

**Proteinfaltung im Zytosol der Bäckerhefe**  
*Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
Juliane Schwarz  
aus München

München, 2006  
Korrektur eingereicht im Mai, 2008

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe weder anderwertig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Juliane Schwarz

München, den 20. September 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried in der Arbeitsgruppe von Dr. Katja Siegers durchgeführt und vor der Fakultät für Biologie von Prof. Dr. Stefan Jentsch vertreten.

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Sondergutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Stefan Jentsch

Prof. Dr. Jürgen Soll

Prof. Dr. F-Ulrich Hartl

24. November 2006

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Guha, S., and Hartl, F. U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *Embo J* 22, 5230-5240.

Grallath, S<sup>1</sup>., Schwarz, J. P<sup>1</sup>., Bottcher, U. M., Bracher, A., Hartl, F. U., and Siegers, K<sup>1</sup>. (2006). L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep* 7, 78-84.

<sup>1</sup> Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit beigetragen

Zusatz zur Dissertation:  
„Proteinfaltung im Zytosol der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“  
eingefügt im Mai, 2008

Inhalt

1. Richtigstellung
2. Widerruf
3. Betroffene Abbildungen
4. Diskussion
5. Quellen

## 1. Richtigstellung

Im Zuge des Verfassens dieser Arbeit bin ich meiner Quellenpflicht nicht in vollem Umfang nachgekommen. Im wesentlichen wurden Abbildungen vollständig oder in Teilen aus den unten angegebenen Publikationen, die ich als Co-Autor mitzeichne, entnommen, die entsprechenden Quellen im Text jedoch nicht oder nicht eindeutig zitiert.

Folgende Abbildungen wurden nicht korrekt zitiert:

Abb. 1.3 (S.7) <sup>1</sup>

Abb. 3.7 (S.99) <sup>2</sup>

Abb. 3.16 (S.110) <sup>1</sup>

Abb. 3.17 (S. 111) <sup>3</sup>

Abb. 3.18 (S.112) <sup>1</sup>

Abb. 3.20 (S.113) <sup>1</sup>

Abb. 3.23 (S.116) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grallath, S., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Bracher, A., Hartl, F. U., and Siegers, K. (2006). L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent-chain associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep* 7, 78-84.

<sup>2</sup> Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Guha, S., and Hartl, F. U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different downstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J* 22, 5230-5240.

<sup>3</sup> mit freundlicher Genehmigung von Dr. Silke Grallath zur Verfügung gestellt.

## 2. Widerruf

Leider hat sich inzwischen herausgestellt, dass die oben genannten Publikationen manipulierte, bzw. fabrizierte Daten enthalten. Als Konsequenz der nachgewiesenen Manipulationen wurden beide Publikationen unter der Koordination von Prof. Dr. F.U. Hartl zurückgezogen.

Ein entsprechender Widerruf wurde in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

<sup>1</sup> *EMBO Rep.* 2007 Nov; 8(11):1086

<sup>2</sup> *EMBO J* 2008 Jan 9; 27 (1):301

Wie aus dem Abschlussbericht einer diesbezüglich durch den Vizepräsidenten der MPG, Prof. Dr. Herbert Jäckle, durchgeführten Untersuchung hervorgeht, bin ich in keiner Weise für diese Datenveränderungen verantwortlich. Ich möchte an dieser Stelle mein tief empfundenes Bedauern ausdrücken, dass ich diese Manipulationen nicht verhindern konnte und dass die veränderten Daten Eingang in meine Dissertation gefunden haben.

### 3. Betroffene Abbildungen

Die veränderten Daten aus oben genannten Publikationen wurden in folgende Abbildungen meiner Dissertation übernommen:

#### Abb. 3.7 Co-migration zytosolischer Chaperone mit Ribosomen

Die Abbildung zeigt die Co-Fraktionierung zytosolischer Chaperone mit Ribosomen unter Bedingungen, in denen die Ribosomen als Polysomen (CHX) oder Monosomen (RNase) vorliegen. Leider enthält diese Abbildung in hohem Maße fabrizierte Daten, sodass deren Aussage, dass alle getesteten Chaperone mit der Ausnahme von Ssa1p mit translatierenden Ribosomen co-fraktionieren nicht haltbar ist.

#### Abb. 3.16 Co-Präzipitation zytosolischer Proteine aus Zellextrakten

Die Co-Präzipitation zytosolischer Chaperone mit gereinigtem, immobilisiertem MBP-Rpl25p aus Zellextrakten hat ergeben, dass der *Signal Recognition Particle* (Srp14-3HAp), NAC (Egd1p, Egd2p, Btt1p), und das Hsp70-Chaperon Ssb1/2p, jedoch nicht RAC (Ssz1p, Zuo1p) direkt oder indirekt mit Rpl25p interagieren. Da die gezeigte Darstellung des Experiments jedoch unzulässige Veränderungen von Helligkeit und Kontrast, sowie fabrizierte Daten enthält, ist das Ergebnis dieses Experiments so nicht haltbar.

Teilaspekte dieses Ergebnisses konnten jedoch in anderen, in der Dissertation gezeigten Experimenten bestätigt werden. Die Two-Hybrid-Analyse der Bindung zytosolischer Chaperone an Rpl25p (Abb. 3.13) zeigt, dass Ssb1/2p, Srp54p und Btt1p im Two-Hybrid mit Rpl25p interagieren, während dies für Ssz1p, Zuo1p, Egd1p und Egd2p nicht der Fall ist. Abb. 3.17 zeigt die Bindung gereinigter NAC-Komponenten (Egd1p und Btt1p) an immobilisiertes MBP-Rpl25p *in vitro*. Abb. 3.33 schliesslich bestätigt in einem unabhängigen Experiment, dass Egd1p und Ssb1p mit immobilisiertem MBP-Rpl25p aus Zellextrakten präzipitiert werden können.

#### Abb. 3.18 Die Bindung von Egd1p an Rpl25p wird durch den N-Terminus von Egd1p vermittelt

Diese Abbildung zeigt die Präzipitation von gereinigtem Egd1p, bzw. dessen Verkürzungsmutante Egd1 $\Delta$ 1-31p mit immobilisiertem MBP-Rpl25p, bzw. MBP als Kontrolle. Es wird gezeigt, dass die Verkürzungsmutante Egd1 $\Delta$ 1-31p im Gegensatz zum Volllängeprotein nicht in der Lage ist, an Rpl25p zu binden. Diese Abbildung wurde aus zwei unabhängigen Gelen zusammengefügt, ohne dies durch eine Trennlinie zu kennzeichnen. Ausserdem wurde die Spur Egd1p/MBP-Rpl25p (zweite Spur von links) in der Breite gestaucht. Es handelt sich dabei also um korrekte Originaldaten, die unzulässig dargestellt (das Weglassen der Trennlinie suggeriert, dass alle Proben auf einem Gel aufgetragen wurden) und unzulässig geschönt wurden (Stauchung).

Das Ergebnis dieses Experiments wird dadurch jedoch nicht verändert und kann zusätzlich dadurch unterstützt werden, dass auch andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass die N-terminale Verkürzung von Egd1p zum Verlust der Bindung an Rpl25p, bzw. Ribosomen führt (Franke et al, 2001; Wegrzyn et al, 2006).

#### Abb. 3.20 Co-Präzipitation gereinigter NAC-Komponenten

Auch diese Abbildung wurde aus zwei unabhängigen Gelen zusammengesetzt ohne dies entsprechend zu kennzeichnen. Die darin gezeigten Ergebnisse sind also richtig, jedoch nicht wissenschaftlich korrekt dargestellt.

Zusätzlich ist in Abb. 3.44c, die aus der Diplomarbeit von Ute Zeidler übernommen wurde, ein Fehler enthalten. Aus versehen wurde hier bei der Überexpression der verschiedenen GimC-Untereinheiten für Gim1p und Gim2p derselbe Ausschnitt einkopiert.

#### 4. Diskussion

Aufgrund der Übernahme dieser veränderten, bzw. fabrizierten Daten in den Ergebnisteil meiner Dissertation ist es nötig zu analysieren, ob und inwieweit sich dadurch die wissenschaftliche Aussage der Arbeit verändert.

Der Ergebnisteil meiner Dissertation gliedert sich in zwei unabhängige Teile. Zum einen die Untersuchung zytosolischer Chaperone im Umfeld des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels (Kap.3.1), zum anderen die Charakterisierung des Gim-Komplexes durch Analyse von Verkürzungsmutanten (Kap.3.2). Abbildungen aus den zurückgezogenen Veröffentlichungen wurden nur in Kap.3.1 übernommen. Folglich wird der Inhalt von Kap.3.2 durch die Manipulationen nicht berührt.

Die Grundaussage von Kap.3.1. ist, dass die ribosomale Untereinheit Rpl25p als Bindestelle zytosolischer Chaperone am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel dient. Diese Bindung wurde am Beispiel des naszente Ketten-assoziierten Komplexes NAC näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NAC an Ribosomen auf einer Interaktion von Rpl25p mit den ersten 30 Aminosäuren der  $\beta$ -NAC-Untereinheiten beruht. Die Hypothese, dass ein konserviertes Motiv aus 3 Aminosäuren, das die Bindung co-translational agierender Chaperone in *E. coli* vermittelt und das in leicht abgewandelter Form auch in Rpl25p vorkommt, als Bindestelle für NAC fungieren könnte, wurde durch gezielte Mutation dieses Motivs untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Motiv trotz der hohen Konservierung in der Hefe nicht die selbe Funktion erfüllt wie in Bakterien, da die Bindung co-translational bindender Chaperone (Egd1p, Ssb1/2p) an Rpl25p durch die Mutation nicht merklich beeinträchtigt wurde. Es muss also in der Hefe, bzw. in Rpl25p, noch weitere Elemente geben, die für die effiziente Bindung zytosolischer Chaperone an Ribosomen verantwortlich sind.

Vor diesem Hintergrund stellt die Co-migration zytosolischer Chaperone mit Ribosomen (Abb.3.7) ein einleitendes Experiment dar, auf das im weiteren Verlauf der Arbeit kein Bezug mehr genommen wird, da die Präzipitation von Ribosomen über Epitop-markiertes Rpl25p, bzw. Rpl4p als Alternative etabliert wurde. Im Zuge dieser Experimente (Abb. 3.10 und 3.12) konnte Rpl25p als Bindestelle für das Hsp70-Chaperon Ssb1/2p etabliert werden. Das Two Hybrid-Experiment (Abb. 3.13) zeigt, dass neben Ssb1/2p auch der *Signal Recognition Particle* (Srp54p) und NAC (Btt1p) in der Lage sind, mit Rpl25p zu interagieren. Dieses Ergebnis sollte unter physiologischen Bedingungen, durch Co-Präzipitation von Chaperonen mit gereinigtem MBP-Rpl25p aus Zellextrakt bestätigt werden. Jedoch auch ohne Berücksichtigung dieses Experiments konnte im weiteren Verlauf der Arbeit durch Analyse gereinigter Proteine eindeutig gezeigt werden, dass NAC über seine  $\beta$ -Untereinheiten mit Rpl25p interagiert (Abb. 3.17). Dass diese Bindung, zumindest im Fall von Egd1p, über einen Bereich des Proteins vermittelt wird, der in den ersten 30 N-terminalen Aminosäuren des Proteins liegt, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen (siehe oben) gezeigt werden. Die Aussage von Abb. 3.20, dass die Komplexbildung von NAC durch das Fehlen der ersten 30 Aminosäuren von Egd1p nicht beeinträchtigt wird, ist, wie oben erläutert, richtig, das Ergebnis jedoch unzulässig dargestellt, da nicht kenntlich gemacht wurde, dass sich die Abbildung aus zwei Gelen zusammensetzt. Dieses Ergebnis stellt jedoch nur eine Zusatzinformation dar und ist daher nicht kritisch für die Grundaussage der Arbeit.

Die Ergebnisse bezüglich der Untersuchung der Bedeutung von Btt1p (Kap. 3.1.6), der Untersuchung der Bindung von NAC an Rpl25-3HAp (Kap. 3.1.7) und der Charakterisierung der (NAC-) Bindestelle auf Rpl25p (Kap.3.1.8) sind von den Manipulationen nicht betroffen.

Die Grundaussage und die Schlussfolgerungen, die aufgrund der Experimente in den Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.5 getroffen wurden, sind also auch ohne Berücksichtigung der oben angegebenen manipulierten Abbildungen haltbar. Somit wird auch die Aussage des gesamten Kapitels 3.1 nicht maßgeblich beeinflusst oder verändert.

## 5. Quellen

Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Kohlerl, M., und Wiedmann, B. (2001) Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J Cell Sci* 114, 2641-2648.

Wegrzyn, R.D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C. und Deuerling, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem* 281, 2847-2857.

Glasgow, im Mai 2008  
Juliane Schwarz



## Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit, der sich mit der Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel beschäftigt, wurde die ribosomale Untereinheit Rpl25p, die in unmittelbarer Nähe des Polypeptid-Austrittstunnels liegt, als Bindestelle für zytosolische Chaperone, wie den naszente Ketten-assoziierten Komplex (NAC) identifiziert. Auch das Hsp70-Chaperon, Ssb1/2p, wurde in Assoziation mit Rpl25p gefunden. Diese Bindung wurde jedoch nicht näher untersucht. Bei der Etablierung einer Methode zur effizienten Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten, mittels Präzipitation über einen Epitop-tag an einer ribosomalen Untereinheit, wurde beobachtet, dass ein 3HA-Epitop an Rpl25p, im Gegensatz zu einem 6HA-Epitop an der selben Stelle und an einer anderen ribosomalen Untereinheit, Rpl4ap, im entsprechenden Hefestamm Wachstums- und Translationsdefekte hervorruft. Co-Präzipitationsversuche ergaben, dass sowohl die Assoziation des generellen Hsp70-Chaperons Ssb1/2p, als auch von NAC mit Ribosomen im *RPL25-3HA*-Hintergrund stark reduziert ist und lieferten damit eine mögliche Erklärung für die beobachteten Defekte. Durch *Two-Hybrid*-Interaktionen und Co-Präzipitationsexperimente mit immobilisiertem MBP-Rpl25p und Zellextrakten, bzw. gereinigten Chaperonen, konnte gezeigt werden, dass der naszente Ketten-assoziierte Komplex NAC spezifisch, über den N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit Egd1p, an Rpl25p bindet. Untersuchungen bezüglich der physiologischen Bedeutung der, nur in der Hefe vorhandenen, alternativen  $\beta$ -Untereinheit Btt1p, zeigten, sowohl im *Two-Hybrid*, als auch in Bindeexperimenten mit Zellextrakten oder gereinigtem Btt1p, dass auch Btt1p direkt mit Rpl25p interagiert. Die starke Sequenzhomologie der N-Termini der  $\beta$ -Untereinheiten, führte zu dem Schluss, dass auch Btt1p über seinen N-Terminus an Rpl25p bindet. Egd1p ist jedoch die vorwiegend im Komplex vorliegende  $\beta$ -Untereinheit. In Abwesenheit von Egd1p wird die Expression von Btt1p stark erhöht, um das Fehlen dieser Untereinheit zu kompensieren. Sequenzhomologien zwischen Rpl25p und seinem Homolog Rl23p aus *E. coli* sollten als Ausgangspunkt für die Identifizierung der Bindestelle zytosolischer Chaperone, wie NAC und Ssb1/2p an Rpl25p dienen. Versuche, Rpl25p funktionell durch Rl23p zu komplementieren, zeigten jedoch, dass weder Rl23p, noch ein chimäres Protein, in dem ein 50 Aminosäuren langer N-terminaler Anhang aus Rpl25p an das *E. coli*-Protein fusioniert wurde, die Funktion von Rpl25p in der Hefe übernehmen können. Alternativ wurde ein konserviertes Aminosäuremotiv von Rpl25p mutiert, das im *E. coli*-Protein als Bindestelle für das Chaperon Triggerfaktor dient und dessen Veränderung die Bindung von Triggerfaktor an Rl23p stark

reduziert. Die Veränderung dieses Motivs in Rpl25p bedingte zwar eine Reduktion der Bindung von Egd1p an Rpl25p, hatte jedoch keinen Effekt auf die Assoziation von Ssb1/2p mit Rpl25p. Daraus wurde gefolgert, dass nicht dieses Motiv allein für die Bindung zytosolischer Chaperone an Rpl25p verantwortlich ist. Dieser Befund führte außerdem zu der Spekulation, dass die Bindung von Egd1p und Ssb1/2p an Ribosomen durch verschiedene Bindestellen an Rpl25p vermittelt sein könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit, sollte der Beitrag, den einzelne Untereinheiten des Gim-Komplexes, GimC, zur Interaktion mit den Hauptsubstraten Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin leisten untersucht werden. Dazu wurden für jede Untereinheit Verkürzungsmutanten hergestellt, denen die C- und N-terminalen hydrophoben Bereiche fehlen, die diese Wechselwirkung wahrscheinlich vermitteln. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Deletionsmutanten, beeinträchtigen diese den Komplexaufbau nicht und erlauben daher direkte Rückschlüsse auf die Funktion der jeweiligen veränderten Untereinheit. Die Mutanten wurden zunächst einzeln bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber LatrunculinA und Benomyl, Chemikalien, die das Aktin-, bzw. Tubulin-System der Zellen beeinflussen, *in vivo* charakterisiert. Des Weiteren wurde die Kinetik der Aktinfaltung bei ausgesuchten Mutanten (*gim2NTCT*, *gim5NTCT*) gemessen. Diese *in vivo* Experimente gaben erste Hinweise darauf, dass nicht alle GimC-Untereinheiten für die Bindung jedes Substrats gleich wichtig sind, sondern, in Abhängigkeit vom Substrat, unterschiedliche Rollen spielen. Zum Beispiel scheint die Interaktion mit den Tubulinen vor allem von Gim5p abhängig zu sein, während die anderen Untereinheiten dazu einen geringen (Gim1p, Gim2p, Gim3p) oder gar keinen (Gim4p, Gim6p) Beitrag leisten. Auch bei der Interaktion mit Aktin spielt Gim5p, neben Gim2p, eine tragende Rolle. In diesem Fall führt auch die Verkürzung von Gim3p oder Gim4p zu leichten Defekten, wogegen eine Veränderung von Gim1p oder Gim6p keine Auswirkungen hat. Um diese Ergebnisse durch weiterführende Experimente *in vitro* validieren zu können, wurde eine Strategie entwickelt, die es erlaubt, den Gim-Komplex und verschiedene Mischformen davon effizient in der Hefe zu exprimieren und daraus zu reinigen. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmidsortiment geschaffen, das die starke Überproduktion des Wildtyp-Komplexes und von Mutanten, mit einer, oder bis zu sechs verkürzten Untereinheiten, unter Kontrolle des Kupfer-Promotors ermöglicht. Zur Reinigung dieser Komplexe aus der Hefe wurde ein bestehendes Protokoll abgewandelt und optimiert. Die Substrate, Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, wurden nach heterologer Expression in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* gewonnen.

Mit Hilfe dieser gereinigten Komponenten wurden der Wildtyp-Komplex und ausgewählte Mutanten, bei denen die  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p oder Gim5p alleine oder Gim2p und Gim5p

zusammen verkürzt waren, bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, die Aggregation denaturierten Aktins *in vitro* zu verhindern. Es zeigte sich, dass die Verkürzung der Gim2p-Untereinheit die Aktinbindung nur wenig beeinträchtigt, wogegen eine Veränderung der Gim5p-Untereinheit eine starke Reduktion gegenüber dem Wildtyp bewirkt. Die entsprechende Doppelmutante ist schließlich nicht mehr in der Lage, die Aggregation denaturierten Aktins zu verhindern. Dieses Ergebnis konnte durch Translationsexperimente bestätigt werden, bei denen die verschiedenen Gim-Komplexe bezüglich ihrer Fähigkeit getestet wurden, *de novo* synthetisiertes Aktin in Lösung zu halten. Auch hier hatte die Veränderung von Gim2p nur einen geringen Effekt, während eine Verkürzung von Gim5p zu einer drastischen Anreicherung des neu-synthetisierten Aktins in der unlöslichen Proteinfraction führte. In diesen Experimenten wurde erstmals auch der Beitrag dieser Untereinheiten zur Interaktion von GimC mit  $\alpha$ -Tubulin untersucht. Hier zeigte sich, dass alleine die Verkürzung der Gim5p-Untereinheit ausreicht, um die Wechselwirkung von GimC mit diesem Substrat komplett zu verhindern.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Ampere	dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat
AA	Acrylamid	ds	doppelsträngig
Abb.	Abbildung	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ad</i>	"zum Endvolumen auffüllen"	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase	EtOHabs.	Absoluter (>96%-iger) Ethanol
ADP	Adenosindiphosphat	evtl.	eventuell
AK	Antikörper	5'-FOA	5'-Fluor-orotsäure
Amp	Ampicillin	g	Gramm
As	Aminosäure(n)	GimC	<u>Genes involved in microtubule biogenesis</u> <u>Complex</u>
ATP	Adenosintriphosphat	GST	Glutathion-S-Transferase
$\alpha$ -Maus-AK	Anti-Maus-Antikörper	GuHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
bp	Basenpaar(e)	HA-Epitop	Hämagglutinin-Epitop
BSA	<u>Bovine Serum Albumin</u>	HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethan-sulfonsäure]
bzw.	beziehungsweise	HIS	Histidin
°C	Grad Celsius	His5MX	Heterologer Histidin-Auxotrophiemarker
ca.	circa	HRP	Meerrettich Peroxidase
CCT	<u>Chaperonin Containing TCP1</u>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
Chl	Chloramphenicol	IgG	ImmunglobulinG
Ci	Curie	IP	Immunpräzipitation
CIP	<u>Calf Intestinal Phosphatase</u>	<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
CNBr	Cyanbromid	<i>in vivo</i>	im lebenden Objekt
C-terminal	carboxyterminal	IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Da	Dalton	KanMX6	Heterologer Kanamycin Resistenzmarker
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	kb	Kilobasenpaar(e)
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	kDa	Kilodalton
<i>de novo</i>	„von neuem“, neu	kV	Kilovolt
DEPC	Diethylpyrocarbonat	l	Liter
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	LatA	LatrunculinA
d. h.	das heißt	LEU	Leucin
DMF	Dimethylformamid	lg	dekadischer Logarithmus
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNaseI	DesoxyribonukleaseI		
dNTP (N)	Desoxynukleosidtriphosphat		
DTSSP	Dithiobis (sulfosuccinimidylpropionat)		
DTT	Dithiotreitol		

In	natürlicher Logarithmus		DNA-Polymerase
m	Meter	PVDF	Polyvinylidenfluorid
M	Molar	RAC	<u>R</u> ibosome- <u>A</u> ssociated <u>C</u> omplex
mA	Milliampere	RNA	Ribonukleinsäure
<i>MAT</i> (a/α)	Paarungstyp (a/α)	RNaseA	RibonukleaseA
max.	maximal	rpm	Umdrehungen pro Minute
MBP	Maltose-Bindeprotein	RT	Raumtemperatur
mg	Milligramm	RTS	<u>R</u> apid <u>T</u> ranslation <u>S</u> ystem
Min.	Minute(n)	S	Svedberg
mind.	mindestens	[ <sup>35</sup> S]-	Mit dem <sup>35</sup> S-Isotop des Schwefels markiert
ml	Milliliter	SC	Synthetisches Medium
mM	Millimolar	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MPa	Megapascal	/Sc	
Mr	Molekulargewicht	SDS	Natriumdodecylsulfat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	Sek.	Sekunde(n)
Mt	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	SRP	<u>S</u> ignal <u>R</u> ecognition <u>P</u> article
Myc-Epitop	cMyc-Epitop	s.u.	siehe unten
μF	Mikrofarad	s. o.	siehe oben
μg	Mikrogramm	Std.	Stunde(n)
μm	Mikrometer / Mikromol	Tab.	Tabelle
μM	Mikromolar	<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
NAC	<u>N</u> ascent <u>c</u> hain- <u>A</u> ssociated <u>C</u> omplex	TCA	Trichlor-Essigsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Essigsäure	t <sub>D</sub>	Verdopplungszeit
ng	Nanogramm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
nm	Nanometer	TEV	<u>T</u> obacco <u>E</u> tch <u>V</u> irus
nmol	Nanomol	TRiC	<u>T</u> CP1 <u>r</u> ing <u>C</u> omplex
N-terminal	aminoterminal	Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
OD	Optische Dichte	Triton-X-100	t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm	TRP	Tryptophan
Ω	Ohm	Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TY	Trypton-Hefeextrakt (-Medium)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline	U	Enzymeinheiten [Units]
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	u.a.	unter anderem
PEG	Polyethylenglycol	URA	Uracil
Pellet	Zentrifugationssediment		
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>		
Primer	Startoligonukleotid für die		

UV	ultraviolettes Licht	WT	Wildtyp
V	Volt	[w/v]	Gewicht pro Volumen
v. a.	vor allem	x	mal (Vielfaches von)
vgl.	vergleiche	xg	Vielfaches der Erdanziehung
Vol.	Volumen	YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose (-Medium)
Vol-%	Volumenprozent	z. B.	zum Beispiel
[v/v]	Volumen pro Volumen		
W	Watt		

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Molekulare Chaperone .....	2
1.1.1	Chaperon-Netzwerke .....	3
1.2	Proteinfaltung im Hefezytosol .....	5
1.2.1	NAC .....	6
1.2.2	Ssb1/2p .....	8
1.2.3	RAC .....	9
1.2.4	GimC .....	10
1.2.5	TRiC .....	14
1.3	Zusammenspiel zwischen Translation und Protein <i>sorting</i> .....	16
1.4	Zielsetzung .....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material und Herstellernachweise .....	20
2.1.1	Stämme .....	20
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme .....	20
2.1.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme .....	20
2.1.2	Plasmide .....	23
2.1.3	.....	25
2.1.4	Oligonukleotide .....	26
2.1.5	Enzyme und Proteine .....	29
2.1.6	Antikörper .....	29
2.1.7	Größenstandards .....	30
2.1.8	Chemikalien .....	31
2.1.9	Puffer und Lösungen .....	33
2.1.10	Medien .....	35
2.1.11	Verwendete Kits .....	36
2.1.12	Sonstige Materialien .....	37
2.1.13	Geräte .....	37
2.2	Methoden .....	39
2.2.1	Mikrobiologische und genetische Methoden .....	39
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	39
2.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	39
2.2.1.2.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen .....	39
2.2.1.2.2	Herstellung und Transformation Elektroporations-kompetenter Zellen .....	40
2.2.1.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	40
2.2.1.4	Bestimmung der Zelldichte von <i>S. cerevisiae</i> .....	41
2.2.1.5	Bestimmung der Verdopplungszeit von Hefestämmen .....	41
2.2.1.6	Fermentation von Hefezellen im Großmaßstab .....	41
2.2.1.7	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	42
2.2.1.7.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	42
2.2.1.7.2	Transformation von Hefezellen .....	42
2.2.1.8	Replikaplattierung von Hefezellen .....	43
2.2.1.9	Kreuzung haploider <i>S. cerevisiae</i> Stämme .....	43
2.2.1.10	Bestimmung des Kreuzungstyps von <i>S. cerevisiae</i> .....	44
2.2.1.11	Genetische Manipulation von Hefezellen .....	44
2.2.1.11.1	Fusion eines Zielgens mit einem Epitop-tag .....	44
2.2.1.11.2	Gendisruption .....	45
2.2.1.11.3	Entfernen eines chromosomal integrierten Selektionsmarkers ( <i>Marker rescue</i> ) .....	46
2.2.1.12	Plasmid <i>shuffle</i> .....	46
2.2.1.13	<i>gap repair</i> .....	47

