elp3.

Eingezeichnet ist die ungefähre Lage der Radikal SAM-Domäne (orange, SAM=S-Adenosyl-Methionin) und der HAT-Domäne (grün, HAT=Histonacetyltransferase-Domäne). Cystein-Reste, welche an der Koordinierung eines Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt sein könnten sind dargestellt. Die Bindung eines [Fe-S]-Clusters durch die ersten 3 Cysteine (rot) gilt als gesichert. Die Bindung eines 2. [Fe-S]-Clusters durch die blau dargestellten Cysteine ist fraglich.

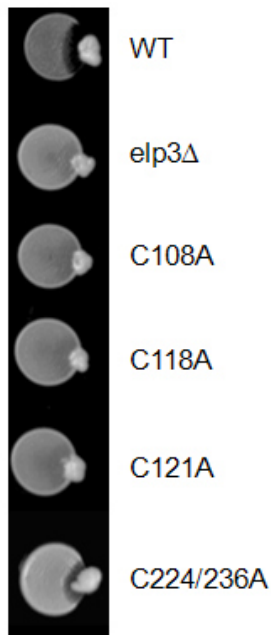


Abbildung 47: Killer-Eklipse-Test verschiedener *elp3*-Mutanten.

Killer-Eklipse-Test von *elp3*-Mutanten und des isogenen Wildtyps (WT). Die verschiedenen Stämme (WT= FY1679-08A; ONY1= *elp3*Δ; ONY3=C108A; ONY4=C118A; ONY5=C121A; ONY7=C224/236A) wurden auf Vollmedium getropft und mit dem Zymocin produzierenden Killerstamm AWJ137 inokuliert. Cystein-Mutationen im Adomet-Motiv (C108A; C118A; C121A) resultieren in Zymocin Resistenz vergleichbar einer *ELP3* Deletion (*elp3*Δ). Der isogene Wildtyp (WT) sowie eine Doppelmutation im 2. putativen [Fe-S] Bindemotiv (C224A/C236A) prägen Sensitivität aus.

3.6.1 Eisen-Schwefel-Cluster in Elp3 ist essentiell für Kti11 Bindung

Die Relevanz der [Fe-S]-Bindemotive für die Kti11-Elp3 Interaktion sollte im Folgenden untersucht werden. Stämme, in denen verschiedene Elp3-Cysteine nach Alanin mutiert vorlagen, wurden mir freundlicherweise von Osita Onuma zur Verfügung gestellt (C108A [ONY3]; C224A [ONY6], C224A-C236A [ONY7]; TM=C108A, C118A, C121A [ONY11]; Q5=C108A, C118A, C121A; C224A, C236A [ONY12]). Alle Varianten werden als C-terminal, c-myc Epitop-markierte Proteine unter der Kontrolle ihres nativen Promoters exprimiert. In diese Stämme sowie in den Wildtyp Elp3-c-myc exprimierenden Stamm (ONY02) wurde das Plasmid pRZ45 (*(HA)₃-KTI11*) transformiert. *KTI11* befindet sich hierbei unter der Kontrolle des *Gal1* Promoters und wird in Galaktose-Medium induziert. Die Stämme wurden in galaktose-haltigem Minimalmedium angezogen und anschließend wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit anti-HA gekoppelter Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 48 dargestellt. Kti11 ist wie erwartet in der Lage, mit dem Wildtyp Elp3 Protein zu interagieren. Jedoch führt eine Mutation in Cysteinen, die an der Bindung des 1. [Fe-S]-Clusters beteiligt sind (C108A, TM; Q5), zum Verlust der Kti11 Interaktion. Mutationen innerhalb der 2. putativen [Fe-S] Bindedomäne ermöglichen weiterhin die Elp3-Kti11 Wechselwirkung (C224A-C236A). Eine Ausnahme stellt die Elp3 Variante C224A dar. Hier konnte keine Bindung an Kti11 nachgewiesen werden. Bei dieser Variante stellte sich nach Durchführung der Ko-IP heraus, dass es sich um eine *ELP3* Deletion handelt (Mitteilung von Osita Onuma) und nicht wie angenommen um eine C224A Variante. Demnach ist eine Protein-Expression nicht möglich (im Elp3 Rohextrakt ist C224A nicht nachweisbar; *elp3*Δ; Abb. 48).

Mutationen in allen getesteten Elp3 Varianten resultieren in einer Destabilisierung von Elp3 (siehe Rohextrakt, Abb. 48). Eine C108A Substitution ist dabei stärker von Degradation betroffen als das Genprodukt einer C224A-C236A Doppelmutante (für C224A-C236A ist Vollängenprotein im Rohextrakt erkennbar, weniger Degradationsprodukte nachweisbar). Rückschlüsse auf die Stärke der Kti11-Elp3 Interaktion (WT-Elp3 im Vergleich mit C224A-C236A) kann auf Grund der Destabilisierung von Elp3 nicht gezogen werden. Festzuhalten bleibt, dass Mutationen in der 1. [Fe-S]-Bindedomäne die Kti11 Interaktion verhindern und zu einem starken Elp3-Abbau führen. Hingegen resultieren Aminosäuresubstitutionen in der putativen [Fe-S]-Bindedomäne nicht im Verlust der Kti11 Bindung, haben aber ebenfalls Protein-destabilisierende Wirkung. Weiterführende Experimente sollten die Elongator-Integrität in den Elp3 Varianten untersuchen.

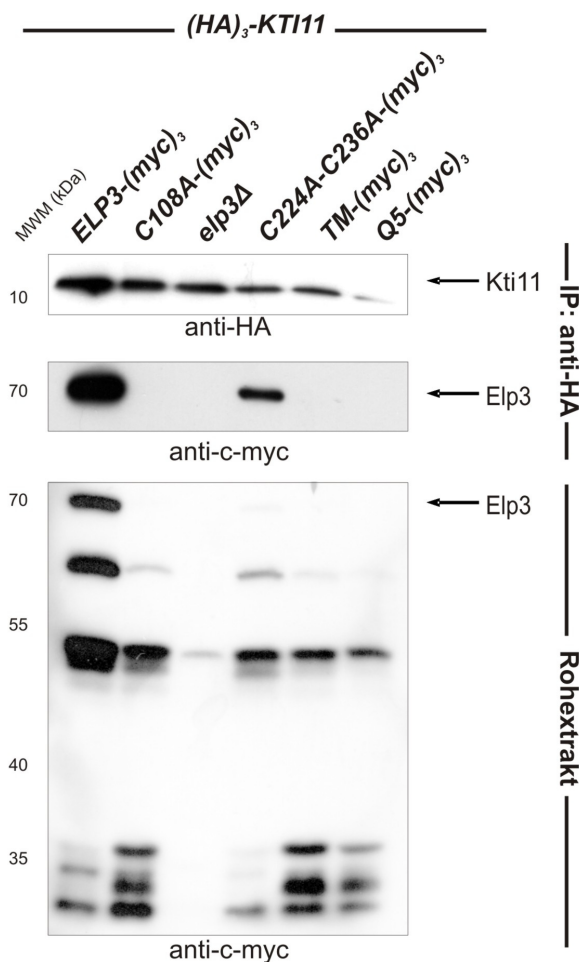


Abbildung 48: Kti11-Elp3 Interaktion bedarf eines intakten Elp3 AdoMet-Motivs.

Ko-Immunopräzipitation von Kti11 mit Elp3 und mutierten Elp3-Varianten. Die Stämme ONY3 (C108A), ONY6 (*elp3*Δ), ONY7 (C224A-C236A), ONY11 (TM=C108A, C118A, C121A), ONY12 (Q5=C108A, C118A, C121A; C224A, C236A) wurden mit dem Plasmid pRZ45 ((HA)₃-KTI11) transformiert. Gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt welche die entsprechenden Elp3-Varianten (Elp3; C108A; C224A; C224A/C236A; TM und Q5) myc-Epitop markierten exprimierten, wurden für die Ko-Immunopräzipitation mit Anti-HA-AK eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Elp3 und Elp3-Varianten) und Anti-HA-AK (Kti11) detektiert. Elp3 wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc-Antikörpern nachgewiesen.

3.6.2 Elp3 Cystein-Mutationen der [Fe-S] Bindedomänen erlauben Elp1 Interaktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kti11-Elp3 Interaktion durch Mutationen in der 1. [Fe-S]-Bindedomäne gestört wird, stellte sich die Frage, inwieweit durch diese Mutationen die Integrität des Elongators beeinflusst ist. Hierzu wurden die Stämme ONY3 (C108A), ONY7 (C224A-C236A), ONY11 (TM=C108A, C118A, C121A) und ONY12 (Q5=C108A, C118A, C121A; C224A, C236A) mit einem *ELP1*-(HA)₃ tragenden Plasmid (pJet2) transformiert. Die Anzucht der Epitop-markierten Stämme für Ko-Immunpräzipitations-Experimente erfolgte in glukose-haltigem Minimalmedium unter selektiven Bedingungen. Die Ergebnisse der Ko-IP sind in Abb. 49 dargestellt.

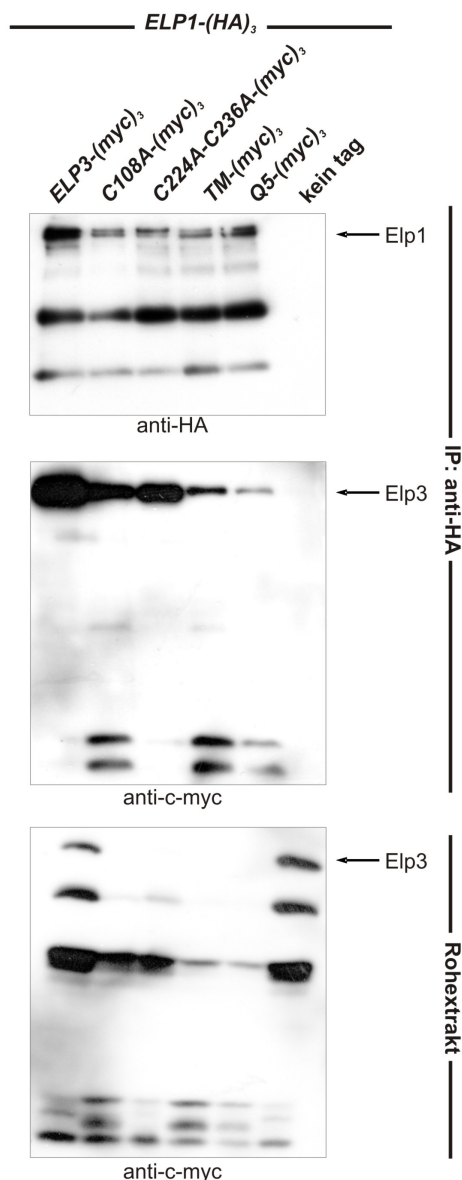


Abbildung 49: Cystein Substitutionen in Elp3 erlauben Elp1 Interaktion.

Ko-Immunopräzipitation von Elp1 mit Elp3 und mutierten Elp3-Varianten. Die Stämme ONY3 (C108A), ONY7 (C224A-C236A), ONY11 (TM=C108A, C118A, C121A), ONY12 (Q5=C108A, C118A, C121A; C224A, C236A) wurden mit dem Plasmid pJet2 (*ELP1*-(HA)₃) transformiert. Gleiche Mengen an Gesamtproteinextrakt welche die entsprechenden Elp3-Varianten (Elp3; C108A; C224A; C224A/C236A; TM und Q5) myc-Epitop markierten exprimierten, wurden für die Ko-Immunopräzipitation mit Anti-HA-AK eingesetzt. Die Immunpräzipitate (IP) wurden anschließend per Westernanalyse mit Anti-c-Myc-AK (Elp3 und Elp3-Varianten) und Anti-HA-AK (Elp1) detektiert. Elp3 wurde im Rohextrakt mit Anti-c-myc-Antikörpern nachgewiesen.