2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	47
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Birnboim and Doly, 1979).....	47
2.2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kits .....	48
2.2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAfilter <sup>™</sup> Plasmid Midi Kits .....	48
2.2.2.2	DNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i> .....	48
2.2.2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	48
2.2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	49
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	49
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
2.2.2.4.1	Kolonie-PCR an <i>E. coli</i> .....	51
2.2.2.5	DNA-Fällung.....	51
2.2.2.6	Enzymatische Modifizierung von DNA .....	52
2.2.2.6.1	Restriktionsverdau .....	52
2.2.2.6.2	Auffüllen überhängender DNA-Enden .....	52
2.2.2.6.3	Dephosphorylierung von DNA .....	52
2.2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	53
2.2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	53
2.2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	54
2.2.2.10	Ligation von PCR-Produkten mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) .....	54
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung.....	55
2.2.3	Biochemische Methoden .....	56
2.2.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>S. cerevisiae</i> .....	56
2.2.3.1.1	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen .....	56
2.2.3.1.2	TCA-Extraktion von Proteinen (denaturierende Proteinpräparation für Westernblotting) ..	56
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	57
2.2.3.2.1	Tris-Tricin SDS-Gelelektrophorese .....	58
2.2.3.3	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Westernblot) .....	59
2.2.3.3.1	PonceauS-Färbung von Membranen .....	59
2.2.3.3.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	60
2.2.3.4	Stripping von Westernblots .....	60
2.2.3.5	Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen durch Färbung.....	61
2.2.3.5.1	Coomassie-Färbung .....	61
2.2.3.5.2	Färbung nach Fairbanks .....	61
2.2.3.5.3	Kupferchlorid-Färbung (Lee et al., 1987) .....	62
2.2.3.6	Präparative Protein-Isolierung aus SDS-Polyacrylamidgelen .....	62
2.2.3.7	Trocknen von Proteingelen.....	63
2.2.3.8	Immunpräzipitation von Gesamtzellextrakten.....	63
2.2.3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	63
2.2.3.10	Reinigung rekombinanter 6His-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i> .....	64
2.2.3.10.1	Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	64
2.2.3.10.2	Lyse.....	64
2.2.3.10.3	Test auf Löslichkeit überproduzierter Proteine .....	65
2.2.3.10.4	Reinigung von 6His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	65
2.2.3.10.5	Isolierung von Proteinen aus Einschlusskörpern ( <i>inclusion bodies</i> ) .....	66
2.2.3.10.6	Waschen von <i>inclusion bodies</i> .....	66
2.2.3.10.7	Renaturierung gereinigter Proteine durch Dialyse .....	67
2.2.3.10.8	Reinigung rekombinanter 6His-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen .....	68
2.2.3.11	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen.....	68
2.2.3.12	Reinigung des Gim-Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i> .....	69
2.2.3.12.1	Aufschluss von Hefezellen im Großmaßstab .....	69
2.2.3.12.2	Bindung an IgG Sepharose und Elution mittels TEV-Protease.....	70
2.2.3.12.3	Ammoniumsulfatfällung .....	70
2.2.3.13	Reinigung des Gim-Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i> nach Überexpression .....	70
2.2.3.13.1	Aufschluss der Hefezellen .....	71
2.2.3.13.2	Affinitätschromatographie .....	71
2.2.3.13.3	Gelfiltration.....	72
2.2.3.13.4	Abspaltung des 6His-Epitops mittels TEV-Protease.....	73
2.2.3.13.5	Affinitätschromatographie zur Entfernung des 6His-Epitops und der TEV-Protease.....	73
2.2.3.13.6	Analytische Gelfiltration mit dem SMART-System.....	73
2.2.3.13.7	Umpuffern des gereinigten Gim-Komplexes .....	74
2.2.3.14	Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose .....	74



2.2.3.15	Kopplung von Antikörpern an ProteinA-Sepharose .....	75
2.2.3.16	Präzipitation zytosolischer Proteine mit immobilisiertem Rpl25p .....	76
2.2.3.17	<i>In vitro</i> Bindetests mit gereinigten Proteinen .....	77
2.2.3.17.1	Co-Präzipitation gereinigter Proteine mit immobilisiertem Rpl25p .....	77
2.2.3.17.2	Co-Präzipitation gereinigter Proteine mit $\alpha$ -Egd2p-ProteinA-Sepharose .....	77
2.2.3.18	Isolierung von Polysomen durch Dichtezentrifugation (Ribosomengradienten) .....	77
2.2.3.18.1	Herstellung von kontinuierlichen 20-50% Saccharosegradienten .....	78
2.2.3.18.2	Fraktionierung und Fällung der Ribosomengradienten .....	78
2.2.3.19	Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten mittels Epitop-tag .....	79
2.2.3.20	Prävention der Aggregation denaturierter Proteine durch zytosolische Chaperone .....	79
2.2.3.21	Crosslinking von gereinigtem GimC und Aktin .....	80
2.2.3.22	<i>In vitro</i> Transkription/Translation .....	80
2.2.3.23	Phosphoimaging und Quantifizierung .....	82
2.2.4	Zellbiologische Methoden .....	82
2.2.4.1	Pulse-Chase Faltungskinetik .....	82
2.2.4.2	Test der Sensitivität von Hefestämmen gegenüber Chemikalien .....	83
2.2.4.2.1	Herstellung serieller Verdünnungen .....	84
2.2.4.2.2	Plattendiffusionstest .....	84
2.2.4.3	<i>Two-Hybrid</i> .....	85
2.2.5	Immunologische Methoden .....	86
2.2.5.1	Generierung von Antikörpern .....	86
2.2.5.1.1	Gewinnung des Serums aus Blutproben .....	86
2.2.5.1.2	Untersuchung des Präimmunsersums und Bestimmung des Antikörpertiters im Streifenblot .....	86
2.2.5.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	87
2.2.5.2.1	Anreicherung spezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren .....	87
2.2.5.2.2	Depletion unspezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren .....	89
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>90</b>
3.1	Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone im Umfeld des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels .....	90
3.1.1	Herstellung von Hefestämmen und Antikörpern zum Nachweis zytosolischer Chaperone in <i>S. cerevisiae</i> .....	90
3.1.1.1	Herstellung Epitop-markierter Fusionsproteine .....	91
3.1.1.2	Herstellung polyklonaler Antikörper .....	93
3.1.1.3	Reinigung des $\alpha$ -Btt1p- und $\alpha$ -Egd1p-Antiserums .....	95
3.1.2	Co-migration von Ribosomen und zytosolischen Chaperonen .....	97
3.1.3	Präzipitation ganzer Ribosomen aus Zellextrakten .....	99
3.1.3.1	Isolierung von Ribosomen über Rpl25p .....	99
3.1.3.1.1	Untersuchung des Phänotyps des <i>RPL25-3HA</i> -Stammes .....	100
3.1.3.1.2	Co-Präzipitation zytosolischer Chaperone .....	102
3.1.3.2	Isolierung von Ribosomen mittels Epitop-markiertem Rpl4ap .....	103
3.1.3.2.1	Untersuchung des Phänotyps des <i>RPL4A-9Myc</i> -Stammes .....	103
3.1.4	<i>Two-Hybrid</i> -Analyse der Wechselwirkung von Rpl25p mit zytosolischen Chaperonen ...	105
3.1.5	Bindestudien mit MBP-Rpl25p .....	106
3.1.5.1	Expression und Reinigung von MBP-Rpl25p .....	106
3.1.5.2	Überprüfung des Faltungszustandes von MBP-Rpl25p .....	108
3.1.5.3	Bindestudien im Zellextrakt .....	109
3.1.5.4	Bindestudien mit gereinigten Komponenten .....	111
3.1.6	Untersuchung der Bedeutung von Btt1p .....	113
3.1.6.1	Analyse des Phänotyps von Deletionsmutanten .....	113
3.1.6.2	Analyse der Expression der $\beta$ -Untereinheiten .....	114
3.1.7	Untersuchung der Bindung von NAC an Rpl25-3HAp .....	115
3.1.8	Charakterisierung der Bindestelle auf Rpl25p .....	116
3.1.8.1	Komplementation von <i>RPL25</i> durch <i>RL23</i> aus <i>E. coli</i> .....	117
3.1.8.2	Konstruktion eines chimären Fusionsproteins .....	119
3.1.8.3	Untersuchung der Bedeutung von „E18“ für Rpl25p .....	122
3.1.8.3.1	Gezielte Veränderung von „E18“ durch Aminosäureaustausch .....	122
3.1.8.3.2	Untersuchung des Phänotyps von <i>RPL25TSE/AAA</i> .....	125
3.1.8.3.3	Expression und Reinigung von MBP-Rpl25AAAap .....	126
3.1.8.3.4	Bindung von Egd1p und Ssb1/2p an Rpl25AAAap .....	127

3.2	Charakterisierung des Gim-Komplexes durch Analyse von Verkürzungsmutanten .....	129
3.2.1	Herstellung spezifischer Antikörper zum Nachweis der GimC-Untereinheiten Gim4p und Gim6p .....	129
3.2.2	Konstruktion von Verkürzungsmutanten.....	132
3.2.3	Charakterisierung der Verkürzungsmutanten <i>in vivo</i> .....	134
3.2.3.1	Sensitivität gegenüber LatrunculinA .....	134
3.2.3.2	Sensitivität gegenüber Benomyl.....	136
3.2.3.3	Funktionelle Tests <i>in vivo</i> (Aktinfaltungskinetik) .....	138
3.2.4	Expression und Reinigung verschiedener Gim-Komplexe.....	141
3.2.4.1	Konventionelle Reinigung von GimC .....	142
3.2.4.2	Konstruktion eines Überexpressionsstammes für Wildtyp-GimC.....	143
3.2.4.3	Konstruktion eines Überexpressionsstammes für GimC-Verkürzungsmutanten.....	147
3.2.5	Expression und Reinigung ausgewählter Komplexe .....	149
3.2.5.1	Reinigung des Wildtyp-Komplexes.....	151
3.2.5.2	Reinigung der Mischkomplexe.....	155
3.2.6	Expression und Reinigung von Hefe-Aktin und -Tubulin in <i>E. coli</i> .....	156
3.2.7	Funktionelle Tests <i>in vitro</i> .....	157
3.2.7.1	Verhinderung der Aggregation denaturierten Aktins in Lösung .....	157
3.2.7.2	Einfluss von GimC auf die Löslichkeit <i>de novo</i> synthetisierter Substrate.....	161
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>166</b>
4.1	Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone im Umfeld des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels .....	166
4.1.1	Die Epitop-Markierung von Rpl25p führt zu einer Reduktion der Assoziation von Ssb1/2p mit Ribosomen.....	167
4.1.2	Rpl25p dient als Bindestelle für zytosolische Faktoren am Ribosom .....	168
4.1.2.1	<i>Two-Hybrid</i> .....	168
4.1.2.2	Bindestudien mit gereinigtem MBP-Rpl25p .....	169
4.1.3	Charakterisierung der Bindestelle von NAC .....	170
4.1.4	Ausblick.....	172
4.2	Charakterisierung des Gim-Komplexes durch Analyse von Verkürzungsmutanten .....	173
4.2.1	Charakterisierung der Verkürzungsmutanten <i>in vivo</i> .....	174
4.2.2	Expression und Reinigung verschiedener Gim-Komplexe.....	176
4.2.3	Funktionelle Tests <i>in vitro</i> .....	177
4.2.4	Ausblick.....	179
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>181</b>

# 1 Einleitung

Proteine stellen als zentrale Bestandteile jeder Zelle grundlegende Bausteine jedes lebenden Organismus dar. Das Wort Protein wurde 1838 von Jöns Jakob Berzelius geprägt und leitet sich vom griechischen *proteuo* ab, was so viel bedeutet, wie „ich nehme den ersten Platz ein“. Treffender kann man die Funktion der Proteine nicht beschreiben, die durch ihre Vielseitigkeit in der Lage sind, verschiedenste Funktionen zu übernehmen. Sie verleihen den Zellen nicht nur ihre Struktur und sind verantwortlich für die Beschleunigung chemischer Reaktionen, das Pumpen von Ionen und die Reizleitung in den Nerven, sie sorgen auch, in Form von Antikörpern dafür, Zellen vor Angreifern zu schützen und ermöglichen als Botenstoffe und Teile von Signalkaskaden die Kommunikation im Zellverband.

Ausschlaggebend für die Funktion eines Proteins ist nicht alleine seine dreidimensionale Struktur, sondern auch seine Lokalisation. Bei der Neusynthese von Proteinen sind daher sowohl die korrekte Faltung der naszenten Ketten, als auch deren Transport an den korrekten Bestimmungs- oder Wirkungsort von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund gibt es in der Zelle eine Reihe von Faktoren, die diese Prozesse vermitteln und deren Effizienz gewährleisten.

Eine Vielzahl von Proteinen wird z.B. vom Ribosom ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und von dort aus in ihre Zielkompartimente geleitet. Das gilt für sekretorische Proteine, aber auch für Membranproteine, die co-translational ins ER transportiert und dort im Zuge ihrer Synthese in die ER-Membran eingebaut werden. Fertige Membranpartikel werden schließlich als Transportvesikel von der ER-Membran abgeschnürt und an ihren Bestimmungsort dirigiert. Das ER ist auch Ort post-translationaler Modifikationen, wie der Bildung von Disulfidbrücken und der Glycosylierung. Ausschlaggebend für den Transport in das ER ist die sog. Signalsequenz, die auch bestimmt, ob ein Protein co- oder post-translational importiert wird. Diese wird am Ribosom vom *Signal Recognition Particle* (SRP) erkannt, der bei co-translationalem Import das ganze Ribosom an die ER Membran dirigiert (siehe 1.3).

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins bestimmt z.B. die Lage und Spezifität katalytischer Zentren bei Enzymen, definiert die Erkennungsstellen eines Effektors und seines Rezeptors, oder ermöglicht die Polymerisation einzelner Proteine in Filamente. Die funktionelle Form eines Proteins ist im Prinzip schon in der Abfolge der Aminosäuren, der sog. Primärstruktur festgelegt, die die Grundlage für die Ausbildung der Sekundärstrukturelemente, wie  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt bildet. Spezifische Interaktionen zwischen diesen Elementen führen schließlich zur Ausbildung

der Tertiärstruktur, die durch Wasserstoff- und Disulfidbrücken, aber auch durch hydrophobe, ionische und van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert wird. Während die meisten Proteine in der Lage sind ihre korrekte dreidimensionale Struktur spontan einzunehmen, benötigen andere Proteine dazu die Hilfe so genannter „molekularer Chaperone“.

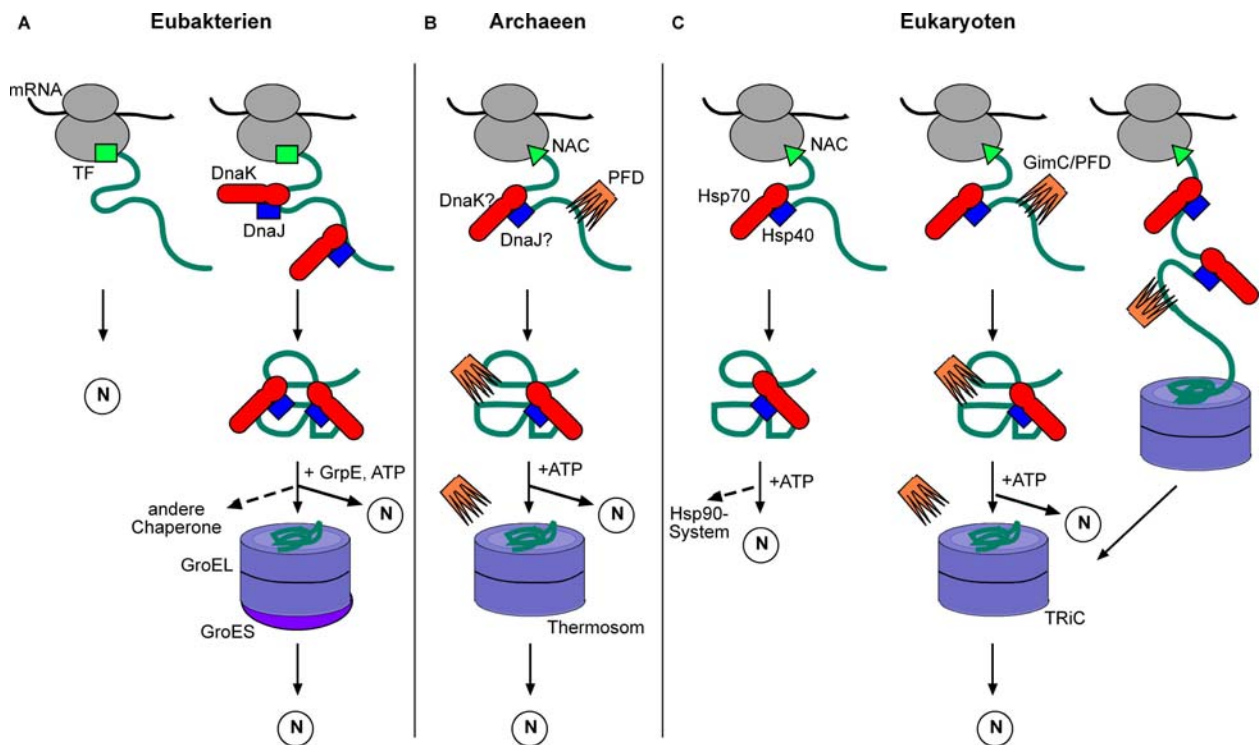
## 1.1 Molekulare Chaperone

Der Begriff „molekulare Chaperone“ wurde in den späten 80er Jahren des 20. Jahrhunderts von John Ellis (Ellis and Hemmingsen, 1989) für eine Gruppe von Proteinen etabliert, die die Fehlfaltung oder Aggregation ungefalteter Proteine verhindern und beschreibt treffend deren Aufgabe. *Chaperone* stammt aus dem Französischen und bedeutet Anstandsdame. Ähnlich wie ihr menschliches Pendant, schirmen molekulare Chaperone ungefaltete (bzw. unreife) Proteinketten von der Umgebung ab und schützen sie so vor unerwünschten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Als Erkennungssignal dienen den Chaperonen dabei exponierte hydrophobe oder unstrukturierte Bereiche an der Oberfläche teilweise entfalteter Polypeptide. Bei gefalteten Proteinen liegen hydrophobe Seitenketten normalerweise im Inneren des Moleküls verborgen. Chaperone schirmen diese, zur Aggregation neigenden, Bereiche ab, indem sie die Proteinkette, in manchen Fällen unter ATP-Verbrauch, wiederholt binden und freisetzen, bis das Protein seine native Struktur erreicht hat. Es wird angenommen, dass sie dabei nicht aktiv in die Faltungsreaktion eingreifen, sondern vielmehr deren Effizienz erhöhen, ein Prozeß, den man als *assisted self-assembly* bezeichnet. Chaperone enthalten weder sterische Informationen für andere Proteine, noch sind sie Teil deren nativer Struktur (Ellis and Hartl, 1999; Ellis et al., 1989). Neben Chaperonen, die generell bei der *de novo* Synthese von Proteinen benötigt und konstitutiv exprimiert werden (s.u.), gibt es auch solche Chaperone, die unter bestimmten Bedingungen verstärkt produziert werden. Zellulärer Stress, wie extreme Temperaturerhöhung, oxidativer Stress oder die Akkumulation zytotoxischer Substanzen führt zur Destabilisierung bereits gefalteter Proteine. Die Zelle reagiert auf die erhöhte Menge ungefalteter Proteine mit einer verstärkten Produktion eines oder mehrerer Chaperone, die die Aggregation nicht-nativer Proteine verhindern und ihre Rückfaltung in den aktiven Zustand fördern (Lindquist, 1986; Parsell and Lindquist, 1993). Daher stammt auch der Begriff Hitzeschock-Proteine (Hsp), der inzwischen jedoch zu einem allgemein gültigen Synonym für Chaperone geworden ist. Die meisten Chaperone sind konservierte Mitglieder der Hsp-Familien Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und den kleinen Hsps. Die Einteilung in diese Familien richtet sich vor allem nach Sequenzhomologien und Molekulargewichten (Wegrzyn and Deuerling, 2005). Chaperone

kommen in allen drei phylogenetischen Domänen, also bei Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten vor. In diesen Organismen bilden Chaperone, die die Kopplung von Translation und Faltung neu-synthetisierter Proteine vermitteln, gut organisierte Netzwerke, deren generelles Konzept stark konserviert ist.

### 1.1.1 Chaperon-Netzwerke

Die Aggregation von Proteinen ist ein geordneter Prozeß, der auf der Interaktion hydrophober Regionen beruht, die von ungefalteten oder partiell gefalteten Intermediaten exponiert werden. Es gibt seit langem Hinweise darauf, dass es sich bei Aggregationsprozessen um spezifische Reaktionen zwischen identischen Ketten handelt (London et al., 1974). Bei der Neusynthese von Proteinen wird Aggregation daher schon durch das vektorielle Erscheinen naszenter Ketten am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel begünstigt. Zusätzlich werden bei der Translation einer mRNA durch Polysomen zahlreiche identische, ungefaltete Proteinketten in nächster Nähe zueinander synthetisiert. Die hohe Konzentration von Makromolekülen im Zytosol (z.B. 300-400 mg/ml in *E. coli*, (Zimmerman and Trach, 1991)) erhöht die Gefahr der Aggregation zusätzlich. Einen weiteren Faktor stellt die Proteinfaltung selbst dar. Diese ist ein kooperativer Prozess, bei dem sich ganze Proteindomänen von 100-300 Aminosäuren aneinanderlagern. Diese Domänen können sich aber erst bilden, wenn ihre gesamte Sequenz das Ribosom verlassen hat. In *E. coli* nimmt die Synthese von 300 Resten ca. 10 Sekunden in Anspruch, in Eukaryoten ist dieser Prozess ungefähr 10-mal langsamer (Ellis and Hartl, 1999). Als Konsequenz dessen, sind die naszenten Ketten also relativ lange den Einflüssen ihrer Umgebung ausgesetzt (Hartl and Hayer-Hartl, 2002)). Um allen diesen Faktoren entgegenzuwirken, gibt es in Zellen Chaperon-Netzwerke, die die naszenten Ketten bereits co-translational am Ribosom in Empfang nehmen und, je nach Anforderung des jeweiligen Proteins, auch noch post-translational abschirmen, bis die native Konformation erreicht wurde. Die beteiligten Chaperone wirken dabei prinzipiell auf zwei Arten, die mit ihrer Größe zusammenhängen. Chaperone unter 200 kDa, wie Trigger Faktor oder Hsp70 halten naszente Ketten in einem Faltungs-kompetenten Zustand in Lösung, während große, zylindrische Chaperonine (über 800 kDa), wie GroEL oder TRiC ganze Proteine, oder Proteindomänen in einer Faltungshöhle einschließen und ihnen so die Möglichkeit geben, ihre korrekte Form in einem vom Zytosol abgeschirmten Kompartiment einzunehmen (Hartl, 1996). Abb. 1.1 gibt einen Überblick über Chaperon-Netzwerke in verschiedenen Organismen.



**Abb. 1. 1: Vergleich der Chaperon-Netzwerke in Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten**

N: Natives Protein, TF: Trigger Faktor, NAC: Naszente Ketten-assoziiierter Komplex, PFD: Prefoldin, GimC: Gim-Komplex, DnaK/DnaJ: Bakteriell Hsp70/Hsp40-Paar, GrpE: Bakterieller Nukleotid-Austauschfaktor, GroEL/GroES: Bakteriell Chaperonin mit Co-Faktor, Thermosom: Chaperonin in Archaeen, TRiC: Zytosolisches Chaperonin in Eukaryoten. Nach Hartl und Hayer-Hartl, 2002. Erläuterungen im Text.

Allen Chaperon-Netzwerken gemeinsam ist die Existenz von Chaperonen, die naszente Ketten sofort beim Austritt aus dem ribosomalen Tunnel abschirmen. In Eubakterien kommt diese Rolle Trigger Faktor (TF) zu, während in höheren Eukaryoten der naszente Ketten-assoziierte Komplex (NAC, *Nascent chain-Associated Complex*) diese Aufgabe übernimmt. In Archaeen gibt es kein konserviertes Äquivalent zu Trigger Faktor, es wurden jedoch in allen bisher sequenzierten archaeellen Genomen Homologe zu  $\alpha$ -NAC gefunden (Macario and Conway De Macario, 2001; Spreter et al., 2005). Das Hsp70/Hsp40-System, das vor allem in Eubakterien (DnaK/DnaJ) und Eukaryoten vorkommt, bindet naszente Ketten unter Verbrauch von ATP. Dieser Zyklus wird generell von Nukleotid-Austauschfaktoren, wie GrpE (im bakteriellen System) reguliert. Ca. 10-15% der bakteriellen Proteine sind für ihre Faltung zusätzlich auf das Chaperonin GroEL und seinen Co-Faktor GroES angewiesen (Ewalt et al., 1997), während eukaryotische Proteine bei Bedarf an das Hsp90-System, oder das zytosolische Chaperonin TRiC weitergeleitet werden (Abb. 1.1C). Archaeen und Eukaryoten besitzen außerdem ein weiteres Chaperon, Prefoldin (PFD, GimC in der Hefe), das im eukaryotischen System bei der Faltung einiger Proteine eng mit TRiC zusammenarbeitet (s. 1.2, für eine detaillierte Besprechung dieses Faltungsweges). In Archaeen gibt es bisher keine Hinweise auf eine Kooperation zwischen

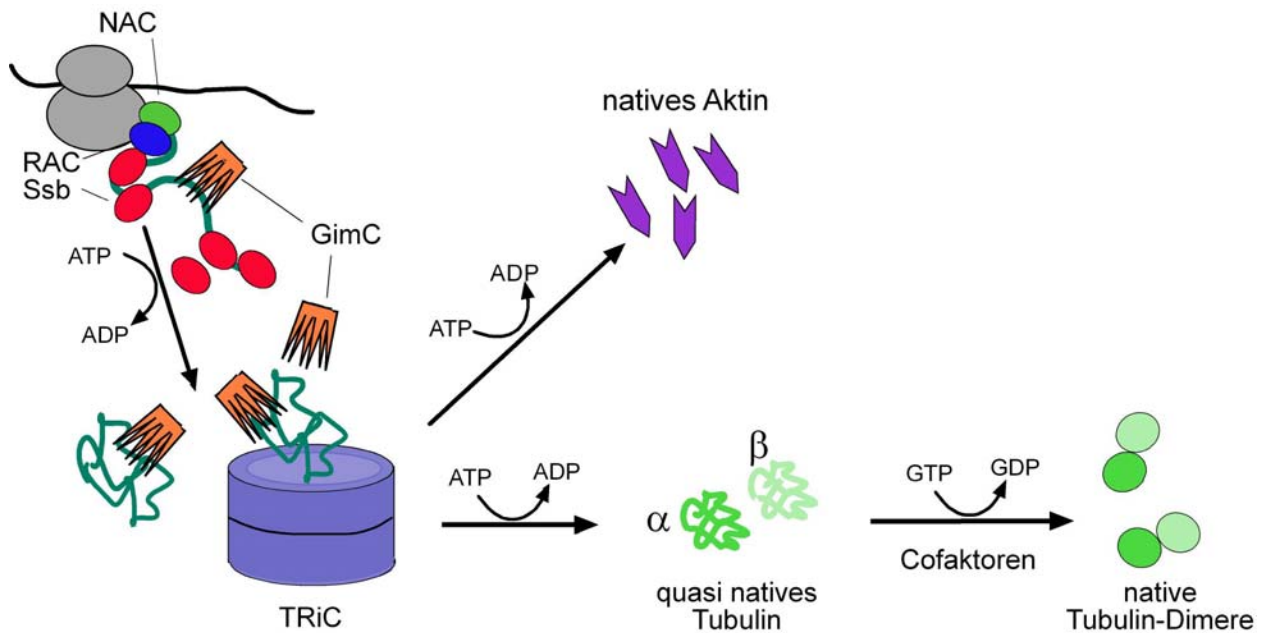
Prefoldin und Thermosom. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass das Substratspektrum von Thermosom noch nicht bekannt ist.

Während bei allen bisher untersuchten Archaeen ein Homolog des GimC/Prefoldin-TRiC-Systems identifiziert wurde, besitzen Archaeen normalerweise kein Hsp70/Hsp40 (Abb. 1.1B). Nur eine einzige Gattung, die *Methanosarcinaceae*, zeichnet sich durch die Co-Existenz der bakteriellen (DnaK, DnaJ, GrpE und GroEL/ES) und eukaryoten-ähnlichen Chaperonmaschinerie aus Prefoldin und Thermosom (dem archaeellen TRiC-Homolog) aus (Figueiredo et al., 2004; Klunker et al., 2003).

## 1.2 Proteinfaltung im Hefezytosol

Im Focus dieser Arbeit steht die „Proteinfaltung im Zytosol der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“. Dabei wurden vor allem die Vorgänge bei der Abschirmung naszenter Ketten am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel und ein spezialisierter Faltungsweg, der zur Generierung nativer Zytoskelett-Proteine führt, näher untersucht. Die folgende Einführung in die Proteinfaltung im Hefezytosol ist daher auf diese Aspekte ausgerichtet.

Wie bereits erwähnt, gibt es in Eukaryoten eine Reihe von Chaperonen, die direkt mit Ribosomen, oder naszenten Ketten assoziiert sind. In der Hefe sind dies vor allem der naszente Ketten-assoziierte Komplex (NAC, *Nascent chain-Associated Complex*), der Ribosomen-assoziierte Komplex (RAC, *Ribosome-Associated Complex*), das Hsp70-Chaperon Ssb1/2p (*Stress-seventy subfamily B*) und GimC (*Genes involved in microtubule biogenesis Complex*). Für die meisten Proteine ist die initiale Abschirmung durch diese Chaperone und Chaperon-Komplexe ausreichend, um ihre native Konformation einzunehmen. Andere Proteine, wie Aktin, und die Tubuline, wesentliche Komponenten des Zytoskeletts, sind für Ihre korrekte und effiziente Faltung auf GimC und das Chaperonin TRiC angewiesen. Während Aktin nach der Interaktion mit TRiC in gefaltetem, polymerisations-kompetenten Zustand vorliegt (Gao et al., 1992), benötigen Tubuline die Assistenz einer weiteren Chaperon-Maschinerie, die aus fünf so genannten „Tubulin-Faltungs-Cofaktoren“ besteht (Archer et al., 1995; Hoyt et al., 1997; Tian et al., 1996). Unter Mitwirkung dieser Co-Faktoren werden, in Abhängigkeit von GTP, native  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Dimere assembliert, die in der Lage sind, zu Mikrotubuli zu polymerisieren (Abb. 1.2).



**Abb. 1. 2: Modell der Proteinfaltung im Hefezytosol am Beispiel der Zytoskelett-Proteine Aktin und Tubulin**  
 Dargestellt ist der Faltungsweg, der zur Generierung nativer Zytoskelett-Proteine führt. Erläuterungen im Text.

Obwohl die generellen Bestandteile dieses Faltungswegs inzwischen bekannt sind, sind noch viele Fragen offen, die das Zusammenspiel oder die Funktion einzelner Komponenten betreffen. Daher ist es für das Verständnis der möglichen Aufgaben dieser Chaperone bei der Faltung zytosolischer Proteine wichtig, sich einen Überblick über den aktuellen Wissensstand die einzelnen Faktoren betreffend zu verschaffen.

### 1.2.1 NAC

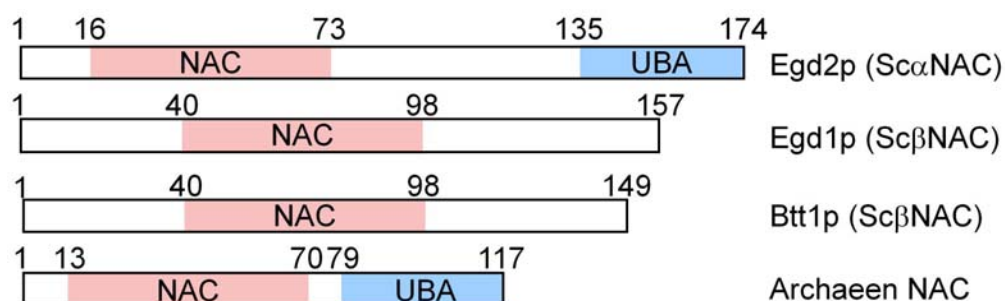
Der *Nascent chain-Associated Complex*, NAC, der Eukaryoten, ist ein hoch-konservierter, hetero-dimerer Komplex aus zwei homologen Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ . NAC wurde in Eukaryoten als das erste Protein identifiziert, das mit naszenten Ketten interagiert (Wiedmann et al., 1994). Die genaue Funktion von NAC ist jedoch unklar. So wurde zum einen gezeigt, dass NAC neu-synthetisierte Proteine gegen Interaktionen mit anderen Komponenten des Zytosols abschirmt, indem es die naszenten Ketten bindet und nach deren Freisetzung vom Ribosom wieder entlässt (Wang et al., 1995). Zum Anderen wurden dem Komplex und seinen Komponenten jedoch auch weitere Funktionen zugeschrieben, z.B. bei der Translokation sekretorischer Proteine ins endoplasmatische Retikulum (Lauring et al., 1995; Wiedmann and Prehn, 1999), dem Proteinimport in Mitochondrien (Funfschilling and Rospert, 1999; Lithgow et al., 1995), der Regulation der Transkription einiger Gene (Parthun et al., 1992; Yotov et al., 1998) aber auch der Regulation der Apoptose (Stilo et al., 2003). Diese Befunde beruhen jedoch meistens auf der isolierten Betrachtung der entsprechenden Prozesse *in vitro*, daher bleibt die



biologische Relevanz dieser Beobachtungen unklar. Die zentrale Bedeutung von NAC in höheren Eukaryoten wird jedoch dadurch unterstrichen, dass die Deletion von NAC im Tiermodell (Maus, *C.elegans* und *Drosophila*) zu embryonaler Lethalität führt (Bloss et al., 2003; Deng and Behringer, 1995; Markesich et al., 2000). Diese Beobachtung, lässt den Schluss zu, dass NAC in höheren Eukaryoten eine grundlegende Funktion haben muss, die gerade während der frühen Embryonalentwicklung, die mit einer massiven Proteinsynthese- und Differenzierungsleistung einhergeht, von größter Wichtigkeit ist.

In der Hefe dagegen, ist NAC nicht essentiell. Der Komplex ist ebenfalls heterodimer, wird jedoch von drei Genen, *EGD2* ( $\alpha$ ), *EGD1* und *BTT1* (beide  $\beta$ ) codiert. Egd1p wurde erstmals in einem Gel-Retardierungsexperiment identifiziert, in dem die Ursache für die Stabilisierung eines Komplexes zwischen Gal4p und DNA untersucht werden sollte. Daher steht Egd für *Enhancer of GALA DNA binding* (Parthun et al., 1992). In diesem Experiment wurde bereits ein 27 kDa-Protein gefunden, das mit Egd1p co-fractionierte. Es wurde jedoch erst viel später als die  $\alpha$ -NAC-Untereinheit Egd2p charakterisiert (Shi et al., 1995). Schließlich wurde eine dritte NAC-Untereinheit identifiziert, die in Anlehnung an das humane  $\beta$ -NAC, BTF3, Btt1p (für *BTF three*) genannt wurde. Da die Sequenzen der beiden  $\beta$ -NAC-Untereinheiten der Hefe starke Homologien aufweisen, wurde gefolgert, dass *BTT1* aus einer Duplikation des *EGD1*-Gens hervorgegangen ist (Hu and Ronne, 1994). Beide  $\beta$ -NAC-Untereinheiten können heterodimere Komplexe mit Edg2p bilden und die Ribosomenbindung vermitteln. Egd1p ist jedoch viel höher abundant, und daher das Egd1p/Egd2p-Heterodimer der in der Zelle überwiegende Komplex (Beatrix et al., 2000; Reimann et al., 1999).

Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des archaeellen NAC-Homologs aus *Methanothermobacter marburgensis* (Spreter et al., 2005) gibt auch einen Einblick in die Domänen-Struktur der eukaryotischen NAC-Untereinheiten (Abb. 1.3).



**Abb. 1. 3: Vergleich der Domänenstruktur archaeeller und Hefe-NAC-Untereinheiten**

Schematische Darstellung der Domänen der NAC-Untereinheiten aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), Egd2p (Sc $\alpha$ NAC), Egd1p und Btt1p (Sc $\beta$ NAC) und dem  $\alpha$ -NAC-Ortholog aus Archaeen. Zahlen bezeichnen Aminosäurereste, funktionelle Domänen sind farblich hervorgehoben.

Alle NAC-Untereinheiten enthalten eine sog. „NAC-Domäne“, die Dimerisierung ermöglicht. Exponierte hydrophobe Reste an der Oberfläche dieser Domäne vermitteln wahrscheinlich die Wechselwirkung von NAC mit nicht-nativen Proteinen. Archaeelles und eukaryotisches  $\alpha$ -NAC enthalten zusätzlich eine C-terminale UBA-(*ubiquitin-associated*) Domäne, die in eukaryotischen  $\beta$ -NAC-Untereinheiten nicht vorhanden ist. Welche Aufgabe dieser Domäne zukommt, ist noch nicht geklärt.

### 1.2.2 Ssb1/2p

In *S. cerevisiae* gibt es 14 Mitglieder der Hsp70-Familie, davon 6 allein im Zytosol (Craig et al., 1995; Craig and Jacobsen, 1985). Ssa1-4p sind untereinander sehr homologe, zum Teil essentielle Proteine, die für die Translokation einiger Vorläuferproteine in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich sind. Die Hauptaufgabe von Ssa1-4p in der Hefe liegt jedoch in der Hitzeschock-Antwort (Craig et al., 1995). Ssb1/2p ist ein Synonym für Ssb1p und Ssb2p, zwei Mitglieder der Hsp70-Familie, die sich in nur 4 AAs unterscheiden (Boorstein et al., 1994). Ssb1/2p ist nicht essentiell, jedoch in den Zellen hochabundant und kommt sowohl Ribosomengebunden, als auch frei im Zytosol vor. Die Interaktion von Ssb1/2p mit nicht-translatierenden Ribosomen ist Salz-sensitiv, die Interaktion mit translatierenden Ribosomen dagegen Salz-resistent. Dies weist darauf hin, dass Ssb1/2p über hydrophobe Wechselwirkungen, die, im Gegensatz zu ionischen Wechselwirkungen, durch hohe Salzkonzentrationen nicht destabilisiert werden können, an naszente Ketten bindet. Tatsächlich konnte die Bindung von Ssb1/2p an naszente Ketten nach chemischem Crosslinking nachgewiesen werden (Nelson et al., 1992; Pfund et al., 1998). Die Vorstellung, dass Ssb1/2p direkt an Ribosomen bindet und dort eine Rolle bei der Translation oder frühen Vorgängen bei der Proteinfaltung spielt, wird durch zwei weitere Beobachtungen unterstützt. Erstens ist die Deletion der *SSB*-Gene zwar nicht letal, führt neben pleiotrophen Effekten, wie Kälte- und Osmosensitivität, aber auch zur Sensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika, die in die Translation eingreifen (Craig and Jacobsen, 1985; Nelson et al., 1992). Zweitens wird die Transkription von *SSB1* und *SSB2* nicht durch Hitzeschock, sondern in Koordination mit ribosomalen Genen reguliert (Lopez et al., 1999).

Wie jedes Mitglied der Hsp70-Familie, ist Ssb1/2p in 3 Domänen organisiert. Es besteht aus einer N-terminalen ATPase-Domäne (44 kDa), einer zentralen Peptidbindungsdomäne (18 kDa), die für die Interaktion mit den Substraten verantwortlich ist, und einer C-terminalen variablen Domäne (10 kDa) unbekannter Funktion (James et al., 1997). Substratbindung und -freisetzung sind ATP-abhängig, wobei die Substratbindung in der ADP-Form und die Substratfreisetzung in

der ATP-Form begünstigt wird. Hsp40-Partner stimulieren die ATP-Hydrolyse und helfen so bei der Bildung stabiler Hsp70/Substrat-Komplexe (Cyr and Douglas, 1994).

In der Zelle interagiert Ssb1/2p einerseits mit RAC, kooperiert andererseits jedoch auch mit dem Chaperonin TRiC (s. u.).

### 1.2.3 RAC

Ssb1/2p benötigt für seine Funktion am Ribosom noch zwei weitere Proteine, Ssz1p, selbst ein Hsp70-Chaperon, und Zuotin (Zuo1p), ein Mitglied der Hsp40-Familie.

Ssz1p und Zuo1p bilden zusammen einen stabilen Komplex, den Ribosomen-assoziierten Komplex RAC (*Ribosome-Associated Complex*; Gautschi et al., 2001). Obwohl Ssb1/2p selbstständig ans Ribosom binden kann, ist es für die Interaktion mit naszenten Ketten anscheinend auf RAC angewiesen. Gautschi et al konnten zeigen, dass Ribosomen-gebundenes Ssb1/2p *in vitro* in Abwesenheit von RAC nicht effizient an naszente Ketten binden kann. Wurden translatisierende Ribosomen mit Hochsalm behandelt und somit Faktoren, die nicht über hydrophobe Wechselwirkungen assoziiert sind entfernt, konnte die Bindung von Ssb1/2p an naszente Ketten nur dann durch chemisches Crosslinking nachgewiesen werden, wenn sowohl funktionelles Zuotin, als auch Ssz1p vorhanden waren (Gautschi et al., 2002).

Ein weiteres Indiz für die enge Zusammenarbeit von Ssb1/2p und RAC ist die Beobachtung, dass die Deletion einer der drei Komponenten ähnliche Auswirkungen (Kälte- und Osmosensitivität und Hypersensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika, vgl. 1.2.2) hat (Gautschi et al., 2002; Hundley et al., 2002). Dies lässt darauf schließen, dass diese Proteine in denselben Prozess involviert sind.

Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten in diesem ungewöhnlichen Komplex aus zwei Hsp70-, und nur einem Hsp40-Protein ist noch nicht ganz klar. Auch Zuotin ist in der Lage, selbstständig an Ribosomen zu binden. Funktionell übernimmt es wohl die Rolle des Hsp40-Partners für Ssb1/2p (Yan et al., 1998). Diese These wird dadurch gestützt, dass Zuotin, das eine Mutation in der J-Domäne, also in der Domäne, die für die spezifische Interaktion mit seinem Hsp70-Partner verantwortlich ist, nicht funktionell ist und zwar noch an Ssz1p, jedoch nicht mehr an Ssb1p binden kann (Gautschi et al., 2002). Die Rolle von Ssz1p wird bisher als eine Art Co-Faktor und Regulator für Zuo1p verstanden. Darauf deutet hin, dass die Deletion der Peptidbindungsdomäne von Ssz1p *in vivo* keinen Effekt hat. Ssz1p selbst bindet weder an naszente Ketten, noch an Ribosomen, und wird nur über Zuotin an die Ribosomen rekrutiert (Gautschi et al., 2001; Hundley et al., 2002). Zuotin kann die ATPase-Aktivität von Ssb1/2p

jedoch nur in Anwesenheit von Ssz1p effizient stimulieren. Dabei scheint Ssz1p die Funktion von Zuo1p unabhängig von seiner eigenen ATPase-Aktivität zu regulieren, da eine Reihe von Veränderungen in der ATP-Bindestelle von Ssz1p keinen Einfluss auf diesen Vorgang hat (Huang et al., 2005).

Bisher schien RAC ein exklusiv in der Hefe vorkommender Komplex zu sein. Die Identifizierung von Proteinen mit RAC-ähnlichen Eigenschaften in Säugerzellen legt aber die Vermutung nahe, dass es sich auch bei RAC um ein konserviertes Konzept in Eukaryoten handelt. Humanes MPP11 hat eine an Zuo1p-erinnernde J-Domäne, ist in der Lage an Ribosomen zu binden, und formt einen stabilen Komplex mit Hsp70L1, einem entfernten Verwandten von Ssz1p. In Säugerzellen, in denen bisher kein eindeutiges Homolog von Ssb1/2p identifiziert wurde, scheint RAC mit dem Ssa-Homolog Hsc70 zu kooperieren (Hundley et al., 2005; Otto et al., 2005).

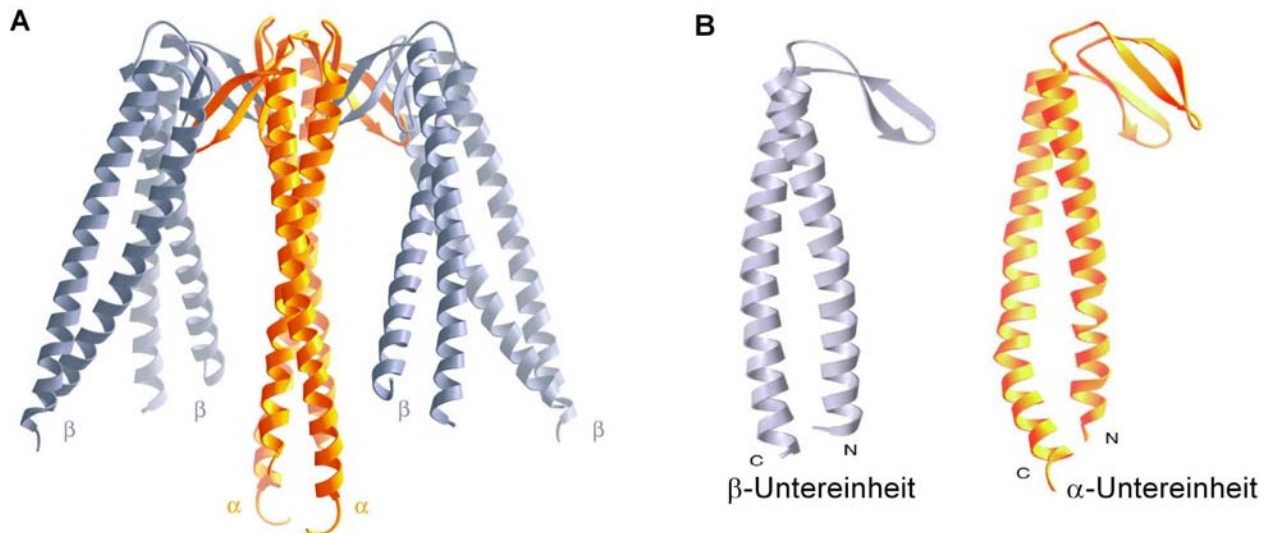
#### 1.2.4 GimC

Der Gim-Komplex, GimC (*genes involved in microtubule biogenesis complex*) kooperiert mit dem Chaperonin TRiC bei der Faltung von Aktin und Tubulinen. Dabei leitet er nicht nur naszente Ketten vom Ribosom an TRiC weiter, sondern verhindert auch die frühzeitige Freisetzung nicht-nativer Faltungsintermediate von TRiC ins Zytosol (Siegers et al., 1999).

Homologe von GimC wurden in höheren Eukaryoten, wie Rind und *C. elegans* (Vainberg et al., 1998), aber auch in Archaeen (Geissler et al., 1998; Leroux et al., 1999; Vainberg et al., 1998) identifiziert. Dies, und die funktionelle Komplementation von Hefemutanten durch Homologe aus Mensch, Maus und Archaeen (Geissler et al., 1998; Leroux et al., 1999) lässt auf eine starke Konservierung dieses Komplexes schließen, für den, ausserhalb des Hefe-Systems, auch das Synonym Prefoldin gebräuchlich ist.

GimC ist ein heteromerer Komplex aus sechs verschiedenen Untereinheiten, die von den Genen *GIM1-GIM6* codiert werden. Obwohl keines der sechs Gene essentiell ist, ist die Effizienz der *de novo* Synthese von Aktin und Tubulin in Abwesenheit von GimC stark reduziert (Siegers et al., 1999).

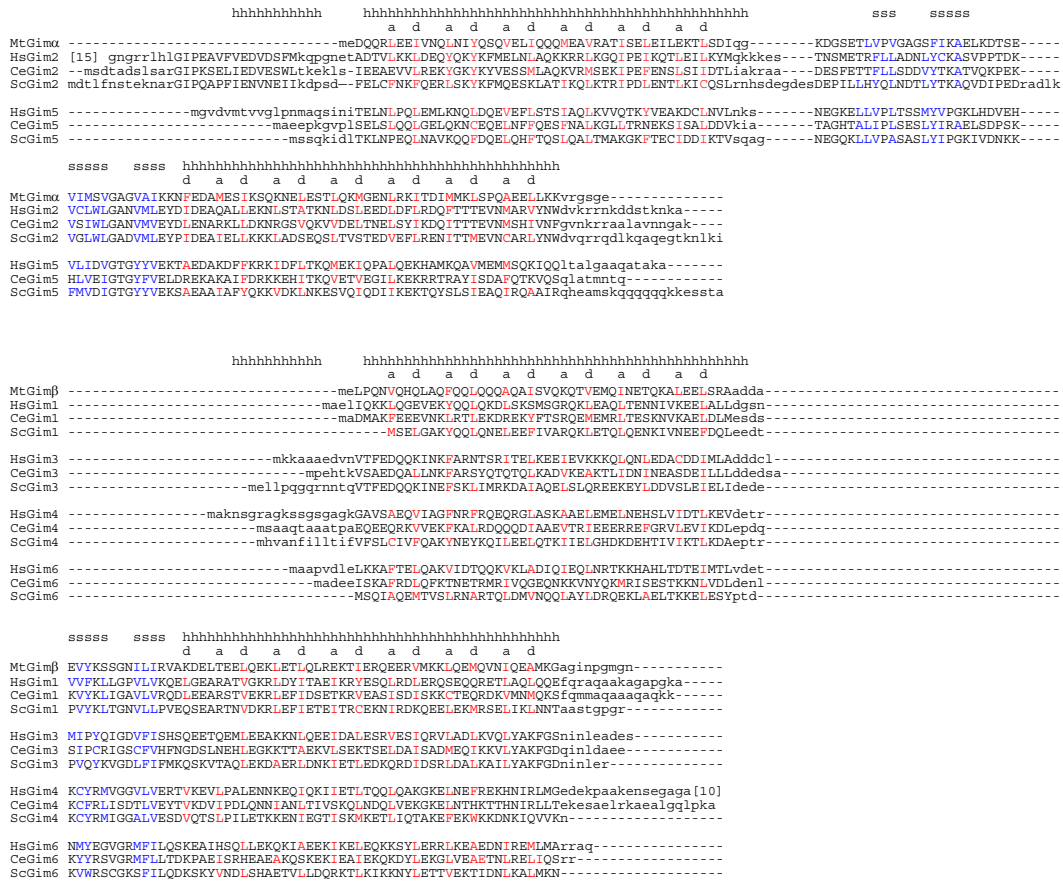
Der genaue Komplexaufbau von GimC ist bisher nicht bekannt. Aufgrund der im Jahr 2000 veröffentlichten Kristallstruktur eines archaeellen Homologs von GimC aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Sieger et al., 2000) und biochemischer Daten, hat man jedoch eine gute Vorstellung davon, wie GimC wahrscheinlich organisiert ist (Abb. 1.4).



**Abb. 1. 4: Struktur von Prefoldin aus *Methanobacterium thermoautotrophicum***  
 (A) Komplexaufbau (B) Struktur der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ . Aus Siegert et al, 2000.

Archaeelles Prefoldin ist ein hexamerer Komplex, der jedoch nur aus zwei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  besteht. Diese sind in einer  $\alpha_2\beta_4$ -Stöchiometrie kombiniert. Jede Untereinheit besteht aus zwei *coiled coil*-Bereichen und einer ( $\beta$ ), bzw. zwei ( $\alpha$ )  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (Abb. 1.4B). Dabei bilden die  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der  $\alpha$ -Untereinheiten eine zentrale Plattform, an der die  $\beta$ -Untereinheiten assemblieren (Siegert et al., 2000, Abb. 1.4A).

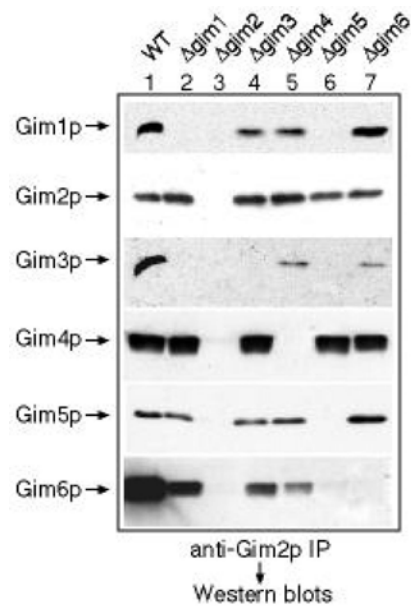
Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die Untereinheiten so stark konserviert sind, dass die generelle Einteilung in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typen auch auf Prefoldin-Homologe aus anderen Organismen anwendbar ist. Demnach werden die GimC-Untereinheiten, Gim2p und Gim5p, der  $\alpha$ -Klasse und die Untereinheiten Gim1p, Gim3p, Gim4p und Gim6p, der  $\beta$ -Klasse zugeteilt (Abb. 1.5).



**Abb. 1. 5: Sequenz- und Strukturvergleich vonGimC/Prefoldin-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen**

Mt: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Hs: *Homo sapiens*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. Strukturelemente sind durch Buchstaben gekennzeichnet (h:  $\alpha$ -helix, s:  $\beta$ -Faltblatt). a und d bezeichnen hydrophobe Reste der *heptad repeats* der *coiled coils*. Hydrophobe Reste sind außerdem farblich gekennzeichnet (rot im Bereich der  $\alpha$ -Helices, blau im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter).

*Two-Hybrid*-Interaktionen gaben erste Hinweise darauf, dass wie im archaellen Prefoldin, auch im Gim-Komplex, die  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p, zentrale Komponenten des Komplexes darstellen, da gezeigt werden konnte, dass Gim2p und Gim5p mit fast allen anderen Untereinheiten interagieren (Daten nicht gezeigt). Diese Daten wurden durch Co-Immunpräzipitation von GimC-Untereinheiten in verschiedenen Gim-Deletions-Stammhintergründen bestätigt. Dazu wurde Gim2p über ein daran fusioniertes ProteinA-Epitop mittels IgG-Sepharose aus Zellextrakten des Wildtyp-Stammes YPH499 und verschiedener Deletionsstämme ( $\Delta gim1$ - $\Delta gim6$ ) präzipitiert, und die Co-Präzipitation der verbleibenden GimC-Untereinheiten im Westernblot untersucht (Abb. 1.6).

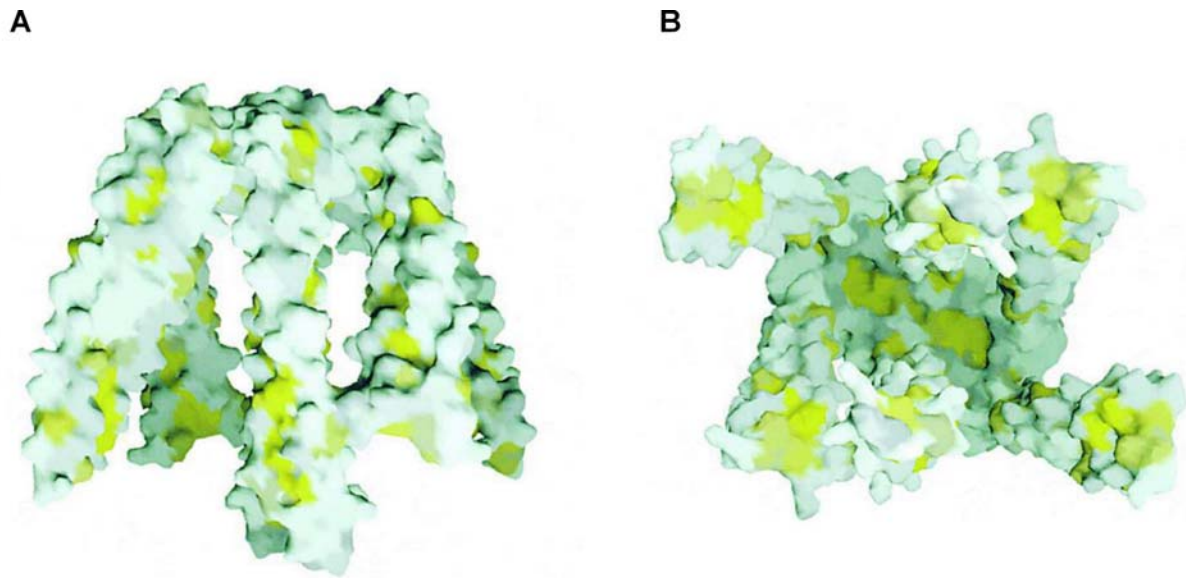


**Abb. 1. 6: Co-Präzipitation von GimC-Untereinheiten**

Co-Präzipitation von GimC-Untereinheiten mit Gim2-ProAp im Wildtyp YPH499 und verschiedenen Gim-Deletionsstämmen (K. Siegers, unpubliziertes Material).