Es wird ersichtlich, dass alle mutierten Elp3 Varianten noch mit Elp1 interagieren können (Abb. 49). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Elongator-Komplex assembliert vorliegt. Die bereits bei 3.6.1 gezeigte Destabilisierung von Elp3 durch Aminosäuresubstitution von Cysteinen kann auch hier wieder beobachtet werden (Rohextrakt, Abb. 49). Daher können auch hier keine Rückschlüsse auf die Stärke oder Stabilität der Elp1-Elp3 Interaktion gezogen werden.

Die hier durchgeführten Ko-IPs geben erste Hinweise, dass die Kti11-Elongator Bindung Elp3 vermittelt stattfindet, da mutierte Elp3 Varianten des 1. [Fe-S]-Clusters keine Kti11 Interaktion zulassen, während der Elongatorkomplex (Elp1-Elp3 Interaktion) assembliert vorliegt. Läge eine Interaktion mit einer anderen Elongatoruntereinheit vor, so hätte Kti11 mit allen getesteten Elp3 Varianten präzipitieren müssen (indirekte Interaktion). Ebenfalls festzuhalten bleibt, dass der Verlust des [Fe-S]-Clusters in Elp3 maßgeblich die Kti11 Interaktion stört, jedoch weiterhin die Elongator-Assemblierung erlaubt.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung von AtKti11 und Charakterisierung in *S. c.* und *A. t.*

In den letzten 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in *H. sapiens*, *A. thaliana*, *M. musculus* und *C. elegans* zu jeder Elongatoruntereinheit entsprechende homologe Gene in diesen Organismen existieren und die entsprechenden Genprodukte funktionell konserviert sind (Hawkes et al. 2002; Kim et al., 2002; Nelissen et al., 2005; 2010; Mehlgarten et al., 2010; Collum et al., 2000; Solinger et al., 2010). Neben der hohen strukturellen Konservierung dieses Komplexes konnte zumindest eine biologische Funktion, nämlich die der tRNA Modifikation, in *S. cerevisiae*, *A. thaliana* und *C. elegans* zweifelsfrei bestätigt werden (Huang et al., 2005; Mehlgarten et al., 2010; Chen et al., 2009). Für die U₃₄-Modifikation in *S. cerevisiae* sind neben dem Elongator-Komplex eine Vielzahl weiterer Gene notwendig (*KTI11-KTI14*). Ob diese Faktoren ebenfalls in der Pflanze existent sind und für die Elongator-Funktion benötigt werden, ist nicht bekannt. Lediglich ein Homolog von Kti12, ein transienter Elongator-Interaktor in Hefe, konnte in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls identifiziert werden (Fichtner et al., 2002; Nelissen et al., 2005; Petrakis et al., 2005). Mutationen in dem Gen *DRL1* (*deformed roots and leaves 1*) führen zu einem Elongator-Defekt ähnlichen Phänotyp, einhergehend mit schmalen, gekrümmten und abaxial gebogenen Blättern (Nelissen et al., 2005). Elongator-Mutationen äußern sich in *Arabidopsis thaliana* durch das Auftreten weiterer Effekte, wie abnormale Zellmorphologie, erhöhte Sensitivität gegenüber Abscisinsäure, eine erhöhte Toleranz gegen oxidativen Stress, eine verbesserte Trockenresistenz hervorgerufen durch effizienteres Öffnen und Schließen der Stomata und eine vermehrte Akkumulation von Anthocyanen in der Pflanze (Nelissen et al., 2005; Chen et al., 2006; Falcone et al., 2007; Zhou et al., 2009).

Ein Ziel ist es, die biologischen Funktionen des Elongator-Komplexes in verschiedenen Organismen zu verstehen und divergierende Entwicklungen (Homologe Proteine, unterschiedliche Regulationsmechanismen) während der Evolution aufzudecken.

4.1.1 *AtKTI11* komplementiert den *kti11*Δ tRNA-Modifikationsdefekt in Hefe

Die Computer-basierte Suche nach einem möglichen *KTI11* Homolog in *A. thaliana* identifizierte ein Gen, dessen vorhergesagte Aminosäuresequenz eine 44 %ige Identität zum Hefe Protein aufweist. At2g15910 ist ein auf Chromosom 2 lokalisiertes Gen, für das zwei Computer-annotierte Protein-Varianten existieren (TAIR-Database@Arabidopsis.org). Die kleine, 82 Aminosäuren umfassende Variante (At2g15910.2), ist kodiert von 2 Exons, wobei die kodierende Sequenz sich ausschließlich im 1. Exon befindet. Für diese Variante

konnte ein mRNA Transkript nachgewiesen werden (www.arabidopsis.org). Hingegen konnten für die 5 Exons umfassende und für 367 Aminosäuren kodierende, größere Variante (At2g15910.1) keine Transkripte nachgewiesen werden. Der Aminosäurevergleich (Abb. 7) mit Homologen aus Hefe, Maus oder Mensch lässt die Existenz eines 367 Aminosäure umfassenden Proteins in *A. thaliana* als eher unwahrscheinlich erscheinen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die in Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2 gezeigten Komplementationsversuche eines *kti11* Δ -Stammes durch das pflanzliche Ortholog (kurze Variante; At2g15910.2). Neben der Wiederherstellung der γ -Toxin Sensitivität konnte die Funktionalität von *AtKTI11* ebenfalls durch den tRNA-Suppressionassays bestätigt werden (Abb. 8). Das bedeutet, dass *AtKTI11* den U₃₄ Modifikationsdefekt eines *kti11* Δ Stammes komplementiert.

Wir führten anschließend Interaktionsstudien von AtKti11 mit tRNA-Modifikations-relevanten Kti11 Interaktoren durch. Zum einen können durch diese Bindungsstudien Rückschlüsse auf eine mögliche Konservierung der Proteinbindung in anderen Organismen gezogen werden und zum anderen können Aussagen über die biologische Relevanz der jeweiligen Interaktion gemacht werden. Bekannte Interaktoren in Hefe sind der Elongator-Komplex und das Elongator relevante Protein Kti13 (Fichtner et.al.,2003; Zabel et al., 2008; Bär et al., 2008). Für den Nachweis der Elongator-Interaktion wurde jeweils ein Vertreter der beiden Sub-Komplexe ausgewählt. Wie bereits im Vorfeld vermutet, zeigte AtKti11 eine intakte Elp2 Interaktion, diese war jedoch im Vergleich zum Hefeprotein abgeschwächt. Dieser Unterschied könnte auf dem wenig konservierten C-Terminus im Vergleich zu Kti11 beruhen, der als Interaktionsdomäne für den Elongator-Komplex wichtig ist. Mutationen in diesem Bereich führen zum Verlust der Elongator Interaktion und resultieren in Zymocin Resistenz (Bär et al., 2008).

Protein Wechselwirkungen von AtKti11 mit dem HAP-Komplex Vertreter Elp6 und dem potentiellen Elongator-Regulator Kti12 konnten im Vergleich zum Hefe Kti11 nicht nachgewiesen werden. Zwei mögliche Erklärungen sind denkbar. Die Kti11-HAP-Komplex und Kti11-Kti12 Interaktion wird indirekt über den Core-Komplex vermittelt. Da eine abgeschwächte AtKti11-Core-Elongator Bindung besteht, könnte die AtKti11-Elp6 und AtKti11-Kti12 zu schwach sein, um detektiert zu werden. Eine zweite mögliche Erklärung wäre, dass die Kti11-Elp6 und Kti11-Kti12 Interaktionen direkt Wechselwirkungen darstellen, diese aber für die U₃₄ Modifikations-Funktion des Elongators nicht benötigt werden, da AtKti11 ohne nachweisbare Elp6 und Kti12 Interaktion die Kti11 Funktion ersetzt. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Proteininteraktionsstudien von TAP-markierten Kti11 zeigten Interaktionen von Kti11 lediglich mit dem Core-Elongator. HAP-Komplex Untereinheiten (Elp4/5/6) wurden nicht identifiziert, was eher die These der indirekten Core-Elongator-

vermittelten Interaktion von Kti11 mit dem HAP-Komplex unterstützt (Fichtner et al., 2003; Bär et al., 2008).

Neben der AtKti11-Core-Elongator Interaktion untersuchten wir eine mögliche Kti13 Bindung. Kti13 wurde ursprünglich als Suppressor von Klasse 2 α -Tubulin Mutanten (ATS1 – α -tubulin-suppressor) beschrieben und später der Zymocin Resistenz Klasse 2 zugeordnet (Kirkpatrick und Solomon, 1994; Fichtner und Schaffrath, 2002; Zabel et al., 2008). Aufgrund einer vorhandenen Uridin Restmodifikation von *KT113* deletierten Stämmen (18% der tRNAs liegen modifiziert vor) wird Kti13 als potentieller Elongator-Regulator angesehen. Da jedoch bisher keine direkte Interaktion von Kti13 mit dem Elongator nachgewiesen werden konnte, könnte die postulierte regulatorische Funktion über den Bindepartner Kti11 erfolgen (Zabel et al., 2008). Interessanterweise konnten in den durchgeführten Ko-Immünpräzipitationen identischen Mengen an Kti13 durch Kti11 oder AtKti11 präzipitiert werden. Da im hochkonservierte N-Terminus von Kti11 die Interaktionsdomäne von Kti13 vermutet wird (Bär et al., 2008), könnte darüber die starke AtKti11-Kti13 Wechselwirkung erklärt werden.

4.1.2 AtKti11 interagiert mit dem *A. thaliana* Core-Elongator

Wir führten TAP-Aufreinigungen in *Arabidopsis thaliana* Zellkultur durch, um Interaktionspartner von AtKti11 in der Pflanze zu identifizieren. Hier gelang es uns, Protein-Wechselwirkung mit dem AtCore-Elongator nachzuweisen (AtElp1-AtElp3). Untereinheiten des HAP-Komplexes konnten nicht ko-präzipitiert werden (AtElp4-AtElp6). Diese Beobachtung korreliert mit publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe, in denen wir zeigten, dass TAP-markiertes Hefe Kti11 lediglich mit dem Core-Elongator interagiert (Fichtner et al., 2003). Die Kti11-Core-Elongator Wechselwirkung scheint demnach evolutionär hoch konserviert. Da der Verlust der Kti11-Elongator Wechselwirkung in Hefe in tRNA-Hypomodifizierung resultiert (Bär et al., 2008), ist es wahrscheinlich, dass AtKti11 ebenfalls für die Elongator-Funktion in der U₃₄-Modifikation essentiell ist.

4.1.3 AtKTI11 komplementiert den *kti11* Δ Diphthamid-Biosynthesedefekt

Diphthamid ist ein speziell modifizierter Histidin-Rest (H699 in Hefe) am eEF2 und hochgeradig konserviert in Archaeen und Eukaryoten (Collier, 2001). Für die drei Reaktionsschritte umfassende Biosynthese werden 6 Proteine benötigt (Liu et al., 2004; Su et al., 2012). Liegt mindestens ein Dph-Faktor mutiert oder deletiert vor, so ist die Biosynthese unterbrochen und der eEF2 untermodifiziert (Liu et al., 2004). Eine NAD-Ribosylierung durch das Diphtherie-Toxin bleibt aus und der eEF2 ist in Gegenwart des Toxins weiterhin funktionell und ermöglicht die Translokation der Ribosomen (Collier, 2001).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob AtKti11 die Kti11 Funktion in der Diphthamid Biosynthese ersetzen kann. Durch intrazelluläre Expression der toxischen Diphtherie-Toxin Untereinheit (Toxin A) wird die ADP-Ribosylierbarkeit des eukaryotischen Translationfaktor 2 (eEF) bestimmt (Mattheakis *et al.*, 1992). Ein *kti11* Δ -Stamm ist dementsprechend DT resistent (Lui *et al.*, 2004; Bär *et al.*, 2008). Durch *AtKTI11* Expression wird DT Sensitivität wiederhergestellt und der EF2 liegt Diphthamid-modifiziert vor. Eine funktionelle Substitution von *KTI11* durch das pflanzliche Homolog ist daher möglich. Durchgeführte Interaktionsstudien von AtKti11 mit Dph1 und Dph2 konnten eine Protein-Protein-Wechselwirkung nachweisen (Abb. 12). Diese Daten zeigen, dass AtKti11 Hefe Kti11 als strukturellen Bestandteil des postulierten Dph1/Dph2/Kti11-Trimers ersetzen kann (Bär *et al.*, 2008).