Es zeigte sich, dass die Deletion verschiedener Untereinheiten unterschiedliche Auswirkungen auf den Komplexaufbau hat. Während bei Deletion von *GIM3* ( $\Delta gim3$ ), *GIM4* ( $\Delta gim4$ ) und *GIM6* ( $\Delta gim6$ ) nur jeweils die, durch das entsprechende Gen codierte, Untereinheit im Komplex fehlt, führt die Abwesenheit von Gim1p ( $\Delta gim1$ ) zum gleichzeitigen Verlust von Gim3p. Fehlt eine der  $\alpha$ -Untereinheiten, wie Gim5p ( $\Delta gim5$ ), können auch Gim1p, Gim3p und Gim6p nicht im Präzipitat nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass auch im Gim-Komplex der Hefe die  $\alpha$ -Untereinheiten eine zentrale Position einnehmen und für den Komplexaufbau von entscheidender Wichtigkeit sind.

Hydrophobe Bereiche, die in der Lage sind, die Interaktion mit ungefalteten Substraten zu vermitteln, finden sich vor allem am den Enden der  $\alpha$ -Helices der einzelnen Untereinheiten, aber auch an der Unterseite der  $\beta$ -Faltblatt-Plattform (Abb. 1.7B).



**Abb. 1. 7: Lage Oberflächen-exponierter hydrophober Reste von Prefoldin**

Oberflächenansicht der Prefoldin-Struktur. (A) Ansicht von vorne, (B) Ansicht von unten. Die relative Hydrophobizität der Aminosäure-Seitenketten wurde farblich dargestellt. Dabei bedeuten gelbe Bereiche besonders hydrophobe Seitenketten. Aus Siegert et al., 2000.

Verschiedene *in vitro*-Studien des archaellen Prefoldins bezüglich der Funktion dieser hydrophoben Bereiche legen nahe, dass die C- und N-terminalen Enden der *coiled coils* tatsächlich für die Interaktion von Prefoldin mit ungefalteten Polypeptid-Ketten verantwortlich sind. So konnte gezeigt werden, dass sowohl das Fehlen dieser Bereiche (Siegert et al., 2000), als auch der Austausch des vorderen und hinteren Bereichs innerhalb einzelner *coiled coils* durch *domain swapping* (Lundin et al., 2004) zu einer Reduktion der Interaktion von Prefoldin mit denaturierten, artifiziellen Substraten, wie Rhodanese und Lysozym führen. Bisher konnten in Archaeen noch keine natürlichen Substrate von Prefoldin identifiziert werden.

In der Hefe dagegen sind die Hauptsubstrate von GimC bekannt. Dieses kooperiert mit dem Gruppe II-Chaperonin TRiC in einem Faltungsweg, der zur Generierung nativen Aktins, sowie nativer Tubuline führt (Geissler et al., 1998; Hansen et al., 1999).

### 1.2.5 TRiC

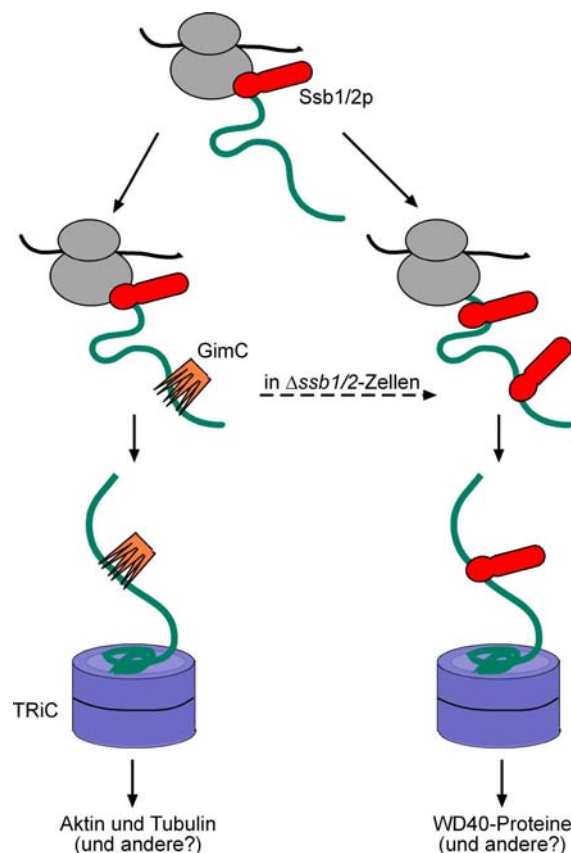
Das eukaryotische Chaperonin TRiC (*t-complex polypeptide1 (Tcp1) Ring Complex*), oder CCT (*Chaperonin Containing Tcp1*) gehört zur Klasse der Gruppe II-Chaperonine. Chaperonine sind große, zylindrische Komplexe aus zwei aufeinander liegenden Ringen mit je 7-9 Untereinheiten (Fenton and Horwich, 1997; Hartl, 1996). Gruppe I-Chaperonine, wie das bakterielle GroEL, üben ihre Funktion zusammen mit einem ringförmigen Co-Faktor (GroES) aus, der wie eine Art Deckel die zentrale Faltungshöhle des Chaperonins verschließt. Gruppe II-Chaperonine, wie



TRiC/CCT (in Hefe und höheren Eukaryoten) oder Thermosom (in Archaeen) dagegen haben keinen solchen Co-Faktor. Durch die Klärung der Struktur des archaellen TRiC-Homologs Thermosom aus *Thermoplasma acidophilum* (Ditzel et al., 1998; Klumpp et al., 1997) hat man Einblick in den Mechanismus erhalten, der dem Öffnen und Schließen der Faltungshöhle zu Grunde liegt. Dieses ist ein ATP-abhängiger Prozess, der, ähnlich wie das Öffnen und Schließen der Blende bei Fotoapparaten, von Konformationsänderungen der Substratbindungsdomäne selbst gesteuert wird (Klumpp et al., 1997).

TRiC ist ein Heterooligomer aus acht verschiedenen Untereinheiten pro Ring mit einer Masse von ca. 900 kDa (Kubota et al., 1995; Lewis et al., 1996; Liou and Willison, 1997). Die Anordnung der Untereinheiten im Komplex ist jedoch noch nicht bekannt.

Neben den bisherigen Hauptsubstraten, Aktin und den Tubulinen (Kubota et al., 1995; Lewis et al., 1996), ist auch die Faltung von  $G\alpha$ -Transducin (Farr et al., 1997) bzw. die Assemblierung des von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Proteins, VHL, in einen funktionellen Komplex mit Elongin B und C von TRiC abhängig (Melville et al., 2003). 2003 schließlich wurde, mit den WD40-Proteinen, noch eine andere Gruppe von TRiC-Substraten identifiziert (Camasses et al., 2003; Siegers et al., 2003).



**Abb. 1. 8: TRiC kooperiert in Abhängigkeit vom Substrat mit verschiedenen Co-Chaperonen**

Während die effiziente Faltung von Aktin und den Tubulinen ausschließlich von der Kooperation von TRiC und GimC abhängig ist, werden WD40-Proteine von Ssb1/2p an TRiC geliefert. GimC spielt in diesem Zusammenhang nur eine Rolle, wenn Ssb1/2p fehlt. Nach Siegers et al., 2003.

Die Untersuchung dieses neuen Faltungsweges (Abb. 1.8) hat außerdem gezeigt, dass sich TRiC für die Faltung verschiedener Substratklassen unterschiedlicher Co-Chaperone bedient. Anders als im Fall der Zytoskelett-Proteine, bei deren Faltung TRiC mit GimC kooperiert, arbeitet das Chaperonin bei der Faltung der WD40-Proteine, einer Substratklasse, die erstmals durch eine gemeinsame Struktur definiert ist, mit Ssb1/2p zusammen. Es hat sich gezeigt, dass GimC in diesem speziellen Faltungsweg den Ausfall von Ssb1/2p kompensieren kann. Im Gegensatz dazu, ist Ssb1/2p nicht in der Lage, die Funktion von GimC bei der Faltung der Zytoskelett-Proteine zu übernehmen (Siegers et al., 2003).

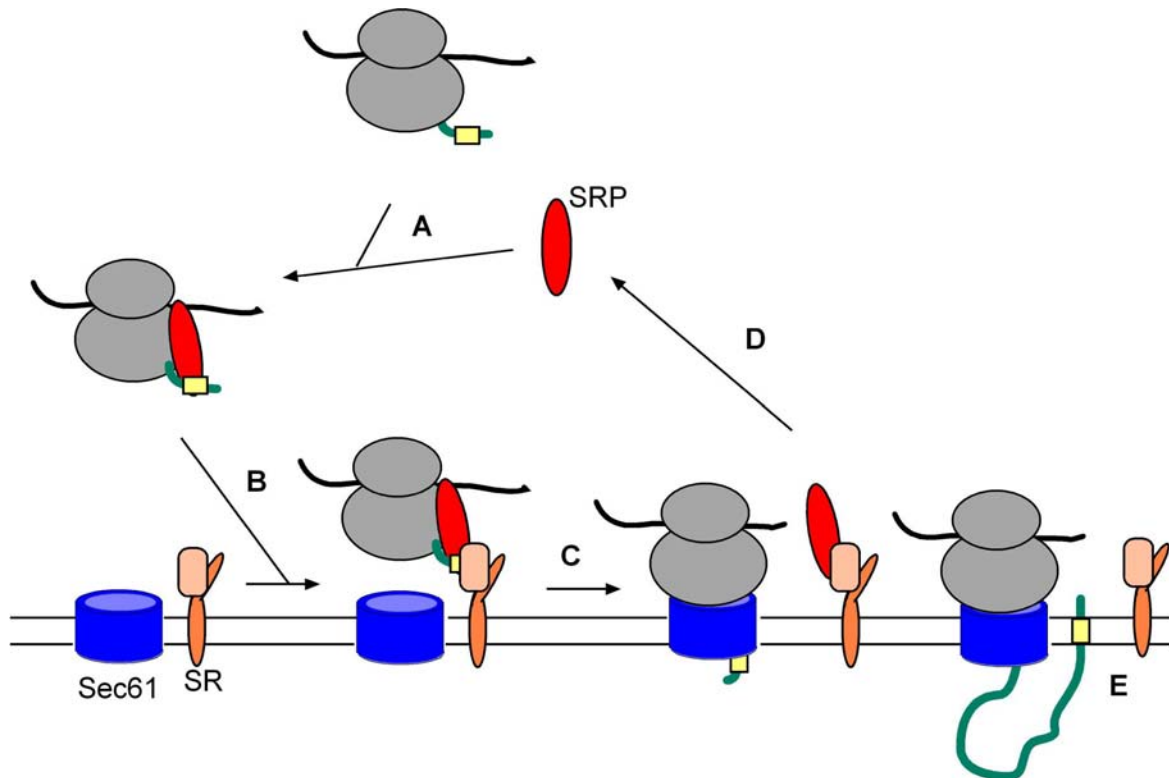
### 1.3 Zusammenspiel zwischen Translation und Protein *sorting*

Wie bereits angesprochen, ist nicht nur die korrekte Faltung, sondern auch die Lokalisation eines Proteins für seine Funktionalität ausschlaggebend. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in Zellen Mechanismen vorhanden sind, die die enge Kopplung zwischen Translation und Protein *sorting*, der Verteilung von Proteinen in ihre Zielkompartimente, sicherstellen.

Beim co-translationalen Proteintransport, vermittelt der *Signal Recognition Particle* (SRP) den zielgerichteten Transport naszierender Proteinketten zur Membran des eukaryotischen endoplasmatischen Retikulums (ER) oder der bakteriellen Plasmamembran.

Werden naszierende Ketten sekretorischer Proteine an eukaryotischen Ribosomen vom SRP gebunden, wird die Translation durch diese Bindung stark verlangsamt. Erst wenn das Ribosom seinen Bestimmungsort, die Membran des endoplasmatischen Retikulums erreicht hat, wird der Translationsarrest wieder aufgehoben. Ausschlaggebend dafür, ist die GTP-abhängige Interaktion des SRP mit dem SRP-Rezeptor (SR). Dadurch wird das Ribosom gleichzeitig so positioniert, dass der Polypeptid-Austrittstunnel genau über der Öffnung des Sec61-Komplexes, des Kanals ins ER-Lumen, sitzt (Stroud and Walter, 1999; Walter and Johnson, 1994). Die wachsende Polypeptidkette wird auf diese Weise also direkt ins ER transloziert (Abb. 1.9).

Auch der Prozess des co-translationalen Transports ist stark konserviert und obwohl sich die Komponenten in Eubakterien, Eukaryoten und Archaeen evolutionsbedingt voneinander unterscheiden, so ist das grundlegende Prinzip jedoch in allen 3 Domänen des phylogenetischen Stammbaumes identisch (Zwieb and Eichler, 2002).



**Abb. 1. 9: Schematische Darstellung des Proteinimports in das endoplasmatische Retikulum**

(A) Bindung des SRP an ein translatierendes Ribosom, dessen naszente Kette eine Signalsequenz (gelb) exponiert. (B) Bindung des SRP an den SRP-Rezeptor (SR). (C) Durch die Bindung wird das Ribosom am Sec61-Komplex positioniert, durch den die naszente Kette ins ER-Lumen transloziert wird. (D) Freisetzung des SRP. (E) Die naszente Kette wird zunächst in die Membran inseriert, wo das fertige Protein entweder verankert bleibt, oder nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine membranständige Peptidase freigesetzt wird. Nach Stroud und Walter, 1999.

In *E. coli* besteht der SRP aus einer GTPase (Ffh, 48 kDa) und einer 4,5S RNA (Poritz et al., 1990). Der SRP bindet translatierende Ribosomen, die eine hydrophobe Signalsequenz exponieren und vermittelt, über die Bindung an den SRP-Rezeptor, FtsY, den Transfer der wachsenden Polypeptidkette durch die innere Membran der Bakterien (Keenan et al., 2001).

In Eukaryoten ist der SRP ein großer Proteinkomplex. Er besteht aus 6 Untereinheiten, die gemäß ihrer Größe als Srp9p, Srp14p, Srp19p, Srp54p, Srp68p und Srp72p bezeichnet werden und einer ca. 300 Nukleotide langen 7S RNA (Lutcke, 1995).

Die Translokationsmaschinerie der Archaeen vereinigt Merkmale beider bisher besprochenen Organismen. Während der SRP, der aus zwei Proteinen, SRP54 und SRP19 und einer 7S RNA besteht, als Vorläufer des eukaryotischen SRP verstanden werden kann, ähneln der SRP-Rezeptor FtsY, und der SecYEDF-Komplex, der die Translokation wachsender Polypeptidketten durch die Plasmamembran der Archaeen vermittelt, eher prokaryotischen Komponenten (Zwieb and Eichler, 2002).

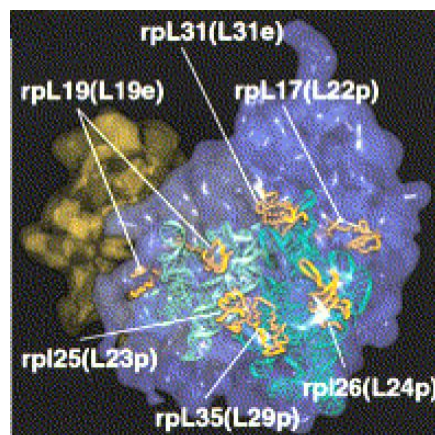
Mehrere Studien im *E. coli*-System haben gezeigt, der *Signal Recognition Particle* und das Chaperon Trigger Faktor, die beide co-translational an naszente Ketten binden, über die ribosomalen Untereinheiten R123p (L23) und R129p (L29) mit dem Ribosom interagieren, wobei

R123p die Hauptbindestelle für diese Faktoren darstellt (Gu et al., 2003; Kramer et al., 2002; Ullers et al., 2003). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Trigger Faktor und SRP in *E. coli* gleichzeitig an L23 binden (Buskiewicz et al., 2004; Raine et al., 2004).

Auch im eukaryotischen System wurde die R123p homologe Untereinheit L23a (Rpl25p in *S. cerevisiae*) als Bindestelle für den SRP am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel identifiziert (Pool et al., 2002).

Gestützt durch Cryo-EM-Studien an 80S Ribosomen kann man inzwischen davon ausgehen, dass das Ribosom auch in der Hefe, über Rpl25p, und in geringem Maße auch über dessen Nachbarn Rpl35p mit Faktoren interagiert, die am Protein *sorting* beteiligt sind. Solche Faktoren sind, sowohl Srp54p, die zentrale Untereinheit des SRP, die die Ribosomenbindung vermittelt, als auch, der Sec61-Komplex, der nach Bindung des SRP an den SRP-Rezeptor (SR) mit Rpl25p interagiert (Beckmann et al., 2001; Halic et al., 2004).

Abb. 1.10 zeigt die Organisation der Proteine rund um die Öffnung des Polypeptid-Austrittstunnels des Hefe-Ribosoms. In Klammern sind die Namen der entsprechenden Familien ribosomaler Proteine angegeben (Beckmann et al., 2001).



**Abb. 1. 10: Modell der Region um die Öffnung des Polypeptid-Austrittstunnels des Hefe-Ribosoms aufgrund von Cryo-EM-Daten und Homologiemodellen**

Farblich hervorgehoben sind Domänen der 25S rRNA in türkis und grün und ribosomale Proteine in gelb. In Klammern sind die Namen der entsprechenden Familien ribosomaler Proteine angegeben. Aus Beckmann et al., 2001.

Bisher gibt es jedoch noch keinen Hinweis darauf, dass Rpl25p auch in der Hefe, von anderen Faktoren als Interaktionsplattform mit Ribosomen oder naszenten Ketten genutzt wird.

## 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten im Wesentlichen zwei Aspekte der zytosolischen Faltungsmaschinerie in der Hefe näher betrachtet werden. Zum Einen sollte die Assoziation von Chaperonen, die naszente Ketten bei ihrem Austritt aus dem Ribosom abschirmen, mit den Ribosomen untersucht werden. Dafür sollte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt Ribosomen über einen Epitop-tag an einer Untereinheit schnell und einfach aus Zellextrakten zu isolieren. Durch Co-Präzipitations-Experimente sollte zunächst bestimmt werden, welche Chaperone direkt an Ribosomen binden und deren Interaktionsstelle auf dem Ribosom im weiteren Verlauf *in vitro* mit gereinigten Komponenten eingegrenzt werden. Zum Anderen sollte der Beitrag einzelner Untereinheiten des Gim-Komplexes zur Interaktion mit den Hauptsubstraten Aktin und den Tubulinen untersucht werden. Dazu sollten Verkürzungsmutanten hergestellt werden, denen potentielle Interaktionsstellen mit ungefalteten Proteinsubstraten fehlen. Zur funktionellen Analyse des Gim-Komplexes sollte ein Konzept zur effizienten Produktion und Reinigung von GimC und Komplexen mit verkürzten Untereinheiten in der Hefe etabliert werden, das die Untersuchung der Wechselwirkung dieser Komplexe mit den Substraten *in vitro* ermöglicht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Herstellernachweise

#### 2.1.1 Stämme

##### 2.1.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Zur Transformation wurden die Stämme BL21(DE3), BL21-CodonPlus (DE3)-RIL oder DH5 $\alpha$  verwendet. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Derivate des *E. coli* K12-Stammes mit folgenden genetischen Markern:

BL21(DE3): *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS* ( $r_B$ - $m_B$ -) *gal* $\lambda$  (DE3) *supE supF* mit und ohne [pLysS Cam<sup>r</sup>] und [pREP Kan<sup>r</sup>]

BL21-CodonPlus (DE3)-RIL: *E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS* ( $r_B$ - $m_B$ -) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* $\lambda$  (DE3) *endA Hte* [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]

DH5 $\alpha$ : *endA1 gyrA1 gyrA96 hsdR hsdM lac recA1 relA1 supE44 thi-1* F<sup>'</sup>[*proAB, lacZ* $\Delta$ M15]

GM2163: F<sup>-</sup> *ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136* (Str<sup>r</sup>) *xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9* (Cam<sup>r</sup>) *dcm-6 mcrB1 hsdR2* ( $r_K$ - $m_K$ +) *mcrA*

##### 2.1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

**Tabelle 2. 1: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme**

Stamm <sup>1</sup>	Relevanter Genotyp <sup>2</sup>	Herkunft
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1</i>	Stratagene
YPH500	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1</i>	Stratagene
YPH501	<i>MATa/<math>\alpha</math> ura3-52/ ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> / lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup>/ade2-101<sup>ochre</sup> trp1<math>\Delta</math>63/ trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200/ his3<math>\Delta</math>200 ade2-101<sup>ochre</sup>/ade2-101<sup>ochre</sup> trp1<math>\Delta</math>63/ trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200/ his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1/ leu2<math>\Delta</math>1</i>	Stratagene
RC757	<i>MAT<math>\alpha</math> his6 met1 sst2-1 cyh2 can1</i>	(Chan and Otte, 1982)
RH448	<i>MATa leu2 his4 lys2 ura3 bar1</i>	(Manney and Woods, 1976)
GSY16	<i>MATa <math>\Delta</math>gim1::kanMX6 <math>\Delta</math>gim2::loxP <math>\Delta</math>gim4::loxP <math>\Delta</math>gim3::loxP <math>\Delta</math>gim5::loxP <math>\Delta</math>gim6::loxP</i>	Silke Grallath
GSY17	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>gim1::kanMX6 <math>\Delta</math>gim2::loxP <math>\Delta</math>gim4::loxP <math>\Delta</math>gim3::loxP <math>\Delta</math>gim5::loxP <math>\Delta</math>gim6::loxP</i>	Silke Grallath
KSY2	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>gim2::kanMX6</i>	Katja Siegers
KSY84	<i>MATa <math>\Delta</math>gim6::kanMX6</i>	Katja Siegers
KSY86	<i>MATa <math>\Delta</math>gim6::His3MX6</i>	Katja Siegers
KSY89	<i>MATa gim2::GIM2-TEV-spa</i>	Katja Siegers
KSY110	<i>MATa <math>\Delta</math>gim1::kanMX6 <math>\Delta</math>gim2::klTRP1 <math>\Delta</math>gim4::His3MX6 <math>\Delta</math>gim3::loxP <math>\Delta</math>gim5::loxP <math>\Delta</math>gim6::loxP</i>	Katja Siegers
KSY185	<i>MATa <math>\Delta</math>ssb1::loxP <math>\Delta</math>ssb2::loxP</i>	Katja Siegers

Stamm <sup>1</sup>	Relevanter Genotyp <sup>2</sup>	Herkunft
KSY210	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP</i>	Katja Siegers
KSY249	<i>MATa Δzuo1::loxPklURA3loxP</i>	Katja Siegers
KSY253	<i>MATa Δssz1::loxP</i>	Katja Siegers
KSY254	<i>MATa Δbtt1::loxP</i>	Katja Siegers
KSY255	<i>MATa Δegd1::loxP</i>	Katja Siegers
KSY256	<i>MATa Δegd2::loxP</i>	Katja Siegers
KSY271	<i>MATa Δegd2::loxPHIS5loxP Δbtt1::loxPklURA3loxP</i>	Katja Siegers
KSY280	<i>MATa Δbtt1::loxP Δegd1::loxPHIS5loxP</i>	Katja Siegers
KSY283	<i>MATa Δegd1::loxP Δegd2::loxPHIS5loxP</i>	Katja Siegers
KSY286	<i>MATa Δssz1::loxP Δzuo1::loxPHIS5loxP</i>	Katja Siegers
KSY303-5	<i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP Δegd2::loxP</i>	Katja Siegers
KSY421	<i>MATa Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP</i>	Katja Siegers
JSY13	<i>MATa gim2::GIM2-6His (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY14	<i>MATa gim5::GIM5-6His (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY15	<i>MATa gim4::GIM4-6His (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY16	<i>MATa gim6::GIM6-6His(His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY17	<i>MATa ssz1::SSZ1-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY18	<i>MATa rpl25::RPL25-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY19	<i>MATa egd1::EGD1-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY20	<i>MATa egd2::EGD2-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY21	<i>MATa Δrpl25::loxPHIS5loxP p416ADH-RPL25</i>	diese Arbeit
JSY23	<i>MATα zuo1::ZUO1-3Myc (kanMX6)</i>	diese Arbeit
JSY24	<i>MATα ssz1::SSZ1-3Myc (kanMX6)</i>	diese Arbeit
JSY25	<i>MATa rpl25::RPL25-6HA (klTRP1)</i>	diese Arbeit
JSY26	<i>MATa srp14::SRP14-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY29	<i>MATa Δrpl25::loxP p416ADH-RPL25</i>	diese Arbeit
JSY30	<i>MATa Δrpl25::RPL25-6HA (klTRP1) rpl4a::RPL4a-9Myc (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY31	<i>MATa Δrpl25::loxP rpl4a::RPL4a-9Myc (His3MX6)</i> <i>p416ADH-RPL25</i> <i>rpl4a::RPL4a-9Myc (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY33	<i>rpl4a::RPL4a-9Myc (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY45	<i>MATa rpl25::RPL25-3HA (His3MX6) rpl4a::RPL4a-9Myc (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY46	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxPHIS5loxP</i>	diese Arbeit
JSY47	<i>MATa Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxPHIS5loxP</i>	diese Arbeit
JSY48	<i>MATa Δgim4::loxPHIS5loxP</i>	diese Arbeit
JSY49	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxPHIS5loxP</i> <i>Δgim3::loxPklURA3loxP</i>	diese Arbeit
JSY50	<i>MATa Δgim2:: kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxPHIS5loxP</i> <i>Δgim3::loxPklURA3loxP</i>	diese Arbeit
JSY51	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i>	diese Arbeit
JSY52	<i>MATa Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i>	diese Arbeit
JSY53	<i>MATa Δgim4::loxP</i>	diese Arbeit
JSY58	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP Δgim3::loxP</i>	diese Arbeit
JSY59	<i>MATa Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP Δgim3::loxP</i>	diese Arbeit
JSY60	<i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP srp14::SRP14-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY61	<i>MATa srp14::SRP14-3HA (His3MX6) rpl4a::RPL4a-9Myc (klTRP1)</i>	diese Arbeit
JSY62	<i>MATa btt1::BTT1-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY64	<i>MATa/a Δgim1::kanMX6/Δgim1::kanMX6 Δgim2::loxP/Δgim2::loxP</i> <i>Δgim4::loxP/Δgim4::loxPΔgim3::loxP/Δgim3::loxP</i> <i>Δgim5::loxP/Δgim5::loxP Δgim6::loxP/Δgim6::loxP</i>	diese Arbeit
JSY65	<i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP srp14::SRP14-3HA (His3MX6)</i> <i>rpl4a::RPL4a-9Myc (klTRP1)</i>	diese Arbeit
JSY66	<i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP Δegd2::loxP</i> <i>rpl4a::RPL4a-9Myc (klTRP1)</i>	diese Arbeit
JSY67	<i>MATa/a Δgim1::kanMX6/Δgim1::kanMX6 Δgim2::loxP/Δgim2::loxP</i> <i>Δgim3::loxP/Δgim3::loxP Δgim4::loxP/Δgim4::loxP</i> <i>Δgim5::loxP/Δgim5::loxP Δgim6::loxP/Δgim6::loxP</i> <i>p425CUP1-gim2NTCT-CUP1-gim3NTCT (pGS32)</i>	diese Arbeit