Protein-Interaktionsstudien mit TAP-markierten AtKti11 in *Arabidopsis* Zellkultur konnten weder das potentielle Dph1 Homolog in Arabidopsis At5g62030p noch das mögliche Dph2 Homolog At3G59630p als Interaktionspartner identifizieren. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da angenommen wird, dass Kti11 mit Dph1 und Dph2 einen heterotrimeren Komplex bildet, der für den ersten Schritt der Biosynthese essentiell ist (Bär *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2004). Warum wurde nun aber dieser heterotrimer-Komplex in *A. thaliana* nicht nachgewiesen? Interaktionen zwischen AtKti11 und At5g62030/At3G59630p könnten womöglich in der Pflanze bestehen, gingen jedoch aufgrund zu stringenter Bedingungen während des Aufreinigungsprozesses verloren (zu hoher Salzgehalt in den Puffern). Die in den TAP-Aufreinigungen verwendeten Proteinextrakte stammten aus *Arabidopsis*-Zellkultur. Nicht nur die Photosynthese (Anzucht in Dunkelheit) ist in dieser Zelllinie inhibiert, auch die Differenzierung in Pflanzenorgane wird verhindert. Daher kann von einem veränderten Proteom im Vergleich zur differenzierten *A. thaliana* Pflanze ausgegangen werden. Dementsprechend könnten At5g62030/At3G59630p ein verändertes (erniedrigt) Proteinlevel in der Zelle aufweisen und damit den Nachweis des heterotrimeren-Komplexes erschweren. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass AtKti11 in der pflanzlichen Diphthamid-Biosynthese nicht beteiligt ist. Generell existieren für das pflanzliche System keinerlei Erkenntnisse, die At5g62030 und At3G59630 als Dph1/Dph2 Orthologe identifizieren. Auch fehlen Daten, die eine Diphthamid-Modifizierung des pflanzlichen eEF2 nachweisen. So existieren zwar Publikationen, die auf eine toxische Wirkung der DT A-Untereinheit in *A. thaliana* hinweisen (Thorsness *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2003; Aubrey *et al.*, 2009), aber eine ADP-Ribosylierung des eEF2 ist bisher nicht beschrieben.

4.1.4 AtKti11 lokalisiert cytoplasmatisch und Zellkern-gebunden in *A. thaliana*

Lokalisierungsstudien von GFP-markiertem AtKti11 in-Tabak Zellkultur sowie in stabil etablierten *Arabidopsis thaliana* Linien zeigten GFP-Signale im Cytoplasma und Zellkern. Dahingegen waren Zellwand und Nucleolus frei von Fluoreszenzsignalen. Lokalisierungsstudien von Kti11 in Hefe zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Neben der Verteilung im Cytoplasma wurden ebenfalls Fluoreszenzsignale im Zellkern detektiert (Bär et al., 2008). Genaue Aussagen über mögliche Signale im Nucleolus können aufgrund der verwendeten Methode in dieser Publikation (Immunfluoreszenz) nicht gezogen werden, da diese Methode keine Abgrenzung von Nucleolus zum Zellkern zulässt (zu diffuse Fluoreszenzsignale).

Da sowohl der Hefe- als auch der pflanzliche Elongator im Cytoplasma und Zellkern lokalisieren (Pokholok et al., 2002; Close et al., 2006; Neslissen et al., 2010), könnte die Verteilung von Kti11 in beiden Kompartimenten durch die vorhandene Elongator-Interaktion erklärbar sein.

4.1.5 At1g27060 komplementiert den *kti13* Δ -Phänotyp in Hefe

Die Identifikation des pflanzlichen Kti13 Homologs stellte sich anfänglich als schwierig heraus, da drei mögliche Homologe mit einer Identität in der Aminosäuresequenz zwischen 15-18% in der Pflanze existieren (At5g63860, At5g16040, At1g27060). Die besagten Gene wurden anfänglich im Killer-Eklipse-Assays analysiert (Daten nicht gezeigt), konnten jedoch die Kti13 Funktion nicht komplementieren.

Interessanterweise ko-präzipitierten wir in den durchgeführten AtKti11 TAP-Affinitätsreinigungen eines der zuvor getesteten potentiellen Kti13 Homologe in der Pflanze (Genprodukt von At1G27060, nachfolgend als AtKti13 bezeichnet). Die Verwendung sensitiverer Funktions-Assays (γ -Toxin-Assay; *SUP4*-Assay) offenbarte eine partielle Komplementation der Kti13 Funktion durch AtKti13. Dieses Ergebnis war aufgrund der geringen Konservierung (18%) zwischen beiden Homologen nicht unbedingt zu erwarten. Umso erstaunlicher war, dass die partielle Komplementation durch gleichzeitige *AtKTI11* Expression verstärkt wurde. Dies deutet auf eine enge funktionelle und physikalische Bindung beider Proteine hin. Diese Daten könnten ein erster Hinweis darauf sein, dass die Kti13 Funktion in der Elongator-abhängigen tRNA-Modifikation tatsächlich Kti11 vermittelt ist.

4.1.6 Kti11-Kti13 Interaktion ist evolutionär hoch konserviert

Die in dieser Arbeit nachgewiesene AtKti11-AtKti13 Wechselwirkung in *Arabidopsis thaliana* unterstützt die Vermutung, dass es sich um eine innerhalb der Eukaryoten hoch konservierte Interaktion handelt. Aus dem Menschen ist bekannt, dass das Kti13 Homolog DelGEF mit dem Kti11 Homolog DelGIP interagiert und die Sekretion von Proteoglykanen negativ reguliert (Sjolinder et al., 2004). 2008 wurde durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass starke Wachstumsdefizite von *kti11Δ kti13Δ* Doppelmutanten in sekretionsdefizienten Stämmen (*sec2-59*) auftraten. Diese synergistischen Effekte wurden in *kti11Δ elp3Δ* oder *kti13Δ elp3Δ* tragenden *sec2-59* Stämmen nicht beobachtet (Zabel et al., 2008) und können als erster Hinweis für eine Elongator unabhängige Funktion beider Proteine innerhalb der Zelle verstanden werden (Zabel et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte durch Ko-Immunopräzipitationen, der rekombinant in *E. coli* exprimierter Hefeproteine Kti11 und Kti13 eine direkte Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden. Das bedeutet zum einen, dass für die Protein-Wechselwirkung keine weiteren Hefeproteine notwendig sind und zum anderen, dass eine mögliche Hefespezifische posttranslationale Modifikation (z. B. Phosphorylierung) entbehrlich ist. Diese Daten bekräftigen ebenfalls die enge Bindung beider Proteine zueinander.

4.2 Charakterisierung von Kti11

Die gegenwärtige Herausforderung besteht darin, die biologische Funktion des Elongator-Komplexes und seiner Partnerproteine (Kti11, Kti12, Kti13) in der Hefe und anderen Organismen zu verstehen. Die während dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse aus *Arabidopsis thaliana* zeigen, dass nicht nur der Elongator-Komplex in Struktur und Funktion konserviert ist, sondern auch Kti11 und Kti13 Orthologe in der Pflanze existieren. Darüber hinaus konnten die bekannten Kti11-Elongator sowie Kti11-Kti13 Interaktionen auch in *A. thaliana* bestätigt werden. Aufgrund der einfachen Handhabung und Manipulierbarkeit von Hefe entschieden wir uns, weitere biochemische Experimente in diesem Modelorganismus durchzuführen. Das Ziel dieses Teilabschnittes bestand in der biochemischen Charakterisierung von Kti11 in Hefe und *E. coli*. Insbesondere sollten die molekularen und phänotypischen Auswirkungen von Cystein Substitutionen der *Zn-ribbon*-Domäne auf die Proteininstabilität und Proteininteraktionen sowie der tRNA- und Diphthamid-Modifikation untersucht werden.

4.2.1 Kti11 ist ein Eisen-bindendes Protein

Sun und Mitarbeiter zeigten 2005, dass Kti11 mit Hilfe von 4 konservierten Cystein-Resten ein Zink-Ion koordiniert. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur teilten sie Kti11 der *Zn-ribbon* Proteinfamilie zu. Diese ist unterteilt in 7 Klassen. Die Klassifizierung geschieht hierbei nach Struktur der Zink-Bindedomäne. Typisch für die Metallion koordinierende Domäne in Kti11 ist die Abfolge von $\beta\beta\alpha\beta\beta$ Faltblättern bzw. Helices in der Sekundärstruktur. Da keine vergleichbare Sekundärstruktur anderer *Zn-ribbon* Proteine existiert, wurde Kti11 in eine neue Gruppe, die CSL-Zink-Finger Klasse, eingeteilt. (CSL steht dabei exemplarisch für die Aminosäuresequenz um das letzte Zink koordinierende Cystein in Kti11) (Sun et al., 2005). Da zu Beginn dieser Dissertationen die biologische Relevanz der *Zn-ribbon* Domäne für die Kti11 Funktion nicht geklärt war, sollte diese Region in Kti11 näher charakterisiert werden. Wir begannen unsere Studien mit der rekombinanten Expression von Kti11 in *E. coli*. Nach erfolgter Affinitätschromatographie beobachteten wir, dass Kti11 in braun gefärbten Fraktionen eluierte. Spektroskopische Untersuchungen dieser Fraktionen zeigten ein für Rubredoxine typisches Absorptionsspektrum bestehend aus Absorptionsmaxima bei 370nm und 490nm und einer flach abfallenden Schulter bei ca. 570nm (LeGall et al., 1998; Lovenberg und Sobel, 1965; Ragsdale und Ljungdahl, 1984). Dieses Absorptionsspektrum verschwand nach Gabe von 1mM der reduzierend wirkenden Substanz Natriumdithionit und deutet auf eine Eisenbindung hin. Nach Reoxidation mit Luftsauerstoff konnte das Rubredoxin-typische Absorptionsspektrum wieder detektiert werden. Rubredoxine stellen eine Klasse von niedermolekularen Proteinen dar, die mit Hilfe von 4 Cystein-Resten ein einzelnes Eisenatom koordinieren, im reduzierten (Fe^{2+}) oder oxidierten (Fe^{3+}) Zustand vorliegen und als Elektronen-Transporter fungieren können. Vertreter dieser Proteinklasse, wie z.B. Rubredoxin aus *Clostridium pasteurianum* (CpRd), Rubredoxin aus *Pyrococcus furiosus* (Pfrd), Cytochrome, Ferredoxine, Ruberythrin oder Flavorubredoxin partizipieren als Elektronen Transporter in verschiedenen biologischen Prozessen (LeGall et al., 1988; Gomes et al., 2000), wie Sauerstoff-Detoxifizierung, Eisen-Metabolismus, Alkan-Hydroxylierung und Photosystem I Assemblierung (Gomes et al., 1997; da Costa et al., 2001; McKenna und Coon, 1970; Shen et al., 2002).