Stamm <sup>1</sup>	Relevanter Genotyp <sup>2</sup>	Herkunft
	<i>p423CUP1-gim1NTCT-CUP1-gim4NTCT (pGS36)</i>	
JSY68	<i>p426CUP1-gim5NTCT-CUP1-gim6NTCT-TEV-6His (pJS122)</i> <i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP Δegd2::loxP</i> <i>Srp54::SRP54-3HA (kanMX6)</i>	diese Arbeit
JSY69	<i>MATa Δegd1::loxP Δbtt1::loxP Δegd2::loxP</i> <i>Srp54::SRP54-3HA (His3MX6)</i>	diese Arbeit
JSY70	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i> <i>p424CUP1-gim1NTCT (pGS33) p425CUP1-GIM2-CUP1-GIM3</i> <i>(pUZ5)</i> <i>p423CUP1-GIM4 (pUZ9)</i>	diese Arbeit
JSY71	<i>p426CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His (pJS124)</i> <i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i> <i>p425CUP1-gim2NTCT-CUP1-gim1NTCT (pJS98)</i> <i>p424CUP1-GIM3 (pUZ1) p423CUP1-GIM4 (pUZ9)</i> <i>p426CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His (pJS124)</i>	diese Arbeit
JSY72	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i> <i>p423CUP1-GIM1-CUP1-GIM4 (pUZ10)</i> <i>p424CUP1-GIM3 (pUZ1)</i> <i>p425CUP1-gim2NTCT (pJS96)</i> <i>p426CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His (pJS124)</i>	diese Arbeit
JSY73	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP p423CUP1-GIM1-</i> <i>CUP1-GIM4 (pUZ10)</i> <i>p425CUP1-GIM2-CUP1-GIM3 (pUZ5)</i> <i>p424CUP1-gim5NTCT (pJS93)</i> <i>p426CUP1-GIM6-TEV-6His (pUZ8)</i>	diese Arbeit
JSY74	<i>MATα Δgim2::kanMX6 Δgim5::loxP Δgim1::loxP</i> <i>p423CUP1-GIM1-CUP1-GIM4 (pUZ10)</i> <i>p424CUP1-gim5NTCT (pJS93)</i> <i>p425CUP1-gim2NTCT (pJS96)</i> <i>p426CUP1-GIM3-CUP1-GIM6-TEV-6His (pJS126)</i>	diese Arbeit
SGY37	<i>MATa trp1 his3 leu2 ura3-52::URA3-lexA-op-LacZ</i>	(Geissler et al., 1998)
SGY101	<i>MATα Δgim1::kanMX6</i>	(Geissler et al., 1998)
SGY115	<i>MATa Δgim4::His3MX6</i>	(Geissler et al., 1998)
SGY117	<i>MATα Δgim3::kanMX6</i>	(Geissler et al., 1998)
SGY156	<i>MATα Δgim5::kanMX6</i>	(Geissler et al., 1998)
UZY10	<i>MATa/α gim6::GIM6-TEV-6His/gim6::GIM6-TEV-6His</i> <i>p425CUP1-GIM2-CUP1-GIM3 (pUZ5)</i> <i>p424CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His (pUZ11)</i> <i>p423CUP1-GIM1-CUP1-GIM4 (pUZ10)</i>	Ute Zeidler

<sup>1</sup> Alle verwendeten Hefestämme sind, falls nicht anders angegeben, congenetive Derivate von YPH499 (S288C, (Mortimer and Johnston, 1986). Der Genotyp von S288C ist: *Mat α SUC2 gal2 mal mel,flo1,flo8-1, hap1*

<sup>2</sup> Zur Nomenklatur: *Δgim2::kanMX6* bedeutet: das *GIM2*-Gen wurde durch den heterologen *kanMX6*-Marker ersetzt. *gim2::GIM2-9Myc (klTRP1)* bedeutet: das *GIM2*-Gen wurde mit einem 9Myc-Epitopkonstrukt, das auch den Marker *klTRP1* codiert, versehen und in den *GIM2*-Locus integriert.  
*p415ADH-RPL25* (z.B.) bezeichnet ein Plasmid, mit dem der entsprechende Stamm transformiert wurde.



## 2.1.2 Plasmide

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

Name	Beschreibung	Herkunft
pACTII	2 µm, LEU2-Vektor mit <i>GAL4</i> -Aktivator-domäne	(Durfee et al., 1993)
pBB31	pRSETA-PAC2	Bettina Boelter
pBB55 (=pYM28)	9Myc ( <i>His3MX6</i> )	Bettina Boelter
pCRScript- <i>loxP</i> - <i>klURA3-loxP</i>		Robert Arkowitz
pCRScript- <i>loxP</i> - <i>SpHIS5-loxP</i>		Robert Arkowitz
pEG202	2 µm, <i>HIS3</i> -Vektor mit <i>lexA</i> -DNS-Bindedomäne	(Gyuris and Duda, 1986)
pDG1	pEG202- <i>SSB1</i>	Diana Greve
pDG2	pACT2- <i>SSB1</i>	Diana Greve
pGEX5X1	GST-Faktor Xa, Amp <sup>R</sup>	Amersham Pharmacia
pGS72	pProExHTa - <i>EGD1ΔN</i> (As 76-157)	Silke Grallath
pGS73	pProExHTa - <i>BTT1ΔN</i> (As 76-149)	Silke Grallath
pJS1	p415ADH- <i>gim1NTCT</i>	diese Arbeit
pJS2	p415ADH- <i>gim2NTCT</i>	diese Arbeit
pJS3	p415ADH- <i>gim3NTCT</i>	diese Arbeit
pJS4	p415ADH- <i>gim4NTCT</i>	diese Arbeit
pJS5	p415ADH- <i>gim5NTCT</i>	diese Arbeit
pJS7	p415ADH- <i>GIM1</i>	diese Arbeit
pJS8	p415ADH- <i>GIM2</i>	diese Arbeit
pJS9	p415ADH- <i>GIM3</i>	diese Arbeit
pJS10	p415ADH- <i>GIM6</i>	diese Arbeit
pJS13	pProExHTa- <i>GIM4AK</i>	diese Arbeit
pJS16	pProExHTa- <i>GIM6AK</i>	diese Arbeit
pJS24	p425ADH- <i>GIM2</i>	diese Arbeit
pJS35	pKM260- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS36	pYES263- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS37	pYES260- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS38	pKM263- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS39	p416ADH- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS40	p415ADH- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS41	p415ADH- <i>RL23</i>	diese Arbeit
pJS42	p415GALS- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS43	p415GALL- <i>RPL25</i> ohne Intron	diese Arbeit
pJS48	pProExHTa- <i>ZUO1</i> * (As 1-110)	diese Arbeit
pJS51	pCRTOPO2.1- <i>SSZ1</i> * (As 386-538)	diese Arbeit
pJS52	pCR4TOPO- <i>P<sub>RPL25</sub>-rpl25N</i> (As 1-50)	diese Arbeit
pJS53	pCR4TOPO- <i>BTT1</i>	diese Arbeit
pJS54	pProExHTa- <i>BTT1</i>	diese Arbeit
pJS58	pProExHTa- <i>SSZ1</i> * (As 386-538)	diese Arbeit
pJS59	pRS315- <i>P<sub>RPL25</sub>-rpl25N</i> (As 1-50)	diese Arbeit
pJS60	pProExHTa- <i>EGD2</i>	diese Arbeit
pJS62	pProExHTa- <i>EGD1</i>	diese Arbeit
pJS63	pRS315- <i>P<sub>RPL25</sub>-rpl25N</i> (As1-50)- <i>RL23</i>	diese Arbeit
pJS64	p415GALS- <i>RPL25</i> -3HA	diese Arbeit
pJS65	pMM5- <i>SSB1</i>	diese Arbeit
pJS66	pMM6- <i>SSB1</i>	diese Arbeit
pJS68	pMM5- <i>GIM2</i>	diese Arbeit
pJS69	pMM5- <i>GIM5</i>	diese Arbeit
pJS70	pMM6- <i>GIM2</i>	diese Arbeit
pJS71	pMM6- <i>GIM5</i>	diese Arbeit
pJS72	p415ADH- <i>ZUO1</i>	diese Arbeit
pJS73	p416ADH- <i>ZUO1</i>	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Herkunft
pJS74	pRS416- <i>ssb1AD</i> (As 1-472)	diese Arbeit
pJS75	p425 <i>CUP1-ZUO1</i>	diese Arbeit
pJS76	p425 <i>GAL1 ZUO1</i>	diese Arbeit
pJS80	pMM5- <i>ssb1AD</i> (As 1-472)	diese Arbeit
pJS81	pMalE-TEV- <i>RPL25</i>	diese Arbeit
pJS82	pCRTOPO2.1- <i>SSA1</i>	diese Arbeit
pJS83	pRS413- <i>ssb1C</i> (As 474-613)	diese Arbeit
pJS84	p415 <i>GAL1-ZUO1</i>	diese Arbeit
pJS86	pRS315- <i>RPL25TSE/AAA</i> (ohne Intron)	diese Arbeit
pJS87	pMM6- <i>ssb1C</i> (As 474-613)	diese Arbeit
pJS88	p415 <i>ADH-gim6NTCT</i>	diese Arbeit
pJS89	pCRTOPO2.1- <i>rpl25N</i> (As 1-50, ohne Intron)- <i>RL23</i>	diese Arbeit
pJS90	pCRTOPO2.1-PCR <i>RL23</i>	diese Arbeit
pJS91	pCRTOPO2.1-PCR <i>gim6NTCT</i>	diese Arbeit
pJS92	p424 <i>CUP1-gim3NTCT</i>	diese Arbeit
pJS93	p424 <i>CUP1-gim5NTCT</i>	diese Arbeit
pJS94	pMalE-TEV- <i>rpl25N</i> (As1-50, ohne Intron)- <i>RL23</i>	diese Arbeit
pJS95	p423 <i>CUP1-gim1NTCT</i>	diese Arbeit
pJS96	p425 <i>CUP1-gim2NTCT</i>	diese Arbeit
pJS97	p426 <i>CUP1-gim6NTCT</i>	diese Arbeit
pJS98	p425 <i>CUP1-gim5NTCT-CUP1-gim1NTCT</i>	diese Arbeit
pJS99	p423 <i>CUP1-gim4NTCT</i>	diese Arbeit
pJS105	pCRTOPO2.1-PCR L25MB	diese Arbeit
pJS106	pCRTOPO2.1-PCR L25MD	diese Arbeit
pJS107	pCRTOPO2.1-PCR L25CX	diese Arbeit
pJS109	p426 <i>CUP1-gim6NTCT-TEV-spa</i>	diese Arbeit
pJS110	p426 <i>CUP1-gim6NTCT-TEV-37aa-linker-6His</i>	diese Arbeit
pJS111	p424 <i>CUP1-GIM5-TEV-spa</i>	diese Arbeit
pJS112	p426 <i>CUP1-gim6NTCT-TEV-6His</i>	diese Arbeit
pJS113	pRS316-PCRL25CX	diese Arbeit
pJS114	pRS316-PCRL25CX + PCRL25D	diese Arbeit
pJS115	pRS315- <i>P<sub>RPL25</sub>-RPL25TSE/AAA-T<sub>RPL25</sub></i>	diese Arbeit
pJS116	pMalE-TEV- <i>RPL25TSE/AAA</i>	diese Arbeit
pJS117	pRS316- <i>P<sub>RPL25</sub>-RPL25-T<sub>RPL25</sub></i>	diese Arbeit
pJS118	pRS315- <i>P<sub>RPL25</sub>-RPL25-T<sub>RPL25</sub></i>	diese Arbeit
pJS120	p424 <i>CUP1-gim5NTCT-CUP1-gim6NTCT-TEV-6His</i>	diese Arbeit
pJS121	p426 <i>CUP1-GIM5</i>	diese Arbeit
pJS122	p426 <i>CUP1-gim5NTCT-CUP1-gim6NTCT-TEV-6His</i>	diese Arbeit
pJS124	p426 <i>CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>	diese Arbeit
pJS125	p425 <i>CUP1-gim5NTCT-CUP1-gim2NTCT</i>	diese Arbeit
pJS126	p426 <i>CUP1-GIM3-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>	diese Arbeit
pJS127	pRSET6d- <i>ACT1</i>	diese Arbeit
pJS128	pRSET6d- <i>TUB1</i>	diese Arbeit
pJS129	pRSET6d- <i>TUB2</i>	diese Arbeit
pKM260	T7-Promotor; 6His-TEV	Karsten Melcher
pMalE	pMalE-TEV-Syntaxin	Andreas Bracher
pMM5	pRS423- <i>GAL1-LexA-Myc</i>	Michael Knop
pMM6	pRS425- <i>GAL1-GAL4-HA</i>	Michael Knop
pProEXHTa	6His, Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pRSET6d	T7-Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Schoepfer, 1993)
pSG55-2	pRS315- <i>GIM1</i>	Silke Geissler
pSG115-1	pRS315- <i>GIM5</i>	Silke Geissler
pSH47	p416 <i>GAL1-Cre</i>	(Guldener et al., 1996)
pSH62	p413 <i>GAL1-Cre</i>	(Guldener et al., 1996)
pSH63	p414 <i>GAL1-Cre</i>	(Guldener et al., 1996)
pSI8	pEG202- <i>GIM2</i>	Katja Siegers
pSI53	p415 <i>GAL1-GIM3</i>	Katja Siegers
pSI56	p415 <i>GAL1-GIM2</i>	Katja Siegers
pSI66	p415 <i>GAL1-GIM6</i>	Katja Siegers
pSI215	p424 <i>CUP1</i>	Katja Siegers

Name	Beschreibung	Herkunft
pSI216	p423 <i>CUP1</i>	Katja Siegers
pSI244	p425 <i>CUP1</i>	Katja Siegers
pSI270 (=pYM19)	6His ( <i>kanMX6</i> )	Katja Siegers
pSI271 (=pYM20)	2FLAG ( <i>His3MX6</i> )	Katja Siegers
pSI272 (=pYM21)	6His ( <i>His3MX6</i> )	Katja Siegers
pSI294 (=pYM23)	37aa-linker-6His ( <i>His3MX6</i> )	Katja Siegers
pSI306 (=pYM16)	TEV-6His ( <i>kanMX6</i> )	Katja Siegers
pSI308 (=pYM25)	TEV-37aa-linker-6His ( <i>kanMX6</i> )	Katja Siegers
pSI318	pACTII- <i>RPL25</i>	Katja Siegers
pSI319	pACTII- <i>SRP54</i>	Katja Siegers
pSI320	pACTII- <i>BTT1</i>	Katja Siegers
pSI321	pACTII- <i>EGD1</i>	Katja Siegers
pSI322	pACTII- <i>EGD2</i>	Katja Siegers
pSI323	pEG202- <i>RPL25</i>	Katja Siegers
pSI324	pEG202- <i>SRP54</i>	Katja Siegers
pSI325	pMM5- <i>RPL25</i>	Katja Siegers
pSI326	pMM6- <i>RPL25</i>	Katja Siegers
pSI327	pMM5- <i>SRP54</i>	Katja Siegers
pSI328	pMM6- <i>SRP54</i>	Katja Siegers
pSI329	pEG202- <i>BTT1</i>	Katja Siegers
pSI330	pEG202- <i>EGD1</i>	Katja Siegers
pSI331	pEG202- <i>EGD2</i>	Katja Siegers
pSI332	pMM5- <i>ZUO1</i>	Katja Siegers
pSI333	pMM5- <i>SSZ1</i>	Katja Siegers
pSI334	pMM5- <i>BTT1</i>	Katja Siegers
pSI335	pMM5- <i>EGD1</i>	Katja Siegers
pSI336	pMM6- <i>ZUO1</i>	Katja Siegers
pSI337	pMM6- <i>BTT1</i>	Katja Siegers
pSI338	pMM6- <i>EGD1</i>	Katja Siegers
pSI339	pMM5- <i>EGD2</i>	Katja Siegers
pSI340	pMM6- <i>EGD2</i>	Katja Siegers
pSI343	pEG202- <i>ZUO1</i>	Katja Siegers
pSI344	pMM6- <i>SSZ1</i>	Katja Siegers
pSI348	p426 <i>CUP1</i>	Katja Siegers
pSI449	pProExHTa- <i>EGD1Δ1-31</i>	Katja Siegers
pSM476	pACTII- <i>GIM5</i>	Elmar Schiebel
pYM1	3HA ( <i>kanMX6</i> )	(Knop et al., 1999)
pYM2	3HA ( <i>His3MX6</i> )	(Knop et al., 1999)
pYM3	6HA ( <i>klTRP1</i> )	(Knop et al., 1999)
pYM4	3Myc ( <i>kanMX6</i> )	(Knop et al., 1999)
pYM6	9Myc ( <i>klTRP1</i> )	(Knop et al., 1999)
pYM8	TEV- <i>spa</i> ( <i>kanMX6</i> )	(Knop et al., 1999)

### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 2. 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Bezeichnung/Zweck
<i>GIM1</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccagaTGCAAAATGAGTTAGAAGAG	3'-Verkürzung <i>GIM1</i>
<i>GIM1</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I	gatctgcagctcgagttcttaTTCTTCTGCTTGTCCC	5'-Verkürzung <i>GIM1</i>
<i>GIM1</i> -S4	aataatcccacttcagaattgaaaaagactacatttgagtgagggaacaaaagcaaaaatg CGGTGGCGGCCGCTCTAG	Amplifikation von Deletionskassetten
<i>GIM1</i> -S5	ggcagattattggactgtgcgctttctgtcttccgaggacctgtgagttgtttta CCTCGAGGTCCACGGTATC	Amplifikation von Deletionskassetten
<i>GIM2</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccATTTATGGAATCTAAATTGGC	3'-Verkürzung <i>GIM2</i>
<i>GIM2</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I	gatctgcagctcgagACATTATATCTTGAGGTTTTTAGTCC	5'-Verkürzung <i>GIM2</i>
<i>GIM3</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccATTATGCGTAAGGACGCCATTGC	3'- Verkürzung <i>GIM3</i>
<i>GIM3</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I	gatctgcagctcgagTTCTTAATCAAGACGGGAATCAATG	5'-Verkürzung <i>GIM3</i>
<i>GIM4</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccgaatgAAACAAATTTTGAAGAATTGC	3'-Verkürzung <i>GIM4</i>
<i>GIM4</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I	gatctgcagctcgagtccttaTTCAAACCTCTTTTGCAGTTTG	5'-Verkürzung <i>GIM4</i>
<i>GIM5</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccaTGCAGCATTTACACAGTCCTTG	3'-Verkürzung <i>GIM5</i>
<i>GIM5</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I	gatctgcagctcgagttcttaAATATCTTGATCTGTACAGATTC	5'-Verkürzung <i>GIM5</i>
<i>GIM6</i> NT- <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatccccgggatccaacatgAGGACACAATTGGATATGGTC	3'-Verkürzung <i>GIM6</i>
<i>GIM6</i> CT- <i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> Inew	gatctgcagctcgagttcttaAGTAGTTTCTAAATAGTTCTTC	5'-Verkürzung <i>GIM6</i>
<i>GIM6</i> NTCT-S2 (=CYC1-S2)	atgtggggggagggcgcaatgtaagcgtgacataactaattacatgactcgagttctta ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>GIM6</i> NTCT-S3	aactgttcttctggatcaaaagaaaaacattaaagataaagaagaactatttagaaactact CGTACGCTGCAGGTTCGAC	Epitop-tagging
<i>GIM4</i> AK1- <i>Kas</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatcgggccaggatcctagccaattttatcttagtaacaac	Vorwärtsprimer ohne ATG
<i>GIM4</i> AK2- <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III	gatcaagcttctcgagttttgccaactaagtactgc	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>GIM6</i> AK1- <i>Kas</i> I/ <i>Bam</i> HI	gatcgggccaggatccagatagcacaagaaatgacag	Vorwärtsprimer ohne ATG
<i>GIM6</i> AK2- <i>Xho</i> I/ <i>Eco</i> RI	gatcgaattctcgaaaaggaaaggctattgcccg	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>TUB2</i> - <i>Nco</i> I	cccgggccATGgGAGAAATCATTTCATATCTCGGC	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>TUB2</i> - <i>Pst</i> I/ <i>Not</i> I	actgctgcagcggccgcTTATTCAAAATTCTCAGTGATTG	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>ZUO1</i> - <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I	GATCCTCGAGAAGCTTActtgaacgcaacttagacaaacc	Rückwärtsprimer As110
<i>ZUO1</i> - <i>Bam</i> HI/ <i>Ehe</i> I	gatcggatccggcgccATGTTTTCTTTACCTACCCTAACC	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>ZUO1</i> - <i>Xho</i> I/ <i>Eco</i> RV	gatcgatatctcgagCCTTGCGATGATGACATTGGC	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>ZUO1</i> -S2	acgttctctataaatattcgtatacttcgatata ttctattccatttcttacggtattc ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>ZUO1</i> -S3	tctgcaaagactattgtcgattctggcaaacactac catccagctgtgtctactctgtg CGTACGCTGCAGGTTCGAC	Epitop-tagging
<i>SSZ1</i> - <i>Bam</i> HI/ <i>Ehe</i> I	gatcggatccggcgccATGTCCTCTCCAGTGATTGG	Vorwärtsprimer auf ATG

Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Bezeichnung/Zweck
<i>SSZI-538PstI/XhoI</i>	gatcctcgagctgcagCTCTATAATTCACCCTTTACAGC	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>SSZI-386-BamHI/EheI</i>	gatcggatccggcgccatgATTAGCGATTACGATGCTGACG	Vorwärtsprimer As386
<i>SSZI-384-KpnI-XhoI</i>	gatcctcgaggtaccttaTCTTGCTTGTAAATGCGGCACC	Rückwärtsprimer As384
<i>SSZI-S2</i>	ttccatcatgtatgtattttctatatactatacataccgttttcttagagcgctcta ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>SSZI-S3</i>	cggtgctttaagagtcaccgctagagatttgaaaactggtaatgctgtaaagggtgaatta CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>SRP14-S2</i>	tacacatccaaagataacaagaggcgacatgccttttgactcaagcttttgac tcaagtgtcacgtgcatcaATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>SRP14-S3</i>	gaagagtaagaacggtaccatcagtaagacaggaagaaaaacaaggtag cgaagaaaaacCGTACGC TGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>SRP54-BamHI/NcoI</i>	gatcggatccATGGTTTTGGCTGATTTGGG	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>SRP54-XhoI/ClaI</i>	gatcatcgatcgcagTTAGCCCATACCGAATTGTTTTGC	Rückwärtsprimer mit Stop
<i>BTT1-EcoRI/BamHI</i>	agctgaattcggatccATGCCTGTAGATCAAGAAAAATTAGC	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>BTT1-XhoI/HindIII</i>	agctaagcttctcgagGAACTATGTCAGCTATTCATCAC	Rückwärtsprimer auf Stop
<i>BTT1-EcoRI/SalI</i>	gtcgacgaattcACAATGGGAGATGAAAGCCGC	Stromaufwärts von <i>BTT1</i>
<i>BTT1-XhoI</i>	gtcgacctcgagGAAAAGACATTATGATACTACTGAC	Stromabwärts von <i>BTT1</i>
<i>BTT1-S2</i>	tccacttcgacattcgccactagctataacctttactggcaattattatgaactatgta ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>BTT1-S3</i>	gacggtgctcgaccagctggcgacagatgcagcgagacaaaacaacaagtgatgaatagc CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>EGD1-BamHI/EcoRI</i>	gtcagatccgaattcATAATGCCAATTGACC	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>EGD1-XhoI/XbaI</i>	gcaatctagaactcgagATGTGTTTTTTTATTAAACG	Rückwärtsprimer hinter Stop
<i>EGD1-S2</i>	aaaatggaacaaaatagtgtttttatttaacgttaaataaagattaagttat ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>EGD1-S3</i>	aaagaaggatgaagctattccagagtagtgaaggtaaacctttgatgctgacgtcgaa CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>EGD2-BamHI/EcoRI</i>	agtcggatccgaattcATAATGTCTGCTATCCCAG	Vorwärtsprimer auf ATG
<i>EGD2-XhoI/XbaI</i>	tcagtctgactcgagCGTTAGAATAACTACGTACCCC	Rückwärtsprimer hinter Stop
<i>EGD2-S2</i>	caaatgatttgcgttagaataactacgtaccctatataatattttatatacatta ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>EGD2-S3</i>	gctcacaatggtgacttagtcaacgctatcatgtccttgctctaaa CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>RPL4A-S2</i>	taaagcttatgtatgtataaaaaataaagaatatttttaagtactaataagttta ATCGATGAATTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>RPL4A-S3</i>	gaaggctgaaaagactggtaccaagccagctgctgtttccaccgaaacttgaaacacgat CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>RPL25-BamHI/XbaI</i>	gatcggatccctctagaGAAGAGATGAGGAGGCATGGG	Stromaufwärts von <i>RPL25</i>
<i>RPL25-BamHI/NcoI</i>	gatcggatccATGGCTCCATCTGCTAAGGCTACTGCCGCTAAG AAAGC	Vorwärtsprimer auf ATG (ohne Intron)
<i>RPL25-BglII/XhoI</i>	gatcagatctcgagAACCAATTAGATTAAATGTAACCG	Rückwärtsprimer auf Stop
<i>RPL25-PstI/BglII/XhoI</i>	agctctcgagagatctctcgagAGCCTTGGGAAGCATATTTTG GAG	
<i>RPL25-HindIII/XhoI</i>	gatcaagcttctcgagAATGTAACCGattctgttacgaatg	Rückwärtsprimer ohne Stop

Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Bezeichnung/Zweck
<i>RPL25- XhoI/HindIII</i>	agctctcgagaagctTATATATTCTACCCCATATAAGCG	Stromabwärts von <i>RPL25</i>
<i>RPL25-S2</i>	gtatatttaaagaaaaatttaaaataatattaaattattaattaaccaattagatta ATCGATGAATTTCGAGCTCG	Epitop-tagging
<i>RPL25-S3</i>	ttacgttagattgactgctgactacgatgcttgacattgtaacagaatcggttacatt CGTACGCTGCAGGTCGAC	Epitop-tagging
<i>RPL25-S4</i>	ctcatatgcttttctgctgttgaaaaggctaaacaagaagatcaataagataaaatg CGGTGGCGGCCGCTCTAG	Disruption
<i>RPL25-S5</i>	gtatatttaaagaaaaatttaaaataatattaaattattaattaaccaattagatta CCTCGAGGTC GACGGTATC	Disruption
TSE/AAA-1	CCAATCgCTgCTGcAACCGCTATGAAGAAGGTTGAAG	PCR-Mutagenese <i>RPL25</i>
TSE/AAA-2	GCGGTTgCAGcAGcGATTGGTTGCTCAATGACC	PCR-Mutagenese <i>RPL25</i>
<i>RL23-EcoRV/PstI</i>	agctgatatctcgagATTCGTGAAGAACGTCTGCTG	Vorwärtsprimer ohne ATG
<i>RL23-BamHI/SalI</i>	agctgtcgacggatccTACTCAGCGCCGCAACG	Rückwärtsprimer auf Stop
<i>klURA3-1</i>	CTCTACTGGTATATGATTTTGTGG	Test-PCR Epitop- Tagging
<i>klURA3-2</i>	AAAAGAGAATCAGCGCTCCCC	Test-PCR Epitop- Tagging
<i>SpHIS5</i>	TAGAAAGAGCTTCGTCAAGTGG	Test-PCR Epitop- Tagging
<i>SpHIS5-2</i>	TTAAAGCGTGAAAAGGTTGGGG	Test-PCR Epitop- Tagging
His/Kan reverse	TGGGCCTCCATGTCGCTGG	Test-PCR Epitop- Tagging
His/Kan Rescue	atgcggcgccatcgataagcttgaattcatctgatatctcgag TCCATGTCGCTGGCCGGG	Klonierung von integrierten Tagging Kassetten
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierprimer
T7 Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierprimer
M13-24-HIN	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Sequenzierprimer
M13-24-REV	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Sequenzierprimer
Gall-M1	CTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTG	Sequenzierprimer
Gall-M2	TATAAATAACGTTCTTAATACTAACATAAC	Sequenzierprimer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Großbuchstaben markieren Sequenzen, die mit der DNA-Matrize übereinstimmen, Kleinbuchstaben veränderte oder angehängte Basen

## 2.1.4 Enzyme und Proteine

**Tabelle 2. 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine**

Name	Hersteller
Alkalische Phosphatase (Kälberdarm, CIP)	New England Biolabs
Apyrase	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma/New England Biolabs
DNaseI	Roche
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
Herculase DNA-Polymerase	Stratagene
Pfu Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Sigma
RNasin	Promega
Taq-DNA-Polymerase	Promega
T4-DNA Ligase	Epicentre
TEV-Protease	Invitrogen
Vent DNA-Polymerase	NEB
Zymolyase 20T	Seikagaku (Kogyo)

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, außer *Asp714* (Roche), wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

## 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 2. 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper**

Name	Hersteller	Bemerkung
anti-Myc	Laborpräparat	anti-Myc-Antikörper aus Überstand von Hybridomen der Mauszelllinie 9E10
anti-HA	Laborpräparat	anti-HA-Antikörper aus Überstand von Hybridomen der Mauszelllinie 12CA5
$\alpha$ -mouse-HRP	Dianova	anti-Maus-Antikörper-HRP-Konjugat aus Schaf, Fc $\gamma$ -spezifisch
$\alpha$ -rabbit-HRP	Dianova	anti-Kaninchen-Antikörper-HRP-Konjugat aus Ziege, Fc $\gamma$ -spezifisch
$\alpha$ -Gim1p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Gim1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Gim2p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Gim2p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Gim3p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Gim3p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Gim4p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Gim4p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Gim5p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Gim5p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Gim6p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Gim6p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Act1p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Hefe-Aktin-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Tub1p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Hefe- $\alpha$ -Tubulin-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Tub2p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Hefe- $\beta$ -Tubulin-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Egd1p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Egd1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Egd2p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Egd2p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Ssz1p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Ssz1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Zuo1p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Zuo1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Ssb1p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Ssb1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Ssa1p	Laborpräparat	Polyklonales anti-Ssa1p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Rpl25p	diese Arbeit	Polyklonales anti-Rpl25p-Antiserum aus Kaninchen
$\alpha$ -Rpl3p	J.R. Warner	IgG2b aus Maus-Aszyten (Vilardell and Warner, 1997)

## 2.1.6 Größenstandards

Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die „Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder“ von MBI Fermentas verwendet.