Unsere Daten überraschten etwas, da Sun und Mitarbeiter 2005 gezeigt hatten, dass rekombinant in *E. coli* gereinigtes Kti11 ein einzelnes Zink Atom bindet. Betrachtet man aber die zugrundeliegenden experimentellen Bedingungen, so wird schnell klar, warum ausschließlich ein Zink Atom in Kti11 gebunden vorlag. Die Verwendung von M9 (minimal) Medium bei der *E. coli* Anzucht in Verbindung mit additiver Gabe von 20 μM ZnSO_4 führte wahrscheinlich zur Inkorporation von Zink anstelle von Eisen (wir verwendeten zur Anzucht LB-Medium). Unsere Daten wurden schließlich von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt. Proudfoot et al. (2008) exprimierten und reinigten Kti11 aus *E. coli*, das zuvor in

verschiedenen Anzuchtmedien kultiviert wurde. Dabei stellten sie fest, dass Anzuchtmedium (M9 oder Terrific Broth) oder die Gabe von Zn^{2+} oder Fe^{2+} Ionen in Form von $ZnSO_4$ oder $FeSO_4$ einen entscheidenden Einfluss auf das in Kti11 gebundene Metallion haben. Aus Vollmedium (Terrific Broth; TB) gereinigtes Kti11 enthielt zu 17% Eisen und 40% Zink. Wurde $FeSO_4$ dem Medium zugesetzt veränderte sich die Metallionenbindung in Kti11 zugunsten von Fe^{2+} (49% Fe^{2+} und 3% Zn^{2+}). Wird dagegen $ZnSO_4$ zugeführt, so konnte ausschließlich Zink in Kti11 nachgewiesen werden. Damit entscheidet das Wachstumsmedium über die Menge an gebundenen Eisen in Kti11 (Proudfoot et al., 2008). Die Autoren fanden ebenfalls heraus, dass die Eisen-gebundene Kti11-Form Redox-Aktivität aufweist. Das Redoxpotential von +6mV liegt dabei im Bereich typischer Rubredoxine (Lovenberg und Sobel, 1965; Moura et al., 1979).

In einer anderen Studie wird darauf hingewiesen, dass Fe^{2+} durch Zn^{2+} substituiert werden kann (Bonomi et al., 1998). Eine mögliche Erklärung ist die höhere Affinität von Zink zu den Metall-koordinierenden Schwefel Atomen der Cystein-Reste (Bonomi et al., 1998). Interessanterweise wurden Zinkionen niemals in Rubredoxinen nachgewiesen, die aus ihrem natürlichen Organismus aufgereinigt wurden (Weinberg et al., 2004; Eidsness et al., 1992). Somit ist nicht klar, warum *E. coli* vermehrt Zink anstelle von Eisen in rekombinante Proteine einbaut. Es wird diskutiert, dass in den natürlichen Mikroorganismen Zink, nicht aber Eisen, durch einen speziellen noch unbekanntem Mechanismus von den Rubredoxinen ferngehalten wird (Bonomi et al., 1998).

Daher entschieden wir uns, neben den Studien in *E. coli* die Eisenbindung von Kti11 in Hefe zu untersuchen. Dazu wurden Hefestämme mit Epitop-markierten Kti11 in Anwesenheit von radioaktiv markierten ^{55}Fe inkubiert und anschließend Kti11 immunpräzipitiert. Interessanterweise konnten wir die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* bestätigen. Eine um den Faktor acht erhöhte Radioaktivität in Kti11 Präzipitaten, verglichen mit dem Hintergrund, zeigte eindeutig die Inkorporation des ^{55}Fe in Kti11.

Eine Verfälschung der Ergebnisse durch indirekte Kopräzipitation von Kti11 Interaktoren, welche [4Fe-4S]-Cluster binden (Elp3 oder Dph1-Dph2), kann ausgeschlossen werden (Paraskevopoulou et al., 2006; Onuma, 2011; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2011), da eine Herunterregulation der mitochondrialen oder cytoplasmatischen Eisen-Schwefel-Cluster Assemblierungsmaschinerie (Nfs1↓ respektiv Nar1↓) (Mühlenhoff et al., 2004; Balk et al., 2004) keinen Einfluss auf die ^{55}Fe Bindung in den Kti11 Präzipitaten nimmt. Weitergehend kann geschlussfolgert werden, dass Kti11 selbst kein anorganisches [Fe-S]-Cluster bindet.

Im Weiteren wurde der Einfluss einer Substitution von Cystein nach Serin der Metallion koordinierenden Aminosäuren untersucht (C25S, C27S, C47S, C50S). Die Absorptionsspektroskopie der rekombinant in *E. coli* gereinigten Cystein-Varianten zeigte den Verlust der Eisenbindung. Die Elutionsfraktionen der Nickelaffinitätsaufreinigungen

waren im Gegensatz zum Wildtypprotein farblos und deuten ebenfalls auf einen vollständigen Verlust der Eisenbindung hin. Ebenfalls zeigten die in Hefe durchgeführten ^{55}Fe -Inkorporations-Experimente für die Cystein-Varianten C27S und C50S lediglich eine Radioaktivität im Bereich des Hintergrundes, sodass eine Eisenbindung als unwahrscheinlich erachtet werden kann. Dies ist erstaunlich, da Proudfoot und Mitarbeiter (2008) nach rekombinanter Expression von Kti11 Doppelmutanten (C25S/C27S und C47S/C50S) eine Braunfärbung der Affinitätssäule (Nickel-NTA) beobachten konnten, die jedoch durch Elution mit 0,25 molarem Imidazol verschwand und auf eine labile Fe-Koordinierung innerhalb des Proteins hinweist. Erst die Expression einer Kti11 Variante, in der alle vier Cystein-Reste mutiert waren (C25S, C27S, C47S und C50 Δ), resultierte im kompletten Verlust der Metallionbindung (Proudfoot et al., 2008).

Von Rubredoxinen ist bekannt, dass Proteinvarianten, in denen einzelne Metallkoordinierenden Cystein-Reste substituiert vorliegen, weiterhin zur Eisenbindung fähig sind, wenngleich das Redoxpotential verändert ist. In diesen Protein-Varianten wurden neben dem typisch vorkommenden Eisenion auch Eisen-Schwefel-Cluster des Typs $[\text{Fe}_2\text{-S}_2]$ gefunden (Kümmerle et al., 1997; Cross et al., 2002). Unsere *in vitro* und *in vivo* Daten sprechen jedoch gegen eine Eisenbindung in Cystein-substituierten Kti11-Varianten.

Jüngst berichteten Autoren in einer Publikation von der Identifizierung eines neuen CSL-Zink-Finger-Proteins. Hierbei handelt es sich um Dph4, ein ebenfalls für die Diphthamid-Biosynthese essentielles Protein (Thakur et al., 2012; Liu et al., 2004). Dph4 ist ein J-Domänen enthaltendes Co-Chaperon, dessen N-terminale J-Domäne mit einer *Zn-ribbon*-Domäne fusioniert vorliegt. Interessanterweise trägt Dph4 ebenfalls eine CSL-*Zn-ribbon*-Domäne mit der typischen Abfolge von $\beta\alpha\beta\beta$ Faltblättern bzw. α -Helices in der Sekundärstruktur und ist damit das zweite bekannte CSL-*Zn-ribbon* Protein in Eukaryoten (Thakur et al., 2012). Vergleichbar zu Kti11 bindet Dph4 ein einzelnes Eisenion und kann als Elektronen-Transporter fungieren (Thakur et al., 2012). Die Autoren zeigten, dass einzelne Cystein Mutationen in Dph4 neben dem Funktionsverlust ebenfalls zum Verlust der Eisenbindung führen (Thakur et al., 2012). Diese Daten ähneln unseren Beobachtungen, dass einzelne Cystein-Mutationen in Kti11 zum Verlust der Metallionenbindung führen. Diese Eigenschaft könnte in der einzigartigen Struktur der CSL-*Zn-ribbon* Domäne begründet sein.

4.2.2 Kti11 Eisenbindung ist essentiell für die Diphthamid-Biosynthese

Für die Diphthamid-Biosynthese in Eukaryoten sind 6 Proteine notwendig, Dph1-Dph5 und die jüngst identifizierte Diphthine Synthase Ret2 (Liu et al., 2004; Moehring et al., 1980; 1984; Chen et al., 1985; Mattheakis et al., 1992; 1993; Phillips et al., 1996; Schultz et al., 1998; Su et al., 2012). Im ersten Schritt der Biosynthese wird eine 3-amino-3-carboxypropyl-Gruppe vom S-Adenosyl-Methionin auf den Imidazolring des Histidins im eEF2 übertragen.

Diese Reaktion bedarf der radikalischen Spaltung von S-Adenosyl-Methionin. Vom Dph2 Homolog aus *Pyrococcus horikoshii* (PhDph2) weiß man inzwischen, dass es ein [4Fe-4S]-Cluster bindet, mit einem weiteren PhDph2 Molekül dimerisiert und die radikalische Spaltung von SAM katalysiert (Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2011). In Hefe existieren mit Dph1 und Dph2 zwei Homologe Proteine zum PhDph2 und es wird angenommen, dass beide einen Heterodimeren-Komplex ausbilden der strukturell ähnlich dem Homodimer aus *Pyrococcus horikoshii* ist. Die Funktion von Kti11/Dph3 und Dph4 im ersten Schritt der Diphthamid-Biosynthese ist weitestgehend unbekannt. Für Kti11 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cystein nach Serin Substitutionen (C25S, C27S, C47S und C50S) zum Funktionsverlust in der Diphthamid-Biosynthese führen. Alle Varianten prägten Diphtherie-Toxin Resistenz aus, gleichbedeutend mit einer Untermodifizierung des eEF2 (Mattheakis et al., 1992). Interaktionsstudien der C27S-Variante mit Dph1 konnten keine Wechselwirkung der Proteine miteinander nachweisen. Das kann zum Einen bedeuten, dass die Metallionen-Bindung in Kti11 essentiell für die Wechselwirkung von Kti11 mit dem Dph1/Dph2 Dimer ist. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aminosäuresubstitution C27S selbst für die gestörte Protein-Interaktion verantwortlich ist. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass die Fe-Bindung von Kti11 für den ersten Schritt der Biosynthese benötigt wird. Meine anfängliche Hypothese, dass Kti11 möglicherweise als Elektronen-Donor für die [4Fe-4S]-Cluster Proteine Dph1 und Dph2 fungieren könnte, ist fraglich, da [4Fe-4S]-Cluster von Radikal-SAM Enzymen thermodynamisch unzugänglich für die Reduktion durch Rubredoxine sind (Hinkley und Frey, 2006; Ugulava et al., 2001). Kti11 könnte aber an der Aufrechterhaltung des reduzierten Zustands des [4Fe-4S]-Clusters von Dph1/Dph2 beteiligt sein und Schutz vor Oxidation durch z. B. ROS bieten (Zhang et al., 2010; Thakur et al., 2012).

Dph4 trägt neben der von Kti11 bekannten CSL-Zn-ribbon Domäne eine N-terminal fusionierte J-Domäne, fungiert als Co-Chaperon und stimuliert die ATPase-Aktivität von HSP70 (Thakur et al., 2012). Von der mitochondrialen [Fe-S]-Cluster Maschenerie weiß man, dass J-Domänen enthaltene Proteine wie Ssq1 und Jac1 an der [Fe-S] Assemblierung beteiligt sind (Craig und Marszalek, 2002; Lill und Mühlenhoff, 2008). Daher diskutieren Thakur und Mitarbeiter (2012) über eine mögliche Funktion von Dph4 in der cytoplasmatischen [Fe-S] Assemblierungsmaschenerie (CIA). Aufgrund der beobachteten Eisen-abhängigen Oligomerisierung könnte Dph4 als transients, intrazellulärer Eisenspeicher fungieren (wie beschrieben für Ferritin und Frataxin) und die intrazelluläre Eisen-Homöostase regulieren (Thakur et al., 2012; Lill und Mühlenhoff, 2008). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der CSL-Zn-ribbon Domäne von Kti11 und Dph4 ist eine Involvierung von Kti11 in die [4Fe-4S]-Assemblierung von Dph1/Dph2 ebenfalls denkbar.

4.2.3 Kti11 Eisenbindung ist essentiell für U₃₄ tRNA-Modifikation

Über die letzten 12 Jahre wurde eine Vielzahl an möglichen Elongator-Funktionen postuliert, jedoch ist fraglich, ob der Elongator tatsächlich einen Multitasking-Komplex darstellt. Alternativ könnten die beobachteten pleiotropen Effekte durch tRNA-Hypomodifizierung hervorgerufen werden (Esberg et al., 2006; Chen et al., 2011). Neben dem Elongator-Komplex sind die Proteine Kti11-Kti13 für die mcm⁵ und ncm⁵ Modifikation am Uridin notwendig (Huang et al., 2005). Der biochemische Reaktionsmechanismus der Elongator-abhängigen tRNA-Modifikation ist im Gegensatz zur Diphthamid-Biosynthese noch unbekannt.

In dieser Arbeit wurde unter anderen die biologische Relevanz der Metallionen-Bindung von Kti11 für die Elongator-Funktion untersucht. Cystein nach Serin Substitutions-Mutanten (C25S, C27S, C47S und C50S) wurden funktionell im γ -Toxin-Assay analysiert. Alle Varianten prägten Toxin-Resistenz aus, gleichbedeutend mit einer U₃₄-Hypomodifizierung (Huang et al., 2005). Drei (C25S, C27S und C47S) der vier Cystein nach Serin Varianten zeigten einen dominant-negativen Defektphänotyp im γ -Toxin-Test. Das C50S Allel hingegen verhielt sich rezessiv-negativ. Interaktionsstudien der Varianten mit Elp3 zeigten eine direkte Korrelation zwischen intakter Elp3 Interaktion, Verlust der Eisenbindung und der Ausprägung eines dominant-negativen Phänotyps. Die fehlende C50S-Elp3 Wechselwirkung bestätigt unsere Hypothese. Da es sich bei C50S um die am weitesten C-terminal gelegene Austauschmutante handelt, könnte die von Bär et al. (2008) postulierte C-terminale Elongator-Interaktionsdomäne bis in diesen Proteinbereich hineinreichen und die Elongator-Interaktion stören. Da die Kti13 Interaktion der Cystein nach Serin Varianten nicht beeinflusst wurde, ist der Verlust der C50S-Elp3 Interaktion wahrscheinlich nicht auf größere strukturelle Veränderungen in C50S zurückzuführen. Zudem scheint die Defizienz in der Metallionen-Bindung, die Elongator oder Kti13 Wechselwirkung nicht zu beeinflussen. Somit werden die unterschiedlichen Phänotypen der Cystein-Mutationen durch Unterschiede in der Elongator-Interaktion hervorgerufen. Überdies hinaus scheint die Interaktion einer defekten Kti11 Variante (C25S, C27S und C47S) mit dem Elongator die Funktion des Wildtypproteins in der tRNA-Modifikation zu blockieren.

Die Vermutung, dass zwischen den dominant-negativen Varianten und dem Wildtyp-Protein eine Konkurrenz um die Bindung an den Elongator-Komplex besteht, wurde schließlich durch Überexpression des *KTI11* Wildtypallels in Kti11-C27S exprimierenden Stämmen gezeigt. Eine erhöhte Kopienzahl des Wildtypallels konnte die Dominanz von C27S herabsetzen und Sensitivität partiell wieder herstellen.

In einem weiteren Experiment führten wir die *KTI11-C27S* Mutation in das *kti11-1* Allel ein (*C27S-11-1*), welches ein vorzeitiges Stopp-Codon an Position 67 (E::Stopp) trägt. Das Genprodukt von *kti11-1* resultiert in einer um 15 Aminosäuren verkürzten Kti11-Variante, die

nicht mehr mit dem Elongator-Komplex wechselwirken kann (Bär et al., 2008). Ko-Immunpräzipitationen der Kti11 Variante C27S-11-1 bestätigten den Verlust der Elongator- und Dph-Interaktion. Im γ -Toxin-Assay war diese Mutation rezessiv und bestätigt damit unsere Vermutung, dass die Dominanz der C27S Variante die Elongator-Interaktion benötigt.

4.2.4 [4Fe-4S]-Cluster in Elp3 ist essentiell für Kti11 Interaktion

Elp3 stellt die katalytische aktive Untereinheit des Elongator Komplexes dar. Typisch für Elp3 und gleichzeitig einzigartig ist die Kombination einer Radikal-SAM-Domäne (N-terminal) mit einer HAT-Domäne (C-terminal). Vom Elp3 Homolog aus dem Archaeen *Methanocaldococcus jannaschii* ist bekannt, das Elp3 mit Hilfe dreier konservierter Cystein-Reste innerhalb der Radikal-SAM-Domäne ein [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, SAM bindet und spaltet (Paraskevopoulou et al., 2006). Das dabei entstehende 5'-Deoxyadenosylradikal könnte an katalytischen Reaktionen, wie die der tRNA-Modifikation, beteiligt sein. Arbeiten an Hefe und *Arabidopsis thaliana* Elp3 konnten die Existenz eines Eisen-Schwefel-Clusters [4Fe-4S] ebenfalls in diesen Protein-Homologen bestätigen (Osita Onuma, Doktorarbeit 2011). Greenwood et al. (2009) spekulieren über eine Elongator-Komplex stabilisierende Wirkung des [Fe-S]-Clusters, da Cystein-Mutationen zur Destabilisierung des Elongators führen. Eine katalytische Funktion des [Fe-S] Klusters wird von den Autoren ausgeschlossen, da es für die HAT-Aktivität oder für RNA-Bindung nicht benötigt wird (Greenwood et al., 2009). Unsere Daten zeigen jedoch, dass Mutationen der [Fe-S]-koordinierenden Cysteine zur Resistenz im γ -Toxin-Test (Onuma, Doktorarbeit 2011) sowie im Killer Eklipse-Assay führen und damit die Elongator-abhängige tRNA-Modifikation grundlegend beeinflussen. Interaktionsstudien von Elp3 Mutanten (C108A und TM=C108A/C118A/C121A) mit der größten Elongator Untereinheit Elp1 konnten Protein-Wechselwirkungen feststellen. Diese sind jedoch im Vergleich zum Elp3 Wildtyp-Protein reduziert und korrelieren mit einer gesteigerten Elp3 Instabilität. Die beobachtete Elp3 Instabilität ist wahrscheinlich nicht die Ursache einer defekten tRNA-Modifikation, da weitere Cysteinmutationen außerhalb des AdoMet-Motivs (C224A/C236A) ebenfalls in einer verstärkten Elp3 Degradation resultieren, aber die tRNA-Modifikation nicht beeinflussen. Das in Elp3 gebundene [4Fe-4S]-Cluster könnte demnach nicht nur einen strukturellen Aspekt erfüllen, sondern an radikalischen Reaktionen beteiligt sein, welche für die U₃₄ Modifikation wichtig sind.

Wir untersuchten in dieser Arbeit ebenfalls den Einfluss der Elp3 Cystein-Substitutionen auf die Kti11 Interaktion. Hier zeigte sich, dass für die Kti11-Elp3 Bindung das [4Fe-4S]-Cluster in Elp3 benötigt wird und Cystein-Mutationen (C108A, TM=C108A, C118A, C121A) im Adomet-Motiv die Proteinwechselwirkung negativ beeinflussen. Da gezeigt wurde, dass trotz assembliert vorliegendem Elongator die Kti11 Interaktion mit AdoMet-Elp3-Mutanten gestört

ist (C108A), ist eine Elp3 vermittelte Kti11-Elongator-Interaktion denkbar. Unsere Beobachtungen wurden 2009 durch Greenwood et al. bestätigt. Die Autoren fanden heraus, dass neben Kti11 auch das Elongator-bindende Protein Kti12 eine intakte AdoMet-Domäne für die Elongator-Wechselwirkung benötigt.

Interessanterweise partizipiert Kti11 in zwei Biosynthesewegen, die wahrscheinlich beide einen radikalischen Reaktionsmechanismus, für die Modifizierung vom eEF2 auf der einen Seite und Uridin in tRNAs auf der anderen Seite, nutzen. Beide Biosynthesewege sind dabei von der Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters in den katalytischen Untereinheiten abhängig (Elp3, Dph1/Dph2) (Paraskevopoulou et al., 2006; Greenwood et al., 2009; O. Onuma, Doktorarbeit 2011; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Eisenbindung in Kti11 essentiell für die Funktion dieser Proteine ist. Trotz intensiver Studien bleibt der genaue molekulare und biochemische Mechanismus von Kti11 in diesen Synthesewegen unbekannt. Jedoch könnte die gezeigte Redoxaktivität von Kti11 für die Aufrechterhaltung des reduzierten Redoxzustandes der [4Fe-4S]-Cluster in Elp3 und Dph1/Dph2 benötigt werden.

5. Zusammenfassung

KTI11 alias *DPH3*, kodiert für ein kleines, hoch konserviertes Zink-Finger Protein der *Zn-ribbon* Klasse. *Kti11* interagiert mit mindestens drei verschiedenen Proteinen oder Proteinkomplexen: dem Dph-Komplex, der für die Diphthamid Biosynthese am eukaryotischen Translationsfaktor 2 (eEF2) notwendig ist, dem Elongator-Komplex, der an der wobble Uridin Modifikation eukaryotischer tRNA-Spezies beteiligt ist und *Kti13*, einem potentiellen Elongator-Regulator. Eine Computer-basierte Suche nach möglichen Homologen in *Arabidopsis thaliana* zeigte, dass *At2g151910* homolog zum Hefe *KTI11* Gen ist. Durch Komplementation einer *kti11* Hefe Mutante mit dem Pflanzgen konnten wir nachweisen, dass *At2g151910* für ein funktionell konserviertes Protein (*AtKti11*) kodiert. Geeignete Bioassays wurden etabliert, um die *Kti11* Funktionalität in Hefe zu testen und die Möglichkeit der *Kti11* Substitution durch *At2g151910* nachzuweisen. Protein biochemische Studien in Hefe zeigten, dass vergleichbar *Kti11*, *AtKti11* mit *Dph1*, *Dph2*, *Kti13* und dem Elongator-Komplex interagiert. TAP-Aufreinigungen mit *AtKti11* *in planta* identifizierten den Elongator-Komplex und ein bisher uncharakterisiertes Protein (*At1g27060*) als mögliche Interaktionspartner. Für *At1g27060* konnten wir zeigen, dass es ein *Kti13* Ortholog darstellt und funktionell in Hefe ist. Die Interaktion zwischen *Kti11* und *Kti13* ist in *E. coli* möglich und daher unabhängig von weiteren Hefeproteinen.

Rekombinant exprimiertes *Kti11* aus *E. coli* zeigte eine Eisen-Bindekapazität. Diese Eigenschaft konnte auch für *Kti11* aus Hefe bestätigt werden. Eine reversible Oxidation von *Kti11* deutet auf eine mögliche Funktion als Elektronen-Überträger hin. Vier hoch konservierte Cystein-Reste sind an der Eisenbindung beteiligt. Individuelle Mutationen von drei der vier Cystein-Reste resultieren in einem dominant-negativen Phänotyp der die tRNA Modifikation beeinflusst jedoch keine Auswirkung auf die Diphthamid-Biosynthese hat. Die vierte Cystein Mutation hingegen resultiert in einem rezessiven *loss-of-function* Phänotyp. Interaktionsstudien zeigten, dass der dominant-negative Phänotyp mit einer intakten Elongator-Bindung der defekten *Kti11*-Varianten korreliert. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Wechselwirkung einer defekten *Kti11*-Variante mit einer Elongator-Untereinheit die Funktion des intakten *Kti11* Proteins in der tRNA Modifikation blockiert.

Der biochemische Reaktionsmechanismus der Elongator-abhängigen tRNA Modifikation ist bis heute ungeklärt, jedoch wird ein radikalischer Mechanismus vermutet, da die Elongator-Untereinheit 3 eine radikal-SAM Domäne trägt. Mutationen die zum Verlust des [4Fe-4S]-Clusters in *Elp3* führen, beeinflussen die *Kti11* Interaktion, während der Elongator assembliert vorliegt. Aufgrund dieser Daten und mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, dass *Kti11* Redoxaktivität aufweist, schlagen wir eine mögliche *Kti11* Funktion in der Aufrechterhaltung des reduzierten Redoxzustandes der katalytischen Untereinheit 3 vor.