**Fragmente (bp):**

10000, 8000, 6000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

Als Protein-Größenstandards für die SDS-PAGE wurden verwendet:

1. „Bench Mark™ Protein Ladder“ (Invitrogen)

**Molekulargewicht (kDa):**

220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10

2. „Page Ruler™ Protein Ladder“ (MBI Fermentas)

**Molekulargewicht (kDa):**

200, 150, 120, 100, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10

Als Größenstandard für die Gelfiltration wurden verwendet:

1. das “High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit” von Amersham Biosciences

**Tabelle 2. 6: High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (Amersham Biosciences)**

Protein	Quelle	Molekulargewicht (Da)
Blue Dextran	-	>2000.000
Thyroglobulin	Rinderthymus	669.000
Ferritin	Pferdemilz	440.000
Katalase	Rinderleber	232.000
Aldolase	Kaninchenmuskel	158.000

2. das “Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit” von Amersham

**Tabelle 2. 7: Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (Amersham Biosciences)**

Protein	Quelle	Molekulargewicht (Da)
Blue Dextran	-	>2000.000
Albumin	Rinderserum	67.000
Ovalbumin	Hühnerei	43.000
Chymotrypsinogen	Rinderpankreas	25.000
RibonukleaseA	Rinderpankreas	13.700

Medien für Gelfiltration und Affinitätschromatographie

**Tabelle 2. 8: Medien für Affinitätschromatographie und Kopplung**

Name	Verwendung	Hersteller
Ni-NTA Agarose	Reinigung von Proteinen mit 6His-Epitop	Qiagen
Amylose-Resin	Reinigung und Bindung von MBP-Fusionsproteinen	New England Biolabs
IgG Sepharose 6 fast flow	Bindung von ProteinA-Fusionsproteinen	Amersham
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Kopplung gereinigter Proteine	Amersham
ProteinA Sepharose 4B fast flow	Kopplung von Antikörpern	Amersham
rProteinA-Affarose	Kopplung von Antikörpern	Uptima



**Tabelle 2. 9: Medien für Gelfiltration**

Säule	System	Volumen	Matrix	Auftrennungsbereich
Superdex 200 HR10/30	FPLC	24 ml	Agarose/Dextran	10-600 kDa
Superdex 200 HR16/60	FPLC	120 ml	Agarose/Dextran	10-600 kDa
Superdex 200 PC3.2	SMART	2,4 ml	Agarose/Dextran	10-600 kDa
Superose 12	FPLC	24 ml	Agarose	1-300 kDa
Superose12 PC3.2	SMART	2,4 ml	Agarose	1-300 kDa

Alle für die Gelfiltration verwendeten Medien wurden von der Firma Amersham Pharmacia bezogen.

## 2.1.7 Chemikalien

**Tabelle 2. 10: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien**

Name	Hersteller	Name	Hersteller
Aceton	Roth	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
30% Acrylamid/Bisacrylamid (29,2:0,8 und 37,5:1)	N. Diagnostics und Serva	Dithiobis (sulfosuccinimidyl propionat) (DTSSP)	Pierce
Adenin	Sigma	Dithiotreitol (DTT)	Roche
Agar	BD Gibco	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Agarose	SeaKem	Essigsäure	Merck
Alanin	Sigma	Ethanol	Riedel de Haen
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Sigma	Ethanolamin	Fluka
Ammoniumacetat	Roth	Ethidiumbromid	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	Formaldehyd (37%)	Merck
Ampicillin	Roche	5'-Fluororotsäure Monohydrat	ABCR
Antifoam SE-15	Sigma	Freundsches Adjuvans Complete	Sigma
Aprotinin	Roche	Freundsches Adjuvans Incomplete	Sigma
Arginin	Sigma	Genetizindisulfat (G418)	Sigma
Asparagin	Sigma	Glukose	Sigma
Asparaginsäure	Sigma	Glutamin	Sigma
ATP	Sigma	Gluaminsäure	Sigma
Benzamidin	Sigma	Glutaraldehyd (25%)	Sigma
Benomyl (Methyl 1-[butyl- carbamoyl]-2-benzimidazol- carbammat)	Sigma	Glycerin	Sigma
Bromphenolblau	Merck	Glycin	Roth
Chloramphenicol	Roche	Guanidiniumchlorid	Merck
Chymostatin	Roche	Harnstoff	Sigma
Complete EDTA-frei Protaseinhibitormix	Roche	Hefe Extrakt	BD Gibco
p-Coumarinsäure	Sigma	Hefe Stickstoffbasis ohne Amino- säuren und Ammoniumsulfat	BD Difco
Cystein	Sigma	Histidin	Sigma
Cycloheximid	Sigma	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin- N'-2-Ethansulfonsäure] (HEPES)	Roth
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma	IPTG (Isopropyl $\beta$ -D- Thiogalctopyranosid)	PeqLab
Dimethylformamid (DMF)	Merck	Imidazol	Merck
Dimethylpimelimidat (DMP)	Sigma	myo-Inositol	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Isoleucin	Sigma

Name	Hersteller
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
Kupferchlorid	Sigma
Kupfersulfat	Merck
LatrunculinA	Molecular Probes
Leupeptin	Roche
Leucin	Sigma
Lithiumacetat Dihydrat	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)	Fluka
Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck/Roth
Methionin	Sigma
<sup>35</sup> S-Methionin	Amersham
3-[N-Morpholino-]propansulfon- säure-(MOPS)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydroxid	Merck
Natriummonohydrogenphosphat	Fluka
Natriumsulfat	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Nonidet P40	Fluka
Norleucin	Sigma

Name	Hersteller
Paromomycin-sulfat	Sigma
Pefablock SC	Roth
Pepstatin	Roche
Pepton	Difco
Phenylalanin	Sigma
Polyethylenglycol (MW 3350)	Sigma
PonceauS	Sigma
Prolin	Sigma
Promix	Amersham
Puromycin	Sigma
Rubidiumchlorid	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure (37%)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
Serin	Sigma
Serva Blue R250	Serva
Silbernitrat	Riedel de Haen
Sorbitol	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
TEMED (N,N,N',N',-Tetra- methylendiamin)	Roth
Threonin	Sigma
Tricin	Sigma
Triton-X-100	Fluka
Trizma-Base (Tris[hydroxymethyl]amino methan)	Sigma
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Trypton	Difco
Tryptophan	Sigma
Tween 20	Calbiochem
Tyrosin	Sigma
Uracil	Sigma
Valin	Sigma
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3- indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	Biomol

## 2.1.8 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2. 11: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
ALATI (Proteaseinhibitor)	4 mM Antipain 4 mM Leupeptin 0,4 mM Aprotinin 0,12 mM Trypsin-Inhibitor in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Anodenpuffer I (Westernblot)	0,3 M Tris 20% Methanol pH 10,4
Anodenpuffer II (Westernblot)	25 mM Tris 20% Methanol pH 10,4
Anodenpuffer (Tricingele)	0,2 M Tris-HCl, pH8,9
Blockierlösung (Westernblot)	5% Magermilchpulver in TBS-T
DNA-Auftragspuffer	0,015% Bromphenolblau 0,015% Xylencyanol 1,8% Glycerin
Ethidiumbromid-Stammlösung	1mg/ml in TAE
Ethidiumbromid-Färbebad	1µg/ml in TAE
Gelpuffer (Tricingele)	3 M Tris-HCl, pH 8,45 0,3% SDS
HU-Auftragspuffer (SDS-PAGE)	100 mM NaPi, pH 7,0 4% SDS 8,0 M Harnstoff 0,02% Bromphenolblau 1,25% β-Mercaptoethanol
Kathodenpuffer (Westernblot)	40 mM Norleucin 20% Methanol pH 7,6 mit Tris-HCl
Kathodenpuffer (Tricingele)	100 mM Tris-HCl, pH 8,25 100 mM Tricin 0,1% SDS
10 x Laemmli Puffer (SDS-PAGE)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
Laemmli-Auftragspuffer (SDS-PAGE)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% Glycerin 20% SDS 0,0025% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
10x PBS	81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 270 mM KCl 1,4 M NaCl (pH 7,5)
PC (Proteaseinhibitormix)	0,4 mM Pepstatin 10 mM Chymostatin in DMSO
PonceauS-Färbelösung	0,2% PonceauS 3% TCA
50 x TAE	2 M Tris 64 mM EDTA pH 7,7 mit Essigsäure
10 x TBS	0,5 M Tris-HCl, pH 7,6 1,5 M NaCl
TBS-T	0.05% Tween 20 in 1 x TBS
10 x TE	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Übersichtungspuffer (Tricingele)	1 M Tris-HCl, pH 8,45 0,1% SDS
X-Gal Stammlösung	40 mg/ml in 70% DMF
Natriumphosphatpuffer	57,7 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 42,3 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest. (pH 7,0)

## 2.1.9 Medien

**Tabelle 2. 12: In dieser Arbeit verwendete Medien**

**S. cerevisiae-Medien:**

YPD-Medium:	10 g/l Hefeextrakt	
	20 g/l Pepton	
	20 g/l Glukose	
<b>SC-Medium:</b>	6,7 g/l Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	
	20 g/l Glukose	
	2 g/l Dropout-Mix	
<b>SC-Ade-Lys-His-Trp-Leu-Ura Drop out Mix:</b>	20 g Alanin	20 g Iso-Leucin
	20 g Arginin	20 g Methonin
	20 g Asparagin	2 g p-Aminobenzoessäure
	20 g Asparaginsäure	20 g Phenylalanin
	20 g Cystein	20 g Prolin
	20 g Glutamin	20 g Serin
	20 g Glutaminsäure	20 g Threonin
	20 g Glycin	20 g Tyrosin
	20 g myo-Inositol	20 g Valin

Je nach benötigtem Selektionsmedium werden 32,4 g dieses Mixes die entsprechenden Aminosäuren in folgenden Mengen beigemischt:

0,5 g Adenin	4,0 g Leucin
2,0 g Lysin	2,0 g Uracil
2,0 g Histidin	2,0 g Tryptophan

Agar-Platten enthalten zusätzlich zu den oben angegebenen Inhaltsstoffen 20 g Agar/Liter. Zur Herstellung von 1 Liter SC-Platten wurden Agar und Medium in je 500 ml Wasser gelöst, getrennt autoklaviert und danach vereinigt. Dadurch wird die Hydrolyse des Agars durch Kochen im sauren SC-Medium (ca. pH 4,5) verhindert. Flüssigmedien wurde vor Gebrauch sterile Adenin-Lösung zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Für 1 Liter Raffinose/Galaktose-Medium wurde das Medium in 300 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> autoklaviert und danach je 100 ml 20% [w/v] Raffinose und 20% [w/v] Galaktose-Lösung zugegeben. Für Flüssigmedium wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 1 Liter aufgefüllt, für Platten wurde das Medium mit 500 ml 2x Agar (s.o.) vermischt.

**G418-Platten:** wie YPD-Medium. Nach dem Autoklavieren werden 200 mg/l Geneticin (G418) zugegeben.

**5'-FOA-Platten:**

6,7 g/l Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
20 g/l Glukose
2 g/l SC-URA Drop-out Mix
50 mg/l Uracil
1 g/l 5'-FOA
20 g/l Agar

**Benomyl-Platten:** wie YPD-Medium. Nach dem Autoklavieren wird das Medium aufgeteilt und eine 2,5 mg/ml Benomyl-Stocklösung (in DMSO) zu Endkonzentrationen von 2,5 µg/ml (1:1000), 5 µg/ml (1:500), 7,5 µg/ml (1:333), 10 µg/ml (1:250), 15 µg/ml (1:167) bzw. 20 µg/ml (1:125) langsam unter Rühren zugegeben. Als Kontrolle wird einem Teil Medium DMSO in einer Menge, die dem maximal eingesetzten Volumen der Benomyl-Stocklösung entspricht, zugegeben.

**Paromomycin-Platten:** wie YPD oder SC-Medium. Nach dem Autoklavieren wird das Medium aufgeteilt und 75 mg/l, bzw. 150 mg/l Paromomycinsulfat (in sterilem Wasser) zugegeben.

**Einfriermedium für Hefestämme:** 15% Glycerin

**E. coli-Medien:**

**TY-Medium:**

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl

Zur Herstellung Antibiotika-haltiger Medien wurden nach dem Autoklavieren je nach vorhandenen Resistenzmarkern folgende sterile Antibiotika Lösungen zugegeben:

100 mg/ml Ampicillin in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml (1:1000) bei ÜN-Anzucht, bzw. 0,05 mg/ml (1:2000) bei Anzucht für wenige Stunden, 50 mg/ml Kanamycin in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zu einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml (1:1000) und/oder 20 mg/ml Chloramphenicol in EtOH zu einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml (1:1000).

Agar-Platten enthalten zusätzlich zu den oben angegebenen Inhaltsstoffen 20 g Agar (pro Liter).

**X-Gal-Platten:** wie TY-Platten. Nach dem Erkalten werden pro Platte 40µl 40 mg/ml X-Gal (in 70% DMF) aufgespätelt.

**SOC-Medium:**

5 g/l Hefeextrakt  
20 g/l Trypton  
20 g/l Glukose  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM NaCl

**Einfriermedium für E. coli-Stämme:** 50% Glycerin

## 2.1.10 Verwendete Kits

QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Qiagen) und Jet Sorb Gel Extraction Kit (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit, QIAfilter<sup>™</sup> Plasmid Midi Kit (beides Qiagen) zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Rapid Translation System RTS100 *E. coli* HY Kit (Roche) für die *in vitro* Translation.

TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen), zur schnellen Klonierung von PCR-Produkten

BioRad Protein Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

ECL (Amersham Pharmacia) zur Detektion von Antikörpersignalen im Westernblot

### 2.1.11 Sonstige Materialien

5 ml Polypropylensäulen (Pierce), Polyprep- und Econo-Pac Chromatographiesäulen (BioRad), Vivaspin 15 Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussvolumen 10 kDa), Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm (Sartorius), Zellutrans Dialyseschlauch 3,5 (Roth), Mobicol-Zentrifugationssäulchen (MoBiTec), Zentrifugenbecher und -röhrchen (Nalgene), Quartzküvette 45 x 12.5 x 12.5 QS (Hellma), 0,2 ml Mikro Strips (ABGene) Filterpapier 3MM (Whatman), Protran<sup>®</sup> Nitrocellulose Membran (Schleicher&Schuell), Glasperlen Ø 0,45-0,6 mm (Sigma), Hyperfilm ECL (Amersham), Kodak XOMat (Kodak), Thermalpapier (Mitsubishi), Petrischalen (Greiner), Microlance3 Sterile Einmal-Kanülen 0,45 x 10 mm (Becton-Dickinson), Objektträger, Deckgläschen (Marienfeld), Steritop 0,22 µm (Millipore), 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen, Einmal-Plastikküvetten (Sarsted), Parafilm (Nescofilm, Nippon Shoji Kaisha LTD), UV-Plastikküvetten (Plastibrand).

### 2.1.12 Geräte

**Tabelle 2. 13: In dieser Arbeit verwendete Geräte**

Hersteller	Ort	Name
Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden	GeneQuant pro RNA-DNA Calculator
Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden	FPLC-System, Smart-System
Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden	Schreiber, Fraktionssammler, UV-Monitoren
Avestin	Ottawa, Canada	Emulisiflex High pressure Homogenizer
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland	DU <sup>®</sup> 640 Spectrophotometer
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland	DU <sup>®</sup> 800 Spectrophotometer
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland	Avanti <sup>™</sup> J-25 Zentrifuge
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland	Allegra <sup>™</sup> 6R Zentrifuge
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland	Optima <sup>™</sup> -L90 Ultrazentrifuge
Bender & Hobein	Zürich, Schweiz	Vortex
Bioengineering	Wald, Schweiz	Fermenter
Biometra	Göttingen, Deutschland	Tpersonal PCR-Maschine
BioRad	München, Deutschland	GelAir Drying System
BioRad	München, Deutschland	E.coli Pulser <sup>®</sup> II
BioRad	München, Deutschland	MiniProtean Elektrophoresesystem
BioRad	München, Deutschland	Mini-Sub Cell GT Elektrophoresekammern
Canon	Tokio, Japan	Canoscan D2400U Flachbrettscanner
Eppendorf	Hamburg, Deutschland	Tischzentrifugen 5415D und 5417R
Eppendorf	Hamburg, Deutschland	Mixer 5432 und Thermomixer
Epson	Meerbusch, Deutschland	Epson Expression 1680Pro Gelscanner
Fotodyne Inc.	Hartland, WI, USA	Foto UV21 Transilluminator
GFL	Burgwedel, Deutschland	Schüttelwasserbad
Heraeus	Hanau, Deutschland	Inkubatoren
Jasco Inc.	Tokio, Japan	J-715 Spectropolarimeter
Kodak	Stuttgart, Deutschland	X-Omat Filmentwicklermaschine
Labconco UniEquip	Kansas City, MO, USA	Auto Densi-Flow Gradientenernter
BioComp Instruments Inc.	New Brunswick, Canada	Biocomp Gradient Master
Lauda	Lauda-Königshofen, Deutschland	Wasserbad E100

<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Name</b>
Mettler Toledo	Giessen, Deutschland	Elektronische Feinwaage, Laborwaage
Misonix Inc.	Farmingdale, NY, USA	XL-2020 Sonicator®
MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland	Bioprint D5 Geldokumentation
New Brunswick Scientific	Edison, NJ, USA	Schüttler Innova 4430
Padenberg	Lahr/Baden, Deutschland	Durchflusszentrifuge
Raytest	Straubenhardt, Deutschland	Phosphoimager FLA-2000
Raytest	Straubenhardt, Deutschland	Luminescent Image Analyser LAS-3000
Savant	Farmingdale, NY, USA	Slab Geldryer SGD300
Savant	Farmingdale, NY, USA	DNA Speedvac® DNA110
Sharp	Hamburg, Deutschland	Mikrowelle
Thermoquest	Waltham, MA, USA	Forma Science Orbital Shaker
Wyatt Technology	Dernbach, Deutschland	Eclipse2 AFFF-Apparatur
Zentralwerkstatt	MPI Biochemie, Deutschland	Semi-Dry-Blotapparatur, Streifenblotapparatur



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische und genetische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 230 rpm oder auf Festmedien bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden aus Glycerinkulturen bzw. direkt von TY-Transformationsplatten angeimpft.

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde 1 ml einer stationären Übernachtskultur (gewachsen in entsprechendem Selektionsmedium) mit 0,5 ml einer sterilen, 50%-igen Glycerinlösung vermischt und bei -80°C aufbewahrt. Zelldichten wurden photometrisch (vgl. 2.2.1.4) bestimmt.

#### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen die Transformation chemisch kompetenter Zellen durch einen Hitzeschock, zum anderen die Transformation Elektroporations-kompetenter Zellen durch einen elektrischen Puls.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes über Nacht eine Vorkultur in TY-Medium gezogen. Diese wurde 1:50 in 400 ml frisches Medium überimpft und die so entstandene Hauptkultur bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur ca. 10 Min. in Eiswasser abgekühlt und die Zellen in sterilen Zentrifugationsgefäßen sedimentiert (10 Min., 2000xg, 4°C).

##### 2.2.1.2.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde das Sediment in 100 ml kaltem RF1-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% [w/v] Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure, steril) resuspendiert, in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 2 Std. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation (10 Min., 900xg, 4°C) wurden die Zellen durch sanftes Schwenken in RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% [w/v] Glycerin, pH 6,8 mit NaOH, steril) resuspendiert und im Trockeneis/Ethanol-Bad in 550 µl Aliquots schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden 100-150 µl kompetente Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz vermischt, 30 Min. auf Eis inkubiert und anschliessend einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C (Wasserbad) ausgesetzt.

Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt, mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln (Eppendorf Thermomixer, 450 rpm) inkubiert. Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können und Einzelkolonien zu erhalten, wurden zunächst 100 µl der Zellsuspension auf entsprechendes Selektionsmedium plattiert. Der Rest der Suspension wurde sanft pelletiert (3 Min., 3300xg, RT), in ca. 200 µl SOC-Medium aufgenommen und ebenfalls plattiert. Für einfache Plasmid-DNA Transformationen wurde auf die 1:100 Verdünnung verzichtet, der gesamte Ansatz pelletiert, in 200 µl SOC-Medium aufgenommen und plattiert.

#### **2.2.1.2.2 Herstellung und Transformation Elektroporations-kompetenter Zellen**

Zur Herstellung Elektroporations-kompetenter Zellen wurde das Zellsediment zur Erniedrigung der Ionenstärke zunächst mit einem (400 ml), dann mit einem halben (200 ml) Kulturvolumen kaltem, sterilem Wasser gewaschen, und schliesslich in einem fünfzigstel Kulturvolumen (8 ml) sterilen 5% Glycerin resuspendiert. Nach einer abschliessenden Zentrifugation (10 Min., 900xg, 4°C) wurden die Zellen in 800 µl sterilem 10% Glycerin aufgenommen, über Trockeneis/Ethanol in 90 µl Aliquots eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 40 µl Zellsuspension wurden mit 0,5 µl Plasmid-DNA (ca. 0,5 pg DNA) oder 5 µl eines Ligationsansatzes (ca. 10 pg DNA) gemischt und in eine vorgekühlte 0,1 cm breite, EtOH-gewaschene Elektroporationsküvette überführt. Diese wurde in die vorgesehene Halterung des Elektroporationsgeräts gesteckt (E. coli Pulser® II, BioRad) und direkt danach der Puls ausgelöst (1,8 kV, 25 µF, 200 Ω). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 Millisekunden liegen. Nach dem Puls wurde sofort 1 ml TY-Medium in den Transformationsansatz pipettiert und dieser in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zur Regeneration 60 Min. bei 37°C unter leichtem Schütteln (Eppendorf Thermomixer, 450 rpm) inkubiert und anschließend auf entsprechende Selektionsplatten plattiert.

#### **2.2.1.3 Kultivierung von *S. cerevisiae***

*S. cerevisiae* Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 230 rpm oder auf Agarplatten bei 30°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden aus Glycerinkulturen, von frischen Transformationsplatten, oder von bewachsenen Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

Dauerkulturen für die langfristige Aufbewahrung wurden hergestellt, indem die Zellen zunächst großflächig (ca. 2 cm<sup>2</sup>) auf eine den Wachstumsanforderungen entsprechende Platte ausgestrichen und bis zum Erreichen der stationären Phase (2-3 Tage) inkubiert wurden. Die

Zellen wurden mit einer sterilen Glaspipette von der Platte in 1 ml 15%-ige Glycerinlösung überführt, gut resuspendiert und über Trockeneis eingefroren, um ein Sedimentieren der Zellen vor dem kompletten Frieren zu verhindern. Die Dauerkulturen wurden bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Zelldichte von *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem DU640 Spectrophotometer (Beckman) bei 600 nm bestimmt. Dabei entsprach 1 OD<sub>600</sub> ca. 4-6x 10<sup>7</sup> Zellen. Um im linearen Bereich zu messen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass Messwerte unter 0,5 OD<sub>600</sub> erhalten wurden. Zur Kalibrierung des Nullwerts wurde das jeweilige Kulturmedium verwendet.

#### 2.2.1.5 Bestimmung der Verdopplungszeit von Hefestämmen

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurde eine frische Übernachtskultur auf OD<sub>600</sub> = 0,1 verdünnt und unter Schütteln bei gewünschter Temperatur (meist 30°C) inkubiert. In definierten Abständen (meist 2 Std.) wurden Proben entnommen und deren Zelldichte photometrisch bestimmt. Die Verdopplungszeit errechnet nach den Formeln:

$$\text{a) } \mu = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2 (t - t_0)} \quad \text{und} \quad \text{b) } t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

wobei N<sub>0</sub> die optische Dichte zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> und N die optische Dichte zum Zeitpunkt t darstellt. lg 2 = 0,3. Vereinfacht ergibt sich nach Integration dieser Formeln und Auflösen nach t<sub>D</sub>:

$$t_D = \Delta t / 3,3x (\lg N - \lg N_0)$$

Die Berechnung erfolgte anhand der Messwerte während der logarithmischen Phase des Wachstums (zwischen 0,3 und max. 1,2 OD<sub>600</sub>).