6. Literatur

- Agris P.F. (1991). Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: A modified-wobble hypothesis. *Biochemie* **73**: 1345–1349
- Agris P.F. (2004). Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Res.* **32**: 223–238
- Agris P.F., Vendeix FA, Graham WD. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* **366**: 1–13.
- Agris, P.F. (1996). The importance of being modified: Roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **53**: 79–129.
- Balk J., Pierik A. J., Netz D. J. A., Mühlenhoff U., Lill R. (2004). The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron–sulphur proteins. *EMBO J.* **23**: 2105–2115
- Baraldi E., Carugo, K.D., Hyvonen, M., Surdo, P.L., Riley, A.M., Potter, B.V., O'Brien, R., Ladbury, J.E. and Saraste, M. (1999) Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Structure Fold. Des.*, **7**, 449–460.
- Bauer F, Matsuyama A, Candiracci J, Dieu M, Scheliga J, Wolf DA, Yoshida M, Hermand D. (2012). Translational Control of Cell Division by Elongator. *Cell Rep.* **1**:424-433.
- Begley, U., M. Dyavaiah, A. Patil, J. P. Rooney, D. DiRenzo, C. M. Young, D. S. Conklin, R. S. Zitomer & T. J. Begley, (2007) Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Mol Cell* **28**: 860-870.
- Berry MB, Phillips GN Jr. (1998). Crystal structures of *Bacillus stearothermophilus* adenylate kinase with bound Ap5A, Mg²⁺ Ap5A, and Mn²⁺ Ap5A reveal an intermediate lid position and six coordinate octahedral geometry for bound Mg²⁺ and Mn²⁺. *Proteins* **32**: 276-288
- Birnboim H., Doly C.J. (1983). A rapid alkali extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255
- Bischoff F. R., Postingl H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**: 80–82.
- Björk G.R. (1995). Genetic dissection of synthesis and function of modified nucleosides in bacterial transfer RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **50**: 263-338
- Björk, G.R., Ericson J.U., Gustafsson C.E., Hagervall T.G., Jönsson Y.H., Wikström P.M. (1987). Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 263–287.
- Bochkareva, E., Korolev, S. & Bochkarev, A. (2000). The role for zinc in replication protein A. *J Biol Chem* **275**: 27332-8.
- Bonomi F, Iametti S, Kurtz DM, Ragg EM, Richie KA. (1998). Direct metal ion substitution at the [M(SCys)(4)](2-) site of rubredoxin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* **3**: 595–605.
- Bradford M.M. (1976). Rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

- Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J. (2002). Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* **108**: 395-405
- Bulawa, C.E. (1992). CSD2, CSD3 and CSD4 genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1764-1776
- Butler A.R., O'Donnell R.W., Martin V.J., Gooday G.W., Stark M.J.R. (1991c). *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur. J. Biochem.* **199**: 483-488
- Butler A.R., Porter M., Stark M.J.R. (1991b). Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin γ subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutants. *Yeast* **7**: 617-625
- Butler A.R., White J.H., Folawiyo Y., Edlin A., Gardiner D., Stark M.J.R. (1994). Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6306-6316
- Butler A.R., White J.H., Stark M.J.R. (1991a). Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1749-1757
- Cha JH, Brooke JS, Eidels L. (1999). Hamster diphtheria toxin receptor: a naturally occurring chimera of monkey and mouse HB-EGF precursors. *Biochem Biophys Res Commun.* **254**:325-9.
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O. (1999). Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18**:2930-40.
- Chen, Z., Zhang, H., Jablonowski, D., Zhou, X., Ren, X., Hong, X., Schaffrath, R., Zhu, J. K., and Gong, Z. (2006). Mutations in ABO1/ELO2, a subunit of holo-Elongator, increase abscisic acid sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 6902-6912
- Chen, C., Tuck, S., and Byström, A. S. (2009). Defects in tRNA modification associated with neurological and developmental dysfunctions in *Caenorhabditis elegans* elongator mutants. *PLoS Genet.* **5**: e1000561
- Chen C, Huang B, Eliasson M, Rydén P, Byström AS.(2011). Elongator complex influences telomeric gene silencing and DNA damage response by its role in wobble uridine tRNA modification. *PLoS Genet.* **7**:e1002258
- Chen, C. M. & R. R. Behringer, (2004) *Ovca1* regulates cell proliferation, embryonic development, and tumorigenesis. *Genes Dev* **18**: 320-332.
- Close, P., Hawkes, N., Cornez, I., Creppe, C., Lambert, C. A., Rogister, B., Siebenlist, U., Merville, M. P., Slaugenhaupt, S. A., Bours, V., Svejstrup, J. Q., and Charlot, A.(2006). Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol. Cell.* **22**: 521-531
- Cohen, L., Henzel, W. J., and Baeuerle, P. A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature.* **395**:292-296

- Collier, R. J. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*. **39**: 1793-1803
- Collier, R.J. (1967). Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J Mol Biol*. **25**:83-98.
- Collum, R. G., Brutsaert, S., Lee, G., and Schindler, C. (2000). A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokines signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 10120-10125
- Craig EA, Marszalek J. (2002). A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol Life Sci*. **59**:1658-65.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M. L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J. P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., and Nguyen, L. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell*. **136**: 551-564
- D'Silva PR, Lala AK. (1998). Unfolding of diphtheria toxin. Identification of hydrophobic sites exposed on lowering of pH by photolabeling. *J Biol Chem*. **273**:16216-22.
- da Costa PN, Romão CV, LeGall J, Xavier AV, Melo E, Teixeira M, Saraiva LM. (2001). The genetic organization of *Desulfovibrio desulphuricans* ATCC 27774 bacterioferritin and rubredoxin-2 genes: involvement of rubredoxin in iron metabolism. *Mol Microbiol*. **41**:217-27.
- Daugeron MC, Lenstra TL, Frizzarin M, El Yacoubi B, Liu X, Baudin-Baillieu A, Lijnzaad P, Decourty L, Saveanu C, Jacquier A, Holstege FC, de Crécy-Lagard V, van Tilbeurgh H, Libri D. (2011). Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t6A modification of tRNAs. *Nucleic Acids Res*. **39**:6148-60.
- Day CD, Galgoci BF, Irish VF. (1995). Genetic ablation of petal and stamen primordia to elucidate cell interactions during floral development. *Development*. **121**:2887-95.
- DeFraia, C. T., Zhang, X., and Mou, Z. (2010). Elongator subunit 2 is an accelerator of immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J*. **64**: 511-523
- Downey M, Houlsworth R, Maringele L, Rollie A, Brehme M, Galicia S, Guillard S, Partington M, Zubko MK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt JF, Harrington L, Lydall D, Durocher D. (2006). A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell*. **124**:1155-68.
- Draper RK, Simon MI. (1980). The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol*. **87**:849-54.
- Eidsness MK, O'Dell SE, Kurtz DM Jr, Robson RL, Scott RA. (1992). Expression of a synthetic gene coding for the amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin. *Protein Eng*. **5**:367-71.
- El Yacoubi B, Hatin I, Deutsch C, Kahveci T, Rousset JP, Iwata-Reuyl D, Murzin AG, de Crécy-Lagard V. (2011). A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *EMBO J*. **30**:882-93
- Esberg, A., Huang, B., Johansson, M. J., and Bystrom, A. S. (2006). Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis. *Mol. Cell*. **24**: 139-148

- Falcone, A., Nelissen, H., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., and Bitoni, M. B. (2007). Cytological Investigation of the *Arabidopsis thaliana* *elo1* Mutant Give New Insights into Leaf Lateral Growth and Elongator Function. *Annals Bot.* **100**: 261-270
- Fellows J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q. (2000). The Elp2 subunit of elongator and elongating RNA polymerase II holoenzyme is a WD40 repeat protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 12896-12899
- Fichtner L., Frohloff F., Bürkner K., Larsen M., Breunig K.D., Schaffrath R. (2002a). Molecular analysis of *KTI12/TOT4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol. Microbiol.* **43**: 783-791
- Fichtner L., Frohloff F., Jablonowski D., Stark M.J.R., Schaffrath R. (2002b). Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol. Microbiol.* **45**: 817-826
- Fichtner L., Jablonowski D., Frohloff F., Schaffrath R. (2003a). Phenotypic analysis of the *Kluyveromyces lactis* killer phenomenon. In: Wolf, K., K.D. Breunig, G. Barth (eds) Nonconventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. *Springer Verlag Berlin*: 179-183
- Fichtner L., Jablonowski D., Schierhorn A., Kitamoto H.K., Stark M.J.R., Schaffrath R. (2003b). Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol. Microbiol.* **49**: 1297-1307
- Fichtner L., Schaffrath R. (2002). *KTI11* and *Kti13*, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol. Microbiol.* **44**: 865-875
- Frohloff F., Fichtner L., Jablonowski D., Breunig K.D., Schaffrath R. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *EMBO J.* **20**: 1993-2003
- Frohloff F., Jablonowski D., Fichtner L., Schaffrath R. (2003). Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA polymerase II Elongator (γ -toxin target (TOT)) complex. *J. Biol. Chem.* **278**: 956-961
- Gietz R.D. and Schiestl R.H. (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 255-269
- Glatt S, L  toquart J, Faux C, Taylor NM, S  raphin B, M  ller CW. (2012). The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase. *Nat Struct Mol Biol.* **19**:314-20
- Gomes CM, Silva G, Oliveira S, LeGall J, Liu MY, Xavier AV, Rodrigues-Pousada C, Teixeira M. (1997). Studies on the redox centers of the terminal oxidase from *Desulfovibrio gigas* and evidence for its interaction with rubredoxin. *J Biol Chem.* **272**:22502-8.
- Greenwood, C., Selth, L. A., Dirac-Svejstrup, A. B., and Svejstrup, J. Q. (2009). An iron-sulfur cluster domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *J. Biol. Chem.* **284**: 141-149
- Grishin NV. (2000). C-terminal domains of *Escherichia coli* topoisomerase I belong to the zinc-ribbon superfamily. *J Mol Biol.* **299**:1165-77.

- Gunge N., Tamaru A., Ozawa F., Sakaguchi K. (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* **145**: 382-390
- Hadjebi O, Casas-Terradellas E, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL. (2008). The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochim Biophys Acta.* **1783**:1467-79
- Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. D.M. Glover (ed.) DNA cloning. *IRL Press*
- Hard T., Rak,A., Allard,P., Kloo,L. and Garber,M. (2000) The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold. *J. Mol. Biol.*, **296**, 169–180.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a Mesophilic eubacterium. *Cell.* **107**:679–688.
- Hawkes, N. A., Otero, G., Winkler, G. S., Marshall, N., Dahmus, M. E., Krappmann, D., Scheidereit, C., Thomas, C. L., Schiavo, G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2002). Purification and characterization of the human elongator complex. *J. Biol. Chem.* **277**: 3047-3052
- Hayman G.T., Bolen P.L. (1991). Linear DNA plasmids of *Pichia inositolivora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet.* **19**: 389-393
- Huang B., Johansson M.J., Bystrom A.S. (2005). An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA.* **11**: 424-436
- Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.* 1994 **13**:2322-30.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669.
- Jablonowski D., Butler A.R., Fichtner L., Gardiner D., Schaffrath R., Stark M.J.R. (2001c). Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Genetics* **159**: 1479-1489
- Jablonowski D., Fichtner L., Frohloff F., Schaffrath R. (2003). Chitin binding capability of the zymocin complex from *Kluyveromyces lactis*. In: Wolf, K., K.D. Breunig, G. Barth (eds) *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer-Verlag Berlin: 191-194
- Jablonowski D., Fichtner L., Martin V.J., Klassen R., Meinhardt F., Stark M.J.R., Schaffrath R. (2001a). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zymocin receptor. *Yeast* **18**: 1285-1299
- Jablonowski D., Fichtner L., Stark M.J.R., Schaffrath R. (2004). The yeast Elongator histone acetylase requires Sit4-dependent dephosphorylation for toxin-target capacity. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 1459-1469