#### 2.2.1.6 Fermentation von Hefezellen im Großmaßstab

Für eine 200 Liter Kultur des Stammes KSY89 (*MATa gim2::GIM2-TEV-spa*) wurden 2 kg Hefe-Extrakt, 4 kg Trypton und 80 g Adenin im Fermenter (Bioengineering) in 190 Liter H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eingerührt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurden 10 Liter sterilfiltrierte 40% Glukose-Lösung und ca. 0,5 ml Antifoam SE-15 (autoklaviert, Sigma) zugegeben. Das Medium wurde mit ca. 200 ml einer stationären Übernachtskultur (in YPD)

angeimpft und im Fermenter bei 30°C und maximaler Sauerstoffzufuhr unter Rühren (250 rpm) über Nacht inkubiert. Die Ernte erfolgte nach Erreichen von 3-4 OD<sub>600</sub> per Durchflusszentrifuge. Dazu wurde der Inhalt des Fermenters in ein 200 Liter Auffanggefäß überführt und über eine Pumpe kontinuierlich in die laufende Zentrifuge eingefüllt. Nach der Zentrifugation (ca. 1 Std.) wurde der Durchflussrotor auseinandergelassen, das Zellpellet mit einem Schaber in einen 5 Liter Messbecher überführt, Pelletreste mit Wasser abgespült und mit dem festen Pellet vereinigt. Das Pellet wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zu einer glatten Masse verrührt und in gewogenen Zentrifugenbechern erneut zentrifugiert (Beckman JLA10.500, 10 Min., 4000xg, 4°C). Die Pellets wurden mit 15% [w/w] 15% Glycerin vermischt und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Zellpellets wurden bei -80°C gelagert. Die Ausbeute lag bei ca. 10 g Zellen pro Liter Kultur.

## **2.2.1.7 Transformation von *S. cerevisiae***

### **2.2.1.7.1 Herstellung kompetenter Zellen**

50 ml YPD-Medium wurden mit einer frischen Übernachtskultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,15 angeimpft und unter Schütteln bei 30°C inkubiert, bis eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> 0,5 bis 0,8 erreicht war. Die Zellen wurden daraufhin in 50 ml Reaktionsgefäßen für 3 Min. bei 1000xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit einem Kulturvolumen (50 ml) sterilem Wasser gewaschen, erneut abzentrifugiert (3 Min., 1000xg, RT), in 12,5 ml LiSorb (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, filtersterilisiert) resuspendiert und ca. 40 Min. bei RT auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach Wiederholung der Zentrifugation und vollständiger Entfernung des Zentrifugationsüberstandes wurden die Zellen in 600 µl LiSorb aufgenommen, im Verhältnis 1:10 mit Träger-DNA (10 mg/ml Heringsperma DNA, Yeastmaker, Clontech) versetzt und zur Lagerung in Aliquots zu 50 µl bei -80°C eingefroren.

### **2.2.1.7.2 Transformation von Hefezellen**

Für die Transformation mit PCR-Produkten oder mehreren Plasmiden wurden 50 µl Zellsuspension verwendet. Für einfache Plasmid-Transformationen waren in der Regel 10 µl ausreichend, und die Ansatzgröße konnte entsprechend verringert werden.

50 µl Zellsuspension wurden mit 2-5 µg PCR-Produkt oder 1 µg Plasmid-DNA vermischt, 300 µl LiPEG (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 40% PEG3350, filtersterilisiert) zugegeben und dieser Ansatz 20 Min. unter Schütteln bei RT inkubiert (Eppendorf Mixer 5432). Nach Zugabe von 35 µl DMSO und gründlichem Mischen wurde der Ansatz für 15 Min. bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen 3 Min.

bei 1500xg und RT sedimentiert, 1x mit sterilem Wasser oder Medium gewaschen und erneut sedimentiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl Wasser bzw. Medium aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten plattiert. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. In der Regel wurden Transformanden vor ihrer weiteren Verwendung auf Selektionsmedium vereinzelt. Zur Selektion auf G418-haltigen Platten wurden die Zellen vor dem Plattieren in 3 ml YPD-Medium resuspendiert und mind. 4 Std. bei 30°C inkubiert. Diese Regenerationszeit erlaubt den Zellen die Transkription und Translation der für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Gene und die Bildung der entsprechenden Genprodukte, bevor sie mit der Chemikalie konfrontiert werden. Nach ca. 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen replikaplattiert (siehe 2.2.1.8), um das Hintergrundwachstum falsch-positiver Zellen, die die Antibiotikaresistenz nicht stabil integriert haben, zu verringern.

### **2.2.1.8 Replikaplattierung von Hefezellen**

Bei der Replikaplattierung werden Hefekolonien mit Hilfe eines Lederbergstempels aus sterilem Saft von einer Platte auf eine andere Platte übertragen. Beibehalten einer bestimmten Orientierung ermöglicht dabei, wenn nötig, die Zuordnung der Kolonien auf verschiedenen Platten. So kann eine große Menge Kolonien gleichzeitig bezüglich verschiedener Phänotypen, wie z.B. Aminosäureauxotrophien getestet werden, oder, wie im Fall der G418-Selektion, das Hintergrundwachstum falsch-positiver Transformanden durch Übertragung auf eine frische G418-Platte reduziert werden.

### **2.2.1.9 Kreuzung haploider *S. cerevisiae* Stämme**

Unter Kreuzung versteht man die Verschmelzung zweier haploider Hefezellen unterschiedlichen Paarungstyps ( $MATa/MAT\alpha$ ) zu einer diploiden Zelle. Diese beginnt mit der Erkennung des jeweils anderen Paarungstyps durch Pheromone. Zellen des Paarungstyps  $MATa$  sekretieren das Hormon a-Faktor, während Zellen des Paarungstyps  $MAT\alpha$   $\alpha$ -Faktor ins Medium abgeben. Durch die Bindung des Pheromons an Oberflächenrezeptoren der Partnerzelle kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der den Ablauf verschiedener paarungsspezifischer Signalwege ermöglicht, bevor es schließlich zu Zell- und Kernfusion kommt, die den Konjugationsvorgang abschließen.

Zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps ( $MATa$ , bzw.  $MAT\alpha$ ), die Plasmide mit unterschiedlichen Selektionsmarkern enthielten, wurden in je 4 ml des entsprechenden Selektionsmediums bei 30°C bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,8 kultiviert. Nach

Sedimentation (3 Min., 1000xg, RT) wurden die Zellen in je 1 ml Vollmedium (YPD) aufgenommen und je 500 µl der Zellsuspensionen miteinander vermischt. Das Zellgemisch wurde ca. 6 Std bei 30°C inkubiert, auf zweifach Selektivmedium aufgetropft und auf den Platten für weitere 2 Tage bei 30°C inkubiert. Nur diploide Zellen, die durch Paarung beide Plasmide erhalten haben, können auf dem zweifach Selektionsmedium wachsen. Die Zellen wurden vor ihrer weiteren Verwendung auf Selektionsmedium vereinzelt.

#### **2.2.1.10 Bestimmung des Kreuzungstyps von *S. cerevisiae***

Die Bestimmung des Kreuzungstyps eines Hefestammes erfolgte durch „Testkreuzung“ mit zwei Hefestämmen (RC757, *MAT $\alpha$* ; RH448, *MAT $a$* ). Diese Stämme weisen bedingt durch Mutationen eine Hypersensitivität gegenüber dem komplementären Paarungspheromon ( $a$ - bzw.  $\alpha$ -Faktor) auf. Dadurch kann der Rezeptor-vermittelte Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der durch das Paarungspheromon bedingt wird, nicht mehr aufgehoben werden. Es kommt zur Bildung eines Hemmhofs, wenn Zellen entgegengesetzter Paarungstypen aufeinander treffen. Diploide Zellen hingegen erzeugen mit keinem der beiden Testerstämme Hemmhöfe, da sie keine Paarungspheromone sekretieren.

Eine frische Einzelkolonie des jeweiligen Testerstammes wurde in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden 10 ml einer 1%-igen [w/v] Agarlösung (in YPD) beigemischt und damit eine Vollmedium-Platte überschichtet. Nach Festwerden des Agars wurden die zu testenden Hefestämmen vorsichtig auf den mit Testerstämmen überschichteten Platten ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C.

#### **2.2.1.11 Genetische Manipulation von Hefezellen**

##### **2.2.1.11.1 Fusion eines Zielgens mit einem Epitop-tag**

Um ein beliebiges Gen am 3' Ende mit einem Epitop-tag zu fusionieren, wurde eine auf PCR basierende Strategie verwendet (Knop et al., 1999). Hierzu werden mittels PCR Kassetten amplifiziert, die neben dem zu fusionierenden Epitop-tag einen Resistenz- oder Auxotrophie-marker zur Selektion enthalten. Als Matrize dienten die als pYM bezeichneten Plasmide (siehe Tab. 2.2). Die verwendeten Primer (-S2/-S3, Tab. 2.3), enthalten neben den Sequenzen zur Amplifikation der PCR-Kassette auch Sequenzen (ca. 60 bp), die homolog zum Bereich vor und hinter dem Stop-Codon des Zielgens sind. Diese erlauben, nach Transformation von Zellen mit dem gefällten PCR-Produkt, die Integration des Epitop-tags über homologe Rekombination der Kassette in den entsprechenden chromosomalen Locus des Zielgens. Dabei wird das

ursprüngliche Stop-Codon des Zielgens ersetzt, und das Leseraster bis zum Stop-Codon des Epitop-Tags erweitert.

Die korrekte Integration des Epitop-tags wurde mittels Westernblot (Gen- oder Epitop-spezifische Antikörper) oder PCR überprüft. Dabei wurden Primer verwendet, die mit Sequenzen im Zielgen und mit Bereichen der Kassette, z.B. dem Resistenzmarker hybridisieren. Auf diese Weise kann ein PCR-Produkt nur dann generiert werden, wenn die Epitop-Kassette am korrekten Locus integriert wurde. Kassetten standen für die Amplifikation des Hämagglutinin-Epitops (HA), des c-myc-Epitops (Myc), des 6His-Epitops und des FLAG-Epitops in Kombination mit verschiedenen heterologen Resistenz- (*kanMX6*, vermittelt Resistenz gegenüber Geneticin) und Auxotrophiemarkern (*His3MX6*, *klTRP1*) zur Verfügung.

In einer Abwandlung dieser Methode wurde über homologe Rekombination ein Epitop-tag am 3'-Ende eines plasmidcodierten Gens (*gim6NTCT*) angefügt. Dazu wurde die entsprechende Kassette mit spezifischen S2/S3-Primern aus pYM16 amplifiziert. Über die Primer wurden an einem Ende des PCR-Produkts 60 bp, die homolog zum 3'-Ende des *gim6NTCT*-Gens sind angefügt, während am anderen Ende 60 bp, die homolog zum *CYC*-Terminator sind, angehängt wurden. Gleichzeitig codiert die Kassette für den heterologen *kanMX6*-Marker. Diese Kassette wurde per Transformation (2.2.1.7) in einen haploiden *GIM6*-Deletionsstamm eingebracht, der die plasmidcodierte Version des *gim6NTCT*-Gens unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors/*CYC*-Terminators enthielt. Unter entsprechendem Selektionsdruck (G418-Platten), wurde das PCR-Produkt über homologe Rekombination in das Plasmid integriert.

#### **2.2.1.11.2 Gendisruption**

Um die chromosomale Disruption eines Gens zu erreichen, wurde eine ähnliche PCR-basierte Strategie, wie für die Insertion eines Epitop-tags verfolgt (Longtine et al., 1998). Die hierfür verwendeten Primer (-S4/-S5, Tab. 2.3) enthalten neben Sequenzen, die der Amplifikation der Disruptionskassette aus einem entsprechenden Plasmid (z.B. pCRScriptloxPHIS5loxP, vgl. Tab. 2.2) dienen, ca. 60 bp die zum 5'-Bereich des Start-Codons, bzw. zum 3'-Bereich des Stop-Codons des Zielgens komplementär sind. Nach Transformation mit der Kassette wird das entsprechende Zielgen über homologe Rekombination durch die Kassette ersetzt. Die Überprüfung auf korrekte Integration der Kassette erfolgte mittels Westernblot (genspezifischer Antikörper im Vergleich mit entsprechendem Wildtyp) oder PCR. Hierfür wurden Primer verwendet, die einerseits im Promotor- oder Terminatorbereich des Gens, andererseits mit dem in der Kassette codierten Selektionsmarker hybridisieren, sodass ein Produkt der erwarteten Größe nur entsteht, wenn die Kassette mit dem Selektionsmarker am richtigen Locus integriert wurde.

Als Selektionsmarker standen hier die heterologen Auxotrophiemarker *SpHIS5* (aus *Schizosaccharomyces pombe*), *klURA3* (aus *Kluyveromyces lactis*) und der heterologe Resistenzmarker *kanMX6* zur Verfügung, der Resistenz gegenüber Geneticin (G418) vermittelt.

#### **2.2.1.11.3 Entfernen eines chromosomal integrierten Selektionsmarkers (*Marker rescue*)**

In der Disruptionskassette ist die Sequenz des Selektions- bzw. Resistenzmarkers von zwei loxP- (*locus for crossingover of P1 phage*) Sequenzen flankiert, die der Cre-Rekombinase (*causes recombination*) des P1-Phagen als Erkennungssequenz dienen. Um den über die Disruptionskassette chromosomal integrierten Selektionsmarker wieder zu entfernen und somit die Disruption eines weiteren Gens unter Verwendung desselben Selektionsmarkers zu ermöglichen, wurden die entsprechenden Zellen mit einem Plasmid transformiert, das für die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors codiert. Galaktose-vermittelte Expression der Rekombinase führt zur Rekombination zwischen den beiden loxP-Sequenzen. Dabei wird der Selektionsmarker als ringförmiges DNA-Fragment ausgeschnitten, das im Laufe der folgenden Zellteilungen verloren geht, während eine Kopie der loxP-Sequenz am ursprünglichen Locus zurückbleibt.

#### **2.2.1.12 Plasmid *shuffle***

Plasmid *shuffle* ist eine Methode, die es erlaubt die Funktion essentieller Gene in einer Zelle zu untersuchen. Die vom *URA3*-Gen codierte Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase wandelt die Chemikalie 5'-FOA (5'-Fluororotsäure) in das für die Zellen toxische 5'-Fluorouridin-Monophosphat um. Dieses inhibiert irreversibel die Thymidylatsynthase der Zellen, die daraufhin kein dTTP mehr bilden können. Die DNA-Synthese kommt zum Erliegen, die Zellen teilen sich nicht mehr. Verlieren die Zellen aber das *URA3*-codierende Gen, können sie auf 5'-FOA wachsen. Um das Wachstum der Zellen nach dem Verlust des *URA3*-Plasmids zu ermöglichen, sind dem 5'-FOA-Medium ausreichende Mengen Uracil zugesetzt (2.1.10). Für den Plasmid *shuffle* wurde ein haploider Stamm zunächst mit einem Plasmid transformiert, das neben der Wildtyp-Form des zu untersuchenden Gens den *URA3*-Selektionsmarker codiert. Anschliessend wurde in diesem Stamm die chromosomale Kopie des essentiellen Gens (wie in Punkt 2.2.1.11.2 beschrieben) deletiert, sodass das Überleben der Zellen vom Plasmid-codierten Gen abhing. Die zu untersuchende Genvariante wurde ebenfalls auf einem Plasmid eingebracht, wobei dieses einen anderen Selektionsmarker als das *URA3*-Gen enthalten musste. Durch Wachstum auf 5'-FOA-haltigem Medium wurde der Verlust des *URA3*-Plasmids erzwungen, wodurch der Effekt der veränderten Genkopie sichtbar wurde.



### 2.2.1.13 *gap repair*

*gap repair* ist eine auf homologer Rekombination basierende Klonierungstechnik.

Um eine mutierte Form des *RPL25*-Gens durch das chromosomale Wildtyp-Gen zu ersetzen, wurde der Ausgangsvektor, der die Mutation enthält, mit Restriktionsenzymen derart linearisiert, dass die Mutation ausgeschnitten wird, an beiden Enden des linearen Vektors jedoch noch mind. 40 bp der Gensequenz zurückbleiben (2.2.2.6.1). Diese Bereiche dienen, nach Transformation eines haploiden Hefestamms mit linearisiertem Vektor, der homologen Rekombination mit dem Hefegenom. Dadurch wird die Lücke im Zielgen mit der chromosomalen, unveränderten Genkopie geschlossen und der Vektor wieder zirkularisiert. Rekombinationsereignisse, und damit die Integration der chromosomalen Genkopie in das Plasmid, wurden begünstigt, indem auf einen Plasmid-vermittelten Vorteil, z.B. G418-Resistenz oder Aminosäureauxotrophie selektiert wurde. Positive Transformanten wurden vereinzelt, deren Plasmid-DNA isoliert (2.2.2.2.2) und zur Amplifikation über Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht (2.2.1.2.2). Um den Erfolg der *gap repair* zu überprüfen, wurde die DNA aus den Transformanten reisoliert, und per Sequenzierung (2.2.2.11) analysiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Birnboim and Doly, 1979)

1,5 ml einer Antibiotika-haltigen Übernachtskultur von *E. coli* wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 1 Minute bei 16100xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 300 µl P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Zugabe von 300 µl P2 (200 mM NaOH, 1%SDS) und mehrmaliges vorsichtiges Invertieren der Röhren führte zur Lyse der Zellen. Zum Neutralisieren wurden 300 µl P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und abzentrifugiert (10 Min., 20800xg, 4°C). In diesem Schritt werden die aus den Zellen freigesetzten Proteine gefällt. Die an der Zellwand befestigte chromosomale DNA der Bakterien wird co-präzipitiert, wogegen die Plasmid-DNA im Überstand bleibt.

Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol versetzt und gründlich durchmischt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (10 Min., 20800xg, 4°C), mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde im Vakuum getrocknet und schließlich in 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

#### **2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kits**

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Salzgehalt der isolierten DNA gering gehalten wird. Dies ist für die Restriktion mit salzsensitiven Endonukleasen, wie z.B. *NdeI* von Bedeutung, und spielt auch bei der *in vitro* Translation (2.2.3.22) eine Rolle.

Nach Aufschluss der Zellen aus 2-5 ml einer Übernacht Kultur mittels alkalischer Lyse (2.2.2.1) und Fällung der freigesetzten Proteine, wird die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Membran gebunden. Endonukleasen und Salze werden durch Waschen entfernt, die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

#### **2.2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAfilter™ Plasmid Midi Kits**

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu isolieren, wurde das QIAfilter™ Plasmid Midi Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Als Ausgangsmaterial dienten 25-30 ml einer dicht bewachsenen Übernachtskultur in entsprechendem Selektivmedium. Nach Aufschluss der Zellen mittels alkalischer Lyse wird die im Überstand befindliche Plasmid-DNA unter geeigneten pH- und Niedrigsalzbedingungen an eine Anionenaustauschermatrix gebunden. RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen mit Puffern mittlerer Ionenstärke entfernt. Die DNA wird unter Hochsalzbedingungen eluiert, durch Isopropanolfällung konzentriert und schließlich durch Waschen des Sediments mit 70% EtOH entsalzt. Die isolierte DNA wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

### **2.2.2.2 DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae***

#### **2.2.2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae***

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe wurden Zellen aus 1,5 ml frischer Übernachtskultur verwendet, bzw. eine äquivalente Menge Zellen von einer frischen Platte in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert. Die Zellen wurden sedimentiert (3 Min., 1000xg, RT), in 200 µl Protoplastenpuffer (0,1% [v/v] β-Mercaptoethanol, 0,2 mg/ml Zymolyase 20T in P1, vgl. 2.2.2.1) resuspendiert und für 1-2 Std. unter sanftem Schütteln bei 37°C inkubiert. Dabei werden die Zellen spheroplastiert, da die Zymolyase durch ihre β-1,3-Glucan-Laminaripentaohydrolase-Aktivität die Zellwand der Hefen zerstört.

Zur Lyse wurden 200 µl P2 (vgl. 2.2.2.1) zugegeben und die Proben 20 Min. bei 65°C inkubiert. Nach raschem Abkühlen der Proben auf Eis, Zugabe von 200 µl P3 (vgl. 2.2.2.1) und sanftem Mischen, bei dem ein Scheren der DNA vermieden werden sollte, wurde weitere 15 Min. auf Eis inkubiert. Präzipitieres Kaliumdodecylsulfat und Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (3 Min., 16100xg, RT), der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die

DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und 5-minütige Inkubation bei RT gefällt. Die hochmolekulare chromosomale DNA wurde in einem kurzen Zentrifugationsschritt (0,5 Min., 16100xg, RT) sedimentiert, mit 1 ml 70% EtOH 10 Min. bei RT inkubiert, erneut sedimentiert (0,5 Min., 16100xg, RT), im Vakuum getrocknet und vorsichtig in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert.

#### **2.2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Hefezellen von einer frischen Platte abgenommen und in 500 µl 0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA mit 0,2 mg/ml Zymolyase 20T resuspendiert, so dass sich eine Zelldichte von 2-5 OD<sub>600</sub> ergab. Die Suspension wurde eine Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz (10-20 Sek.) sedimentiert, in 500 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM EDTA resuspendiert und 50 µl 10% SDS zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 65°C wurde die Lösung mit 200 µl 3 M Kaliumacetat, pH 5,5, versetzt, kurz gemischt und für weitere 30 Min. auf Eis inkubiert. Das Kaliumdodecyl-Präzipitat wurde für 5 Min. bei 16100xg sedimentiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 700 µl Isopropanol 5 Min. bei RT gefällt. Die DNA wurde 10 Min. bei 16100xg und RT sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Sediment zum Waschen 10 Min. bei RT mit 500 µl 70% EtOH inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min., 16100xg, RT) wurde der Überstand entfernt und die DNA 5 Min. bei 37°C getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Da aus den Hefen nur geringe Plasmidmengen isoliert werden, wurde 1 µl der DNA durch Elektroporation (2.2.1.2.2) in *E. coli* Zellen eingebracht, amplifiziert und die Plasmid-DNA wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben isoliert.

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

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit RNA, aber auch Salzen und Zuckern an. Die Messungen erfolgten in einem GeneQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia). Üblicherweise wurde die DNA zur Messung 1:100 in Wasser verdünnt (1 µl DNA + 99 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>).

#### 2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) dient der selektiven Amplifikation definierter DNA-Bereiche. Nötig sind hierfür zwei Primer, von denen einer zum 5'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 3'-Bereichs komplementär ist. Das optimale Temperaturprofil der Reaktion hängt von der Matrize und besonders von den verwendeten Primern ab. Ebenso ist die Zeit für die Verlängerung des Primers zur Gegenstrangsynthese von der Größe des zu amplifizierenden Bereichs abhängig. Deshalb ist im Anschluß ein Protokoll wiedergegeben, das den Bedürfnissen der jeweiligen Reaktion angepaßt wurde.

Eine 100 µl Reaktion enthielt:

1 µM Primer 1  
1 µM Primer 2  
0,2 µg Plasmid-DNA (0,2-1µg genomische DNA)  
0,2 mM dNTPs  
10 µl 10x PCR Puffer  
0,2-5 U Polymerase  
ad 100 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Folgende Polymerasen wurden den Herstellerangaben entsprechend unter Verwendung des dafür optimierten PCR-Puffers eingesetzt:

- Taq-Polymerase, wurde zur Überprüfung der Integration von Epitop-Kassetten oder Gendeletionen eingesetzt. Diese thermostabile Polymerase zeichnet sich zwar durch eine hohe Prozessivität, das heißt eine lange Interaktionszeit mit der DNA-Matrize aus, ist jedoch sehr anfällig für Lesefehler.

- Turbo-Pfu, Vent- oder Herculase-Polymerase, dienen zur Genamplifikation für Klonierungen. Diese Polymerasen zeichnen sich durch hohe Prozessivität und das Vorhandensein einer sog. Proofreading-Aktivität aus, die Lesefehler während der Amplifikation erkennt und beseitigt.

Diese Polymerasen wurden, im Gegensatz zur Taq-Polymerase, erst nach der anfänglichen Denaturierung der DNA (siehe PCR-Programm) zugegeben. Dadurch wird verhindert, dass die im Ansatz enthaltenen Primer durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerasen abgebaut werden.

Programm der PCR-Maschine (Standardprogramm, s.u.):

1. Denaturierung	3 Min.	95°C
2. Denaturierung	50 Sek.	95°C
Primer Hybridisierung	50 Sek.	54°C
Elongation	2 Min.	72°C
3. Abschliessende Elongation	7 Min.	72°C
4. Abkühlung	unendlich	4°C

Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung ist von den gewählten Primern abhängig und liegt zwischen 50 und 55°C. Die Elongationszeit ist von der Prozessivität der verwendeten Polymerase abhängig. Diese beträgt zwischen 1 Min./kb (Taq-Polymerase, Herculase) und 3 Min./kb (Turbo-Pfu und Vent-Polymerase). Punkt 2 des Programms wurde in der Regel 30x wiederholt. Die PCR wurde mit Hilfe einer PCR-Maschine der Firma Biometra durchgeführt.

5 µl des PCR-Produkts wurden im Anschluss an die Reaktion per Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.7) überprüft.

#### 2.2.2.4.1 Kolonie-PCR an *E. coli*

Um die Präparation chromosomaler DNA aus *E. coli* zu umgehen, wurde der offene Leserahmen des *RL23*-Gens von *E. coli* per Kolonie-PCR amplifiziert. Dafür wurden 50 µl chemisch kompetente DH5α-Zellen kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert. 1 µl dieser Zellsuspension wurde für die PCR eingesetzt. Während der anfänglichen Denaturierung bei 95°C (3 Min., s.o.) wird die bereits permeabilisierte Zellwand der kompetenten Zellen durch das Erhitzen im Detergens-haltigen PCR-Puffer zerstört und die DNA freigesetzt. Die PCR erfolgte unter Standardbedingungen mit *RL23*-spezifischen Primern.

#### 2.2.2.5 DNA-Fällung

Um PCR-Produkte für weitere Anwendungen aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren, wurde der PCR-Ansatz mit 1 ml EtOH<sub>abs.</sub> versetzt und 30 Min. auf Trockeneis, bzw. über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 Min., 20800xg, 4°C) wurde das Sediment mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde getrocknet und je nach Menge in 40-60 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

## 2.2.2.6 Enzymatische Modifizierung von DNA

### 2.2.2.6.1 Restriktionsverdau

Für den sequenzspezifischen Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurden 5-10 U Enzym pro 10 µg DNA eingesetzt. Der dabei verwendete Puffer wurde nach Empfehlung des Herstellers gewählt. Für die Reaktion wurden DNA, Enzym(e) und Puffer gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf ein Endvolumen von 20 µl (für analytischen Verdau), bzw. 50 µl (für präparativen Verdau) eingestellt. Der Ansatz wurde für mindestens 30 Min. bei für die Enzymaktivität optimaler Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Durch Hydrolyse der DNA, an einer für das jeweilige Enzym spezifischen Erkennungssequenz, entstehen dabei, je nach Enzym, glatte oder überhängende DNA-Enden. Dabei trägt das freie 3'-Ende immer eine Hydroxylgruppe, wobei sich das 5'-Ende der DNA durch eine freie Phosphatgruppe auszeichnet.

### 2.2.2.6.2 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Besteht aufgrund der DNA-Sequenz des verwendeten Plasmids oder PCR-Produkts keine Möglichkeit durch Restriktionsverdau glatte DNA-Enden zu erzeugen, obwohl diese für eine erfolgreiche Klonierung benötigt werden, können durch die Verwendung eines anderen Enzyms entstandene überhängende Enden geglättet werden. Dabei können 3'-überhängende Enden in Abwesenheit freier Nukleotide von der 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase entfernt werden, zum anderen ermöglicht die 5'-3'-Polymerase-Aktivität desselben Enzyms das Auffüllen der Überhänge, wenn Desoxynukleotide zugegeben werden. Zur Entfernung 3'-überhängender Enden wurde dem Restriktionsansatz 1 U T4-DNA-Polymerase zugegeben und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Das Auffüllen 5'-überhängender Enden erfolgte unter gleichen Inkubationsbedingungen nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Polymerase und 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2 mM).