- Jablonowski D., Frohloff F., Fichtner L., Stark M.J.R, Schaffrath R. (2001b). *Kluyveromyces lactis* zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator. *Mol. Microbiol.* **42**: 1095-1106
- Jablonowski D., Zink S., Mehlgarten C., Daum G., Schaffrath R. (2006). tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol Microbiol.* **59**: 677-688
- Kamper, J., K. Esser, N. Gunge & F. Meinhardt, (1991) Heterologous gene expression on the linear DNA killer plasmid from *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* **19**: 109-118.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* **10**: 103–105
- Kaul P, Silverman J, Shen WH, Blanke SR, Huynh PD, Finkelstein A, Collier RJ. (1996). Roles of Glu 349 and Asp 352 in membrane insertion and translocation by diphtheria toxin. *Protein Sci.* **5**:687-92.
- Kim, J. H., W. S. Lane and D. Reinberg, 2002 Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1241–1246.
- Kirkpatrick D., Solomon F. (1994). Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics.* **137**: 381-392
- Kishida M., Tokunaga M., Katayose Y., Yajima H., Kawamura-Watabe A., Hishinuma F. (1996). Isolation and genetic characterization of pGKL killer-insensitive mutants (*iki*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 798-801
- Kisseleva-Romanova E, Lopreiato R, Baudin-Baillieu A, Rousselle JC, Ilan L, Hofmann K, Namane A, Mann C, Libri D. (2006). Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J.* **25**:3576-85
- Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., Nasmyth K., Schiebel E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972
- Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **2003**;31:532–50.
- Krogan N., Greenblatt J.F. (2001). Characterisation of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 8203-8212
- Kümmerle R, Zhuang-Jackson H, Gaillard J, Moulis JM. (1997). Site-directed mutagenesis of rubredoxin reveals the molecular basis of its electron transfer properties. *Biochemistry.* **36**:15983-9
- Larsen, M., N. Gunge & F. Meinhardt, (1998) *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: evidence for a viral-like capping enzyme encoded by ORF3. *Plasmid* **40**: 243-246.
- LeGall J, Liu MY, Gomes CM, Braga V, Pacheco I, Regalla M, Xavier AV, Teixeira M. (1998). Characterisation of a new rubredoxin isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* 27774: definition of a new family of rubredoxins. *FEBS Lett.* **429**:295-8.

- Lemichez, E., M. Bomsel, G. Devilliers, J. vanderSpek, J.R. Murphy, E.V. Lukianov, S. Olsnes, and P. Boquet. 1997. Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol. Microbiol.* **23**:445–457.
- Li, Y., Y. Takagi, Y. Jiang, M. Tokunaga, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & R. D. Kornberg, (2001) A multiprotein complex that interacts with RNA polymerase II elongator. *J Biol Chem* **276**: 29628-29631.
- Li, Q., A. M. Fazly, H. Zhou, S. Huang, Z. Zhang & B. Stillman, (2009) The elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents. *PLoS Genet* **5**: e1000684.
- Lill, R. and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 669-700
- Liu, S., G. T. Milne, J. G. Kuremsky, G. R. Fink & S. H. Leppla, (2004) Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol Cell Biol* **24**: 9487-9497.
- Liu, S., J. F. Wiggins, T. Sreenath, A. B. Kulkarni, J. M. Ward & S. H. Leppla, (2006) Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development. *Mol Cell Biol* **26**: 3835-3841.
- Liu S, Leppla SH. (2003). Retroviral insertional mutagenesis identifies a small protein required for synthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins. *Mol Cell* **12**: 603-13.
- Lovenberg W, Sobel BE. (1965). Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **54**: 193-9.
- Lu, J., B. Huang, A. Esberg, M. J. Johansson & A. S. Bystrom, (2005) The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* **11**: 1648-1654.
- Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, Thornton JM. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* **1**:REVIEWS001
- Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou XL, Culbertson M, Bussey H, Kung C. (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 6228-32.
- Martinez-Yamout M, Legge GB, Zhang O, Wright PE, Dyson HJ. (2000). Solution structure of the cysteine-rich domain of the *Escherichia coli* chaperone protein DnaJ. *J Mol Biol.* **300**: 805-18.
- Mattheakis, L. C., W. H. Shen & R. J. Collier, (1992) DPH5, a methyltransferase gene required for diphthamide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 4026-4037.
- Mattheakis LC, Sor F, Collier RJ. (1993). Diphthamide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: structure of the DPH2 gene. *Gene.* **132**: 149-54.
- McCusker JH, Perlin DS, Haber JE. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **7**: 4082-8.

- McKenna EJ, Coon MJ (1970). "Enzymatic omega-oxidation. IV. Purification and properties of the omega-hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*". *J. Biol. Chem.* **245**: 3882–9.
- Mehlgarten, C., Schaffrath R. (2004). After chitin docking, toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin requires *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell. Microbiol.* **6**: 569-580
- Mehlgarten, C., Jablonowski, D., Breunig, K. D., Stark, M. J. R., and Schaffrath, R. (2009). Elongator function depends on antagonistic regulation by casein kinase Hrr25 and protein phosphatase Sit4. *Mol. Microbiol.* **73**: 869-881
- Mehlgarten, C., Jablonowski, D., Wrackmeyer, U., Tschitschmann, S., Sondermann, D., Jäger, G., Gong, Z., Byström, A. S., Schraffrath, R., and Breunig, K. D. (2010). Elongator function in tRNA wobble uridine modification is conserved between yeast and plants. *Mol. Microbiol.* **76**: 1082-1094
- MIDDLEBROOK, J. L., DORLAND, R. B. and LEPLA, S. H. (1978) Association of diphtheria toxin with Vero cells. *J. Biol. Chem.* **253**: 7325-7330.
- Moehring, J. M., Moehring, T. J., and Danley, D. E. (1980). Post-translational modification of elongation factor 2 in diphtheria toxin-resistant mutants of CHO-K1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 1010-1014
- Moehring, T. J., Danley, D. E. and Moehring, J. M. (1984). In vitro biosynthesis of diphthamide, studied with mutant Chinese hamster ovary cells resistant to diphtheria toxin. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 642-650.
- Moura, I., Moura, J. J., Santos, M. H., Xavier, A. V., and LeGall, J. (1979). Redox studies of rubredoxins from sulphate and sulphur reducing bacteria. *FEBS Lett.* **107**: 419-421
- Mühlenhoff U, Balk J, Richhardt N, Kaiser JT, Sipos K, Kispal G, Lill R. (2004). Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**: 36906-15.
- Nasvall, S. J., P. Chen & G. R. Bjork, (2004) The modified wobble nucleoside uridine-5-oxyacetic acid in tRNA^{Pro}(cmo5UGG) promotes reading of all four proline codons in vivo. *RNA* **10**: 1662-1673.
- Nelissen, H., Fleury, D., Bruno, L., Robles, P., De Veylder, L., Traas, J., Micol, J. L., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Lijsebettens, M. (2005). The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 7754-7759
- Nelissen, H., De Groeve, S., Fleury, D., Neyt, P., Bruno, L., Bitonti, m. B., Vandenbussche, F., Van der Straeten, D., Yamaguchi, T., Tsukaya, H., Witters, E., De Jaeger, G., Houben, A., and Van Lijsebettens, M. (2010). Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**: 1678-1683
- Okada, Y., K. Yamagata, K. Hong, T. Wakayama & Y. Zhang, (2010) A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* **463**: 554-558.
- Ortiz, P. A., R. Ulloque, G. K. Kihara, H. Zheng & T. G. Kinzy, (2006) Translation elongation factor 2 anticodon mimicry domain mutants affect fidelity and diphtheria toxin resistance. *J Biol Chem* **281**: 32639-32648.

- Otero, G., J. Fellows, Y. Li, T. de Bizemont, A. M. Dirac, C. M. Gustafsson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & J. Q. Svejstrup, (1999) Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* **3**: 109-118.
- Papini E, Sandoná D, Rappuoli R, Montecucco C. (1988). On the membrane translocation of diphtheria toxin: at low pH the toxin induces ion channels on cells. *EMBO J.* **7**: 3353-9.
- Paraskevopoulou, C., S. A. Fairhurst, D. J. Lowe, P. Brick & S. Onesti, (2006) The Elongator subunit Elp3 contains a Fe₄S₄ cluster and binds S-adenosylmethionine. *Mol Microbiol* **59**: 795-806.
- Petrakis, T. G., Søgaaard, T. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2005). Physical and functional interaction between Elongator and the chromatin-associated Kti12 protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 19454-19460
- Otero G., Fellows J., Li T.Y., de Bizemont, Dirac A.M., Gustafsson C.M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongating. *Mol. Cell.* **3**: 109-118
- Phillips NJ, Zeigler MR, Deaven LL (May 1996). "A cDNA from the ovarian cancer critical region of deletion on chromosome 17p13.3". *Cancer Lett* **102** (1-2): 85–90.
- Pokholok, D. K., Hannett, N. M., and Young, R. A. (2002). Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol. Cell.* **9**: 799-809
- Proudfoot, M., S. A. Sanders, A. Singer, R. Zhang, G. Brown, A. Binkowski, L. Xu, J. A. Lukin, A. G. Murzin, A. Joachimiak, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, A. V. Savchenko & A. F. Yakunin, (2008) Biochemical and structural characterization of a novel family of cystathionine beta-synthase domain proteins fused to a Zn ribbon-like domain. *J Mol Biol* **375**: 301-315.
- Qian X, Gozani SN, Yoon H, Jeon CJ, Agarwal K, Weiss MA. (1993). Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIIS. *Biochemistry.* **32**: 9944-59.
- Ragsdale SW, Ljungdahl LG. (1984). Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents. *J Bacteriol.* **157**: 1-6.
- Rahl P.B., Chen C.Z., Collins R.N. (2005). Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell.* **17**: 841-853
- Renault L, Nassar N, Vetter I, Becker J, Klebe C, Roth M, Wittinghofer A. (1998). The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature.* **392**: 97-101.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann & B. Seraphin, (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-1032.
- Romanos M.A., Boyd A. (1988). A transcriptional barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid k1 of *Kluyveromyces lactis*: evidence that native k1 has novel promoters. *Nucleic Acids. Res.* **16**: 7333-7350

- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. **74**: 5463-5467
- Santos B., Duran A., Valdivieso M.H. (1997). *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2485-2496
- Schaffrath R., Soond S.M., Meacock P.A. (1995a). The DNA and RNA polymerase structural genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology* **141**: 2591-2599
- Schaffrath R., Soond S.M., Meacock P.A. (1995b). Cytoplasmic gene expression in yeast: a plasmid-encoded transcription system in *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Soc. Transactions* **23**: 128
- Schaffrath R., Meinhardt F., Meacock P.A. (1996). Yeast killer plasmid pGKL2: molecular analysis of UCS5, a cytoplasmic promoter element essential for ORF5 gene function. *Mol Gen Genet.* **250**: 286-294
- Schaffrath R., Meinhardt F., Meacock P.A. (1997a). *ORF7* of yeast plasmid pGKL2: analysis of gene expression *in vivo*. *Curr. Genet.* **31**: 190-192
- Schaffrath R., Stark M.J.R., Struhl K. (1997b). Toxin-mediated cell cycle arrest in yeast: the killer phenomenon of *Kluyveromyces lactis*. *Bioforum Int.* **1**: 83-85
- Schaffrath R., Breunig K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of *Kluyveromyces lactis*. *Fungal. Genet. Biol.* **30**: 173-190
- Schaffrath R., Meacock P.A. (2001). An SSB encoded by and operating on linear killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **18**: 1239-1247
- Schaffrath R., Meinhardt F. (2005). *Kluyveromyces lactis* zymocin and other plasmid-encoded yeast killer toxins. In: Schmitt, M.J., R. Schaffrath (eds.) *Microbial Protein Toxins*. Springer Verlag Berlin
- Schickel J., Helmig C., Meinhardt F. (1996). *Kluyveromyces lactis* killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1879-1886
- Schultz, D. C., Balasara, B. R., Testa, J. R., and Godwin, A. K. (1998). Cloning and localization of a human diphthamide biosynthesis-like protein-2 gene, DPH2L2, *Genomics*. **52**: 186-191
- Shen G, Antonkine ML, van der Est A, Vassiliev IR, Brettel K, Bittl R, Zech SG, Zhao J, Stehlik D, Bryant DA, Golbeck JH. (2002). Assembly of photosystem I. II. Rubredoxin is required for the *in vivo* assembly of F(X) in *Synechococcus* sp. PCC 7002 as shown by optical and EPR spectroscopy. *J Biol Chem.* **277**: 20355-66.
- Sherman F., Fink G.R. and Hicks J.B. (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York
- Shields C.M., Taylor R., Nazarenus T., Cheadle J., Hou A., Tapprich A., Haifley A., Atkin AL. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* Ats1p interacts with Nap1p, a cytoplasmic protein that controls bud morphogenesis. *Curr. Genet.* **44**: 184-194

- Singh M, Bhalla PL, Xu H, Singh MB. (2003). Isolation and characterization of a flowering plant male gametic cell-specific promoter. *FEBS Lett.* **542**: 47-52.
- Sjölinder M, Uhlmann J, Ponstingl H (2002) DelGEF, a homologue of the Ran guanine nucleotide exchange factor RanGEF, binds to the exocyst component Sec5 and modulates secretion. *FEBS Lett.* **532**: 211-215
- Sjölinder M., Uhlmann J., Ponstingl H. (2004) Characterisation of an evolutionary conserved protein interacting with the putative guanine nucleotide exchange factor DelGEF and modulating secretion. *Exp Cell Res.* **294**: 68-76
- Sprinzi M, Vassilenko KS. (2005). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **33**: D139-40.
- Stark M.J.R., Mileham A.J., Romanos M.A., Boyd A. (1984). Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* **12**: 6011-6030
- Stark M.J.R., Boyd A., Mileham A.J., Romanos M.A.. (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast* **6**: 1-29
- Stark M.J.R., Boyd A. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterisation of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J.* **5**: 1995-2002
- Su J.Y., Belmont L., Sclafani R.A. (1990). Genetic and molecular analysis of the SOE1 gene: a tRNA (3Glu) missense suppressor of yeast *cdc8* mutations. *Genetics* **124**: 523-531
- Sugisaki Y., Gunge N., Sakaguchi K., Yamasaki M. and Tamura G. (1984). Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* **144**: 241-245.
- Sun, J., J. Zhang, F. Wu, C. Xu, S. Li, W. Zhao, Z. Wu, J. Wu, C. Z. Zhou & Y. Shi, (2005) Solution structure of Kti11p from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel zinc-binding module. *Biochemistry* **44**: 8801-8809.
- Takita M., Castilho-Valavicius B. (1993). Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast* **9**: 589-598
- Tanguy-Rougeau C., Wesolowski-Louvel M., Fukuhara H. (1988) The *Kluyveromyces lactis* KEX1 gene encodes a subtilisin-type serine proteinase. *FEBS Lett.* **234**: 464-470
- Thakur A, Chitoor B, Goswami AV, Pareek G, Atreya HS, D'Silva P. (2012). Structure and mechanistic insights into novel iron-mediated moonlighting functions of human J-protein cochaperone, Dph4. *J Biol Chem.* **287**: 13194-205.
- Thorsness M K, Kandasamy M K, Nasrallah M E, Nasrallah J B (1993): Genetic Ablation of Floral Cells in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **5**: 253-261
- Tiggemann, M., Jeske S., Larsen M., Meinhardt F. (2001). *Kluyveromyces lactis* cytoplasmic plasmid pGKL2: heterologous expression of Orf3p and proof of guanylyltransferase and mRNA-triphosphatase activities. *Yeast* **18**: 815-825
- Tipper D.J., Schmitt M.J. (1991). Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2331-2338

- Tokunaga M., Wada N. and Hishinuma F. (1987). A novel yeast secretion vector utilizing secretion signal of killer toxin encoded on the yeast linear DNA plasmid pGKL1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 613-619
- Tokunaga M., Wada N. and Hishinuma, F. (1988). A novel yeast secretion signal isolated from 28K killer precursor protein encoded on the linear DNA plasmid pGKL1. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7499-7511
- Tokunaga M., Kawamura A. and Hishinuma F. (1989). Expression of pGKL killer 28K subunit in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of 28K subunit as a killer protein. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3435-3446
- Tokunaga M., Kawamura A., Kitada K. and Hishinuma F. (1990). Secretion of killer toxin encoded on the linear DNA plasmid pGKL1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 17274-17280
- Trilla, J.A., T. Cos, A. Duran, C. Roncero. 1997. Characterization of *CHS4 (CAL2)*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**: 795-807
- Trilla, J.A., A. Duran, C. Roncero. 1999. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **145**: 1153-1163
- Uhlmann J, Wiemann S, Ponstingl H. (1999). DelGEF, an RCC1-related protein encoded by a gene on chromosome 11p14 critical for two forms of hereditary deafness. *FEBS Lett.* **460**: 153-60.
- Van Leene J, Stals H, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Van Isterdael G, De Clercq A, Bonnet E, Laukens K, Remmerie N, Henderickx K, De Vijlder T, Abdelkrim A, Pharazyn A, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G. (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics.* **6**: 1226-38.
- Van Ness, B. G., J. B. Howard & J. W. Bodley, (1980) ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J Biol Chem* **255**: 10717-10720
- Webb TR, Cross SH, McKie L, Edgar R, Vizor L, Harrison J, Peters J, Jackson IJ. (2008). phthamide modification of eEF2 requires a J-domain protein and is essential for normal development. *J Cell Sci.* **121**: 3140-5.
- Weiler F., Rehfeldt K., Bautz F., Schmitt M.J. (2002). The Zygosaccharomyces bailii antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol.* **46**: 1095-1105
- Weiler F., Schmitt M.J. (2003). Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast Zygosaccharomyces bailii, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* **3**: 69-76
- Weinberg MV, Jenney FE Jr, Cui X, Adams MW. (2004). Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase. *J Bacteriol.* **186**: 7888-95.
- Wesolowski-Louvel M., Tanguy-Rougeau C., Fukuhara H. (1988). A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast Kluyveromyces lactis. *Yeast.* **4**: 71-81

- Wickner, R.B. (1996). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 109-139
- Wilson, D.W., P.A. Meacock. (1988). Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid encoded RNA polymerase of unique structure. *Nucleic. Acids Res.* **16**: 8097-8112
- Winkler, G.S., T.G. Petrakis, S. Ethelberg, M. Tokunaga, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J.Q. Svejstrup. (2001). RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **276**: 32743-32749
- Winkler G.S., Kristjuhan A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 3517-3522
- Wittschieben, B.O., G. Otero, T. de Bizemont, J. Fellows, H. Erdjument-Bromage, R. Ohba, Y. Li, C.D. Allis, P. Tempst, J.Q. Svejstrup. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell.* **4**: 123-128
- Worsham P.L., Bolen P.L. (1990). Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr Genet.* **18**: 77-80
- Yokoyama, S., T. Watanabe, K. Murao, H. Ishikura, Z. Yamaizumi, S. Nishimura & T. Miyazawa, (1985) Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4905-4909
- Yu M, Yang F, Chu W, Wang Y, Zhao H, Gao B, Zhao W, Sun J, Wu F, Zhang X, Shi Y, Wu Z. (2008). 3D local structure around Zn in Kti11p as a representative Zn-(Cys)₄ motif as obtained by MXAN. *Biochem Biophys Res Commun.* **374**: 28-32.
- Zabel, R., C. Bar, C. Mehlgarten & R. Schaffrath, (2008) Yeast alpha-tubulin suppressor Ats1/Kti13 relates to the Elongator complex and interacts with Elongator partner protein Kti11. *Mol Microbiol* **69**: 175-187.
- Zhang, Y., X. Zhu, A. T. Torelli, M. Lee, B. Dzikovski, R. M. Koralewski, E. Wang, J. Freed, C. Krebs, S. E. Ealick & H. Lin, (2010) Diphthamide biosynthesis requires an organic radical generated by an iron-sulphur enzyme. *Nature* **465**: 891-896.
- Zhu X, Kim J, Su X, Lin H. (2010). Reconstitution of diphthine synthase activity in vitro. *Biochemistry.* **49**: 9649-57.
- Zhu W, Zeng Q, Colangelo CM, Lewis M, Summers MF, Scott RA. (1996). The N-terminal domain of TFIIB from *Pyrococcus furiosus* forms a zinc ribbon. *Nat Struct Biol.* **3**: 122-4.
- Zhu, X., Dzikovski, B., Su, X., Torelli, A. T., Zhang, Y., Ealick, S. E., Freed, J. H., and Lin, H. (2011). Mechanistic understanding of *Pyrococcus hirokoshii* Dph2, a [4Fe-4S] enzyme required for diphthamide biosynthesis. *Mol. BioSys.* **7**: 74-81
- Ziman M, Chuang JS, Tsung M, Hamamoto S, Schekman R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **9**: 1565-76.
- Zink S., Mehlgarten C., Kitamoto H.K., Nagase J., Jablonowski D., Dickson R.C., Stark M.J., Schaffrath R. (2005). Mannosyl-diinositolphospho-ceramide, the major yeast plasma membrane sphingolipid, governs toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Eukaryot Cell.* **4**: 879-889

7. Anhang

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt wurden. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle/Saale, 30.08.2012

Rene Zabel

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karin Breunig für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas sowie für ihre stetige Unterstützung. Für ihre konstruktive Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen jeglicher Art, Anregungen und Diskussionen bin ich sehr dankbar.

Bei Herrn Prof. Dr. Raffael Schaffrath (Universität Kassel), möchte ich mich für die Betreuung zu Beginn dieser Dissertation bedanken.

Frau Dr. Mieke van Lijsebettens möchte ich danken für ihre Unterstützung bei meinem dreimonatigen Forschungsaufenthalt in Gent (Belgien). An dieser Stelle sei besonders Hilde zu danken, die mir die Welt der Pflanzengenetik zeigte. Steven danke ich für die netten Abende in Gent.

Bei Herrn Prof. Dr. Gary Sawers möchte ich mich für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der anaeroben Proteinreinigung bedanken. Basem Soboh danke ich für die konstruktive Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen jeglicher Art.

Ein großer Dank gilt Dr. Daili Aguilar-Netz und Dr. Antonio Pierik für ihre Hilfe, Unterstützung und Durchführung der ^{55}Fe Bindungsexperimente.

Ein besonderer Dank gilt, Renate, Daniel, Alexander, Stuti, Doreen, Caro, Lars Eike, Christian, Conny und natürlich Marina für die freundliche, kreative und stimulierende wissenschaftliche Atmosphäre.

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

Meiner Familie, meinen Großeltern und meiner Mutter möchte ich an dieser Stelle herzlich für die liebevolle Unterstützung danken. Dabei gebührt meiner Frau Olivia besonderer Dank. Für ihre moralische Unterstützung, den starken Rückhalt, das Verständnis, dass sie für meine Arbeit aufbrachte und die motivierenden Gespräche, die mir sehr viel Kraft gegeben haben.

LEBENS LAUFPERSÖNLICHE DATEN:

Name: Rene Zabel
Anschrift: Lettiner Weg 7c, 06193 Petersberg OT Morl
Geburtsdatum: 06. November 1980
Geburtsort: Halberstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

AUSBILDUNG UND BERUFLICHE QUALIFIKATION:

1987 - 1991 Grundschule „Anne-Frank“, Halberstadt

1991 - 1999 „Käthe-Kollwitz-Gymnasium“ in Halberstadt
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

2000 – 2005 Studium der Biologie (Dipl.) an der „Martin-Luther Universität Halle-
Wittenberg“

2005 – 2006 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der
Gruppe von Herrn PD Dr. habil. Raffael Schaffrath
Thema: „ *Zur Rolle von KTI13/ATS1 bei Elongator-verwandten
Prozessen in Saccharomyces cerevisiae*“
Abschluss: Diplom-Biologe

2006-2012 Promotionsarbeit am Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe Molekulargenetik von Frau
Professor Dr. Karin Breunig und Herrn PD Dr. habil. Raffael Schaffrath
(bis 2007)
Thema: „ *Struktur-Funktionsanalyse des Elongator-assoziierten Proteins
Kti11/Dph3 in Saccharomyces cerevisiae und Arabidopsis thaliana.*“

Halle/Saale, 30.08.2012