Alternativ wurden 5'-überhängende Enden mittels des Klenow-Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I unter Zugabe von Desoxynukleotiden aufgefüllt. Hierzu wurden dem Restriktionsansatz 5 U Klenow-Polymerase und 1 µl dNTP-Mix zugesetzt und 25 Min. bei RT inkubiert.

### 2.2.2.6.3 Dephosphorylierung von DNA

Wurden bei der Restriktion des Plasmidvektors Enzyme verwendet, die kompatible oder glatte Enden erzeugen, das heißt Enden, die bei der anschließenden Ligation den Ringschluss des Vektors auch ohne Insertion eines DNA-Fragments erlauben, wurde die 5'-Phosphatgruppe des Vektors mit alkalischer Phosphatase (CIP) entfernt. Die Re-Ligation der Vektor-DNA wird dadurch verhindert, außer es werden durch die Aufnahme eines DNA-Fragments wieder freie Phosphatgruppen zur Verfügung gestellt, und somit die Ausbeute an rekombinanten Plasmiden

erhöht. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde der Restriktionsansatz (nach evtl. notwendiger Modifikation, s.o.) mit 10 U CIP versetzt und 30 Min. bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese**

In einem Agarosegel werden Nukleinsäuren im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,8% oder 1% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C in einen mit einem Kamm versehenen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erhärtung des Gels wurde es in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer gemischt. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen der zu analysierenden DNA wurde auf demselben Gel ein entsprechender Standard (siehe 2.1.6) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-12 V/cm). Zur Anfärbung der DNA wurde das Gel nach dem Lauf für 5-15 Min. in ein Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml in TAE) eingelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen G-C-Basenpaare der DNA-Doppelhelix. Im Komplex mit DNA, emittiert Ethidiumbromid, nach Anregung mit UV, bei einer Wellenlänge von 590 nm im orangefarbenen Bereich des sichtbaren Lichts. Die DNA-Banden konnten daher im UV-Durchlicht (254 nm) detektiert und mit Hilfe einer CCD-Kamera photographisch dokumentiert werden.

#### **2.2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde zunächst auf einem Leuchttisch kurz belichtet (320 nm), um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Dabei ist es wichtig, die Belichtungszeit so kurz wie möglich zu halten, um eine Beschädigung der DNA durch das UV-Licht zu vermeiden. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und einzeln in Reaktionsgefäße überführt. In diesem Fall wurde das Gel, zur Schonung der DNA (s.o), erst nach dem Ausschneiden der Banden für die Dokumentation im starken UV-Durchlicht (254 nm) photographiert.

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Jet Sorb Gel Extraction Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip dieses Kits besteht darin, die DNA, nach Auflösung der Agarose bei 65°C, unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) von der Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde wie im Handbuch des

Herstellers beschrieben durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 70 bp bis 10 kb mit einer Ausbeute von etwa 80% aus Agarosegelen isoliert werden.

### **2.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

T4-DNA-Ligase katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden der Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment, die zuvor entsprechend durch Restriktionsverdau manipuliert wurden, im Verhältnis 1:7 eingesetzt und mit Ligationspuffer, 1 mM ATP und 1,2 U T4-DNA-Ligase in einem 10 µl Ansatz vermischt. Um die Religationsfrequenz des linearisierten Vektors zu bestimmen, wurde einem Kontrollansatz statt des DNA-Fragments eine entsprechende Menge 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 zugegeben. Zur Ligation glatter Enden wurde über Nacht bei 4°C, zur Ligation überhängender Enden 4 Std. bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden 5 µl jedes Ligationsansatzes durch Transformation (2.2.1.2) in *E. coli* Zellen eingebracht.

### **2.2.2.10 Ligation von PCR-Produkten mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)**

Das TOPO TA Cloning Kit erlaubt die schnelle und einfache Verknüpfung von PCR-Produkten mit dem darin enthaltenen, linearisierten pCR-TOPO2.1 Vektor ohne vorherigen Restriktionsverdau. Dies kann einerseits dazu dienen, für Klonierungen benötigte Restriktionsschnittstellen, die im PCR-Produkt nicht vorhanden sind, über den im Vektor enthaltenen Polylinker an das PCR-Produkt anzufügen. Andererseits kann ein einmal amplifiziertes PCR-Produkt in diesem Vektor "aufbewahrt" werden. Dadurch steht das entsprechende DNA-Fragment ohne erneute PCR jederzeit für weitere Klonierungen zur Verfügung.

An die 5'-Phosphatgruppen des im Kit enthaltenen linearisierten Vektors ist kovalent das Enzym Topoisomerase (aus Vaccinia-Virus) gebunden. Dieses katalysiert normalerweise die Entspiralisierung von DNA während der Transkription. In diesem Fall katalysiert es die Insertion 3'-adenylierter DNA in den Vektor. Die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen Vektor und Topoisomerase wird durch die freie 3'-Hydroxylgruppe des PCR-Produkts angegriffen. Dadurch kommt es zur Lösung dieser Bindung, die DNA-Enden werden verknüpft und die Topoisomerase freigesetzt.

Zur Adenylierung wurden 7,5 µl PCR-Ansatz (nach erfolgter Amplifikation mit einer Proofreading-Polymerase) mit 3 mM ATP, 1x Taq-Polymerase-Puffer und 0,5 U Taq-Polymerase versetzt und 15 Min. bei 72°C in der PCR-Maschine inkubiert. Dabei hängt die terminale



Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase unabhängig von der DNA-Sequenz ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts an. 1 µl dieses Ansatzes wurde mit 0,5 µl Vektor, 0,5 µl im Kit enthaltener Salzlösung und 0,5 µl sterilem Wasser vermischt und 5 Min. bei RT inkubiert. Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit dem gesamten Ansatz transformiert. Die erfolgreiche Insertion des PCR-Produkts zerstört das im Vektor codierte LacZ $\alpha$ -Genfragment, sodass die Identifikation positiver Transformanten durch blau/weiß-Selektion auf X-Gal-haltigen Selektionsplatten erleichtert wird.

Das LacZ $\alpha$ -Genfragment codiert 30 N-terminale Aminosäuren des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Im Genom der zur Transformation verwendeten *E. coli*-Zellen ist dieser Bereich deletiert, sodass die Zellen eine inaktive Form des Enzyms produzieren. Wird bei der Ligation keine Fremd-DNA inseriert, bleibt das LacZ $\alpha$ -Genfragment im Vektor intakt. Durch Komplementation auf Proteinebene ergänzen sich beide Genprodukte zum funktionellen Enzym. Dieses wandelt das sonst farblose X-Gal in ein Indoxylderivat um, das vom Luftsauerstoff zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo oxidiert wird. Kolonien, die religierten Vektor aufgenommen haben erscheinen also blau, während weiße Kolonien auf eine erfolgreiche Ligation von Vektor und DNA-Fragment schliessen lassen.

#### **2.2.2.11 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma Medigenomix (Martinsried). Es wurden dafür pro Reaktion 700 ng DNA und 10 pmol Oligonukleotid-Primer benötigt.

Die von Medigenomix verwendete Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) beruht auf der Amplifikation der zu sequenzierenden DNA unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden und DNA-Polymerase. Jedes der vier verwendeten Didesoxynukleotide ist mit einer spezifischen, andersfarbigen Fluoreszenzmarkierung versehen. Wird ein solches Nukleotid bei der Verlängerung der DNA-Kette angehängt, so kommt es an dieser Stelle zum Kettenabbruch, da das markierte Didesoxynukleotid keine freie Hydroxylgruppe für die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Nukleotid zur Verfügung stellen kann. Im Reaktionsgemisch sind diese veränderten Nukleotide, neben normalen Desoxynukleotiden, die zur Kettenverlängerung benötigt werden, in solchen Mengen vorhanden, dass statistisch an jeder Stelle der DNA-Matrize ein Kettenabbruch erfolgt. Auf diese Weise werden DNA-Ketten erzeugt, die sich in ihrer Länge genau um eine Base unterscheiden. Diese werden elektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweils letzte Base jedes Fragments enthält dabei die Fluoreszenzmarkierung, sodass die Sequenz des DNA-Moleküls anhand der Farbreihenfolge

abgelesen werden kann. Zur Auswertung der Sequenzierdaten wurde das Programm Chromas (Technelysium Pty Ltd) verwendet. Der Abgleich mit bekannten Sequenzen erfolgte meist über BLAST (NCBI).

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus *S. cerevisiae*

#### 2.2.3.1.1 Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

50 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur ( $OD_{600}$  0,5 bis 0,8) wurden bei 2400xg für 3 Min. abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit kaltem PBS oder einem geeigneten Lysispuffer gewaschen. Für die nächsten Schritte wurden die Zellen auf Eis gehalten, um Proteaseaktivitäten möglichst gering zu halten. Zusätzlich wurde der Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren (ALATI: 1:400, PC: 1:1000, 0,5 mg/ml Pefabloc, 5 mM Benzamidin, 1 Tablette Complete (Roche) pro 50 ml Puffer) versetzt. Das Zellsediment wurde in 500  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert, ca. 300  $\mu$ l Glasperlen zugegeben und die Suspension, in Intervallen mit Pausen von je 30 Sek. auf Eis, 8x für 30 Sek. mit Hilfe eines Vortex-Geräts mit höchster Geschwindigkeit durchmischt. Dabei wurden die Zellen zwischen den Glasperlen zerrieben und aufgeschlossen. Die Effizienz des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch überprüft. Das Lysat wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, die Glasperlen 2x mit 250  $\mu$ l Lysispuffer gewaschen und die Waschschrte mit dem Lysat vereinigt. Anschließend wurde das Lysat durch eine kurze Zentrifugation (3 Min., 1000xg, 4°C) von Zelltrümmern und unaufgeschlossenen Zellen separiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Trennung löslicher und unlöslicher Proteine erneut zentrifugiert (15 Min., 20800xg, 4°C). Nach Proteinbestimmung (2.2.3.9) wurden für die SDS-Gelelektrophorese Proben der löslichen und unlöslichen Fraktion entnommen, mit Laemmli-Auftragspuffer auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l gebracht und für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Davon wurden 10-15  $\mu$ l pro Gelspur verwendet. Der restliche Proteinextrakt wurde für z.B. Immunpräzipitationen (2.2.3.8) weiterverwendet, oder bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.3.1.2 TCA-Extraktion von Proteinen (denaturierende Proteinpräparation für Westernblotting)

Eine Zellmenge, die 3  $OD_{600}$  entspricht (aus einer Übernachtskultur oder von einer frischen Agarplatte), wurde in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und zur Lyse mit 150  $\mu$ l 1,85 M NaOH, 7,5% [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die freigesetzten Proteine durch Zugabe von 150  $\mu$ l 55% TCA für 10 Min. auf Eis gefällt. Nach

Zentrifugation (15 Min., 20800xg, 4°C) wurde der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 200 µl HU-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden 5 Min. bei 65°C erhitzt, kurz zentrifugiert (5 Min., 16100xg, RT) und 10-15 µl davon mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

### **2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)**

Angewendet wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Proteine werden dabei unter denaturierenden Bedingungen ihrer Masse nach aufgetrennt. Das diskontinuierliche Gelsystem (bestehend aus Trenn- und Sammelgel, pH 8,8, bzw. 6,8) bewirkt durch die Konzentrierung der Proben im Sammelgel eine höhere Trennschärfe und bessere Auflösung gegenüber kontinuierlichen Elektrophoresesystemen.

Durch die Denaturierung mit SDS bilden sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Masse/Ladungs-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein). Quartär- und Tertiär-Strukturen werden, v.a. nach vorheriger Reduktion von Disulfidbrücken durch DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, zerstört. Damit wird die Eigenladung der Proteine neutralisiert und sie liegen als einzelne Polypeptide vor, die eine mehr oder weniger einheitliche Form annehmen. Bei der Elektrophorese wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der Gelmatrix entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Sammelgel, in dem die Probe konzentriert wird, ist so großporig, dass ein Siebeffekt nicht zum Tragen kommt. Die Konzentrierung der Probe beruht darauf, dass der pH-Wert des Sammelgels mit pH 6,8 sehr nah am isoelektrischen Punkt des Glycins liegt, das als Ladungsträger im Laufpuffer enthalten ist. Beim Eintritt in das Sammelgel wird aus Glycinat (negativ geladen) Glycin gebildet. Das Glycin, das als ladungsneutrales Zwitterion vorliegt, hat eine niedrige elektrophoretische Mobilität (Folge-Ion), die Chlorid-Ionen, die im Gelpuffer enthalten sind, haben dagegen eine hohe elektrophoretische Mobilität (Leit-Ion). Da die Glycin-Zwitterionen im elektrischen Feld nicht wandern, entsteht ein Mangel an beweglichen Ionen, der zu einer Herabsetzung des Stromflusses führt. Da der Strom jedoch im gesamten System konstant sein muss, erhöht sich die Spannung zwischen Glycin und Chlorid-Ionen. Im Bereich der Chlorid-Ionen stellt sich dadurch eine niedrige, im Bereich der Glycin-Ionen eine sehr hohe Feldstärke ein. Es kommt zur Ausbildung eines Feldstärkegradienten, in dem Proteine hoher Mobilität dem Leit-Ion folgen, Proteine niedriger Mobilität dagegen vor dem Folge-Ion hergeschoben werden. Wandert ein Protein in die Zone hoher Mobilität, nimmt die Feldstärke ab und es fällt zurück. Wandert ein Protein zu langsam, wird es durch die hohe Feldstärke beschleunigt. Es kommt so zur Fokussierung der Proteine im Sammelgel. Erreicht das Glycin das

Trenngel (pH 8,8), geht es wieder in den geladenen Glycinat-Zustand über, die Mobilität erhöht sich und es überholt die Proteinfrent. Der Mangel an beweglichen Ionen wird dadurch aufgehoben und eine konstante Feldstärke entsteht. Die Proteine werden nun im engporigen Trenngel dem Siebeffekt ausgesetzt und damit ihrer Größe nach aufgetrennt.

Es wurden, je nach experimentellen Anforderungen, 7,5%, 10%, 12% und 15% Trenngele (Minigel, 6x 9x 0,8 mm, BioRad) mit 4% Sammelgelen verwendet. Gewöhnlich wurden Gele mit 10 bzw. 15 Auftragstaschen verwendet. Zur Titerbestimmung polyklonaler Antiseren (2.2.5.1.2) oder für präparative Elektrophoresen (2.2.3.6) wurden Gele verwendet, die neben einer kleinen Tasche für den Größenstandard (Vol. ca. 20 µl) ein bis zwei große Taschen (für Probenvolumina von 1 bzw. 2 ml) aufwiesen. Die Auftrennung erfolgte in einer MiniProtean-Apparatur (Biorad) bei 30 mA pro Gel für ca. 40 Min.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Tris-Glycin SDS-Polyacrylamidgele**

	Sammelgel	Trenngel			
	4%	7,5%	10%	12%	15%
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	330 µl	1,25 ml	1,67 ml	2,0 ml	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	625 µl	-	-	-	-
10% SDS	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10% APS	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 2,5 ml	ad 5 ml	ad 5 ml	ad 5 ml	ad 5 ml

#### 2.2.3.2.1 Tris-Tricin SDS-Gelelektrophorese

Das Tris-Tricin System (Schagger et al., 1988) ist eine Abwandlung des oben beschriebenen Tris-Glycin Systems, das speziell entwickelt wurde, um Proteine und Peptide niedrigen Molekulargewichts (< 10 kDa) aufzutrennen. Dabei macht man sich die höhere Mobilität von Tricin als Leitton zu Nutze. Durch die Elektrophorese bildet sich hinter dem Leitton eine Zone, in der sich freies SDS in Form von Micellen sammelt. Im Tris-Glycin System werden kleine Moleküle darin gefangen und daher kaum aufgetrennt. Durch die höhere Mobilität von Tricin, läuft diese SDS-Front schneller, das heißt vor den kleinen Proteinen her, wodurch diese schneller und sauberer aufgetrennt werden. Da die Mobilität von Tricin pH-unabhängig ist, unterscheiden sich Trenn- und Sammelgelpuffer in diesem System nicht voneinander. Zur sauberen Auftrennung der Untereinheiten des Gim-Komplexes wurden 15% Tricingele verwendet.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Tris-Tricin SDS-Polyacrylamidgele**

	Sammelgel	Trenngel
	4%	15%
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	330 µl	2,5 ml
Gelpuffer	625 µl	1,25 ml
98,9% Glycerin	-	380 µl
10% APS	12,5 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 2,5 ml	ad 5 ml

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Überschichtungspuffer abgedeckt. Nach der Polymerisation wurde der Puffer entfernt, Reste mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> weggespült und das Trenngel mit einem weitmaschigeren Sammelgel überschichtet. Die Auftrennung erfolgte in einer MiniProtean-Apparatur (BioRad) bei zunächst 15 mA pro Gel. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 22,5 mA pro Gel erhöht.

### 2.2.3.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Westernblot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry-Elektro-Blots in einem dreistufigen Puffersystem auf Nitrozellulose-Membran (Protran, Schleicher & Schuell) transferiert.

Dabei wurde folgender Aufbau verwendet:

**Kathode -**  
 6 Whatman-Papiere getränkt in Kathodenpuffer  
 Polyacrylamidgel  
 Membran (benetzt mit Anodenpuffer 2)  
 3 Whatman-Papier getränkt in Anodenpuffer 2  
 3 Whatman-Papiere getränkt in Anodenpuffer 1  
**Anode +**

Durch die angelegte Spannung (50 mA pro Gel, 1 bzw. 1,5 Std. für TCA-Extrakte) wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert.

#### 2.2.3.3.1 PonceauS-Färbung von Membranen

Die Effizienz des Transfers kann durch PonceauS-Färbung der Nitrozellulose-Membran überprüft werden. Dazu wurde die Membran kurz in PonceauS-Lösung inkubiert und einige Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> entfärbt, bis sich Banden abzeichnen. Die Proteinbanden des Größenstandards wurden mit Kugelschreiber, bzw. HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper markiert, die PonceauS gefärbte Membran zur Dokumentation der geladenen Proteinmengen photokopiert oder mittels CCD-Kamera photographiert.

### 2.2.3.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran mit 1x TBS völlig entfärbt und anschließend für mindestens 45 Min. (bzw. über Nacht) in Blockierlösung (TBS-T, 5% Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurde die Membran, je nach Qualität des primären Antikörpers für mindestens 1 Std. mit einer entsprechenden Verdünnung des Antikörpers in TBS-T inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBS-T (je 5-10 Min.) erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper. Für die Detektion monoklonaler Antikörper der Maus wurde als Sekundär-Antikörper ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter anti-Maus-Antikörper (aus dem Schaf, 1:10000, 1 Std.) verwendet, für polyklonale Antiseren des Kaninchens wurde ein HRP-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (aus der Ziege, 1:10000, 1 Std.) verwendet.

Die Membran wurde dreimal für 5-10 Min. mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia). Chemilumineszenz beruht auf der Anregung von Elektronen bestimmter Moleküle, in diesem Fall der Substanz Luminol, durch eine enzymatische Reaktion. Kehren die Elektronen in ihren Grundzustand zurück, geben sie Energie ab, die im Spektrum sichtbaren Lichts liegt. Hier katalysiert das Enzym Meerrettichperoxidase unter basischen Pufferbedingungen die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Das dabei emittierte Licht der Wellenlänge 428 nm wurde durch Schwärzung eines Röntgenfilms (Amersham Pharmacia, Filmentwicklung: X-Omat, Kodak), oder per LAS3000-System (Raytest) unter Verwendung einer CCD-Kamera detektiert.

### 2.2.3.4 *Stripping* von Westernblots

Zum Ablösen der, an die Proteine auf der Westernblot-Membran, gebundenen Primär- und Sekundärantikörper (= *stripping*) wurde die Membran nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T in *Stripping*-Lösung (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) eingelegt und für 30 Min. unter Schütteln im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Anschliessend wurde die Membran 6x für 5 Min. mit TBS gewaschen und für mind. 45 Min., bzw. über Nacht in Blockierlösung eingelegt. Danach konnte erneut mit Antikörpern dekoriert werden.

### 2.2.3.5 Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen durch Färbung

Die im Folgenden dargestellten Techniken wurden je nach experimenteller Anforderung alternativ verwendet. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch die Detektionsempfindlichkeit. Während Proteine durch Coomassie und Fairbanks direkt gefärbt werden, ist die Färbung mit Kupferchlorid eine Negativfärbung, bei der der proteinfreie Hintergrund angefärbt wird.

#### 2.2.3.5.1 Coomassie-Färbung

Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter Elektrophorese für ca. 5-20 Min. in der Färbelösung (0,25% Serva Blue R250, 50% Methanol, 7% Essigsäure in  $H_2O_{\text{bidest.}}$ ) inkubiert. Durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure, werden die Proteine im Gel fixiert, das durch den Farbstoff zunächst komplett angefärbt wird. Durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung (50% Methanol, 7% Essigsäure) wird der Farbstoff selektiv aus den proteinfreien Bereichen des Gels entfernt, proteinhaltige Bereiche werden als definierte, durch die Bindung des Farbstoffs blaugefärbte Banden sichtbar. Die Detektionsgrenze für Coomassie-gefärbte Proteine liegt bei 50-100 ng.

#### 2.2.3.5.2 Färbung nach Fairbanks

Eine ca. 20-40-fach empfindlichere Art Proteine mit Coomassie Blau anzufärben, stellt die Methode nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971) dar. Dabei werden die Gele zunächst gefärbt und dann schrittweise, in Lösungen mit abnehmender Coomassie-Konzentration, entfärbt. Die Detektionsgrenze liegt bei 2,5-5 ng. Hier wurde eine optimierte, schnellere Variante (Wong et al, 2000) dieser Methode verwendet. Dafür wird das Gel zunächst in FairbanksA (0,05% Serva Blue R250, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure) eingelegt und im Abzug bis zum Erreichen des Siedepunkts für ca. 2 Min. erhitzt. Die Lösung wird unter Schütteln für 5 Min. auf RT abgekühlt und schliesslich verworfen. Nach Spülen mit  $H_2O_{\text{bidest.}}$  wird das Gel in FairbanksB (0,005% Serva Blue R250, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure) eingelegt und erneut erhitzt. Die warme Färbelösung wird verworfen, das Gel kurz mit  $H_2O_{\text{bidest.}}$  gespült und mit FairbanksC (0,002% Serva Blue R250, 10% Essigsäure) erhitzt. Nach erneutem Spülen des Gels mit Wasser wird das Gel in FairbanksD Entfärberlösung (10% Essigsäure) erhitzt und anschliessend unter Schütteln in dieser Lösung auf RT abgekühlt. Überschüssiger Farbstoff wird dabei durch einen beigelegten Schwamm adsorbiert. Durch erneute Inkubation in Entfärberlösung für mind. 15 Min. wurde der Gelhintergrund vollständig entfärbt, womit eine Detektion von 2,5 ng Protein erreicht werden kann.

### 2.2.3.5.3 Kupferchlorid-Färbung (Lee et al., 1987)

Zur Detektion von Proteinen in präparativen Gelen wurde Kupferchlorid verwendet. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden, ist diese Färbung reversibel. Sie beruht auf einer Reaktion des Gelpuffers mit den Kupferionen der Färbelösung. Dabei wird ein  $\text{Cu}_2^+$ -Tris-SDS-Komplex gebildet, der die Gelmatrix milchig trüb erscheinen läßt. Bereiche des Gels, die Proteine enthalten, werden nicht gefärbt, da das Kupfer an das Rückgrat der Proteine gebunden und damit die Komplexbildung verhindert wird. Zur Vorbereitung wurde das Gel zunächst gut gewässert, um Reste von SDS und Laufpuffer zu entfernen. Danach wurde das Gel in 0,3 M  $\text{CuCl}_2$  (in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ) eingelegt und so lange darin inkubiert, bis sich die Proteinbanden deutlich als durchsichtige Banden vom milchig hellblau gefärbten Hintergrund absetzten. Die entsprechende Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und, wie in Punkt 2.2.3.6 beschrieben, zur Elektroelution eingesetzt.

### 2.2.3.6 Präparative Protein-Isolierung aus SDS-Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an die Kupferchloridfärbung wurde der Gelstreifen durch 3-maliges Waschen mit 0,25 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,25 mM EDTA von Kupferionen befreit. Der Gelstreifen wurde in ein passendes Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Soak-Puffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,5% SDS, 4 M Harnstoff) für ca. 30 Min. bei RT äquilibriert. Der im Puffer enthaltene Harnstoff verhindert die Aggregation unlöslicher Proteine bei der Elektroelution. Der Gelstreifen wurde zusammen mit dem Soak-Puffer luftblasenfrei in einen gewässerten Dialyseschlauch überführt. Dabei ist zu beachten, dass das Ausschlussvolumen des Dialyseschlauchs entsprechend der Größe des zu isolierenden Proteins gewählt ist. Zur Elektroelution wurde der verschlossene Dialyseschlauch in eine puffergefüllte (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 4 M Harnstoff) Elektrophoresekammer überführt. Die Elution erfolgte für 2-3 Std. bei 60 mA. Ähnlich wie bei der SDS-Gelelektrophorese wandern die durch das gebundene SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode. Dabei verlassen sie das Gel, werden jedoch im Gegensatz zu Salzen und kleineren Molekülen, aufgrund ihrer Größe im Dialyseschlauch zurückgehalten. Nach erfolgter Elution wurde der Schlauch vorsichtig geöffnet und die Proteinlösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die isolierten Proteine wurden bei 4°C gelagert.



### **2.2.3.7 Trocknen von Proteingelen**

Normale Proteingele wurden zur Dokumentation mit einer Lösung aus 40% Methanol und 5% Glycerin benetzt, zwischen zwei gewässerte Cellophan-Folien gespannt und für 2 Std. in einem Gelrockner der Firma Biorad (GelAir Drying System) getrocknet.

Zur Analyse radioaktiver Proben wurden die entfärbten, gewässerten Gele auf Whatmanpapier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und in einer Slab Geldryer-Apparatur (Savant) für 2 Std. bei 60°C unter Vakuum getrocknet.

### **2.2.3.8 Immunpräzipitation von Gesamtzellextrakten**

Gesamtzellextrakte wurden, wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben, hergestellt. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 1-2 mg der löslichen Fraktion eingesetzt. In der Regel wurden 15-25 µl Bettvolumen ProteinA-Sepharose-gekoppelte Antikörper (2.2.3.15) zugesetzt und mind. 1,5 Std. bei 4°C (Taumeltisch) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt und das Zellysate durch Zentrifugation entfernt (2 Min., 1000xg, 4°C). Die Sepharose wurde 4x mit 500 µl Lysis-Puffer gewaschen (2 Min., 1000xg, 4°C) und schliesslich mit 1-3 Bettvolumen Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Gebundene Proteine wurden durch 5-minütiges Erhitzen der Proben bei 95°C von der Matrix gelöst. Je 10 µg Gesamtprotein des Zellextrakts vor IP und des Überstandes nach IP sowie 5-10 µl der eluierten Proteine wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Westernblot (2.2.3.3) analysiert.

### **2.2.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinkonzentrationen von Zellextrakten wurden mittels BioRad-Reagenz (1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) bestimmt. Dieses System beruht auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Das im Reagenz enthaltene Coomassie Brilliant Blau bindet in saurem Milieu an basische und aromatische Aminosäurereste der Proteine. Dadurch wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 465 nm zu 595 nm. Die Proteinkonzentration errechnet sich aus der bei 595 nm gemessenen Absorption durch Multiplikation mit einem Umrechnungsfaktor, der mittels einer BSA-Eichkurve (0,25-2 µg/µl BSA) bestimmt wurde.

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde photometrisch bei 280 nm nach Denaturierung in 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) bestimmt.

Die molare Konzentration errechnet sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \Delta E / \epsilon_{\text{mol}} \times d$$

wobei  $\Delta E$  die im Photometer gemessene Extinktion,  $\epsilon_{\text{mol}}$  der molare Extinktionskoeffizient in  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ,  $c$  die Konzentration in mol/l und  $d$  die Schichtdicke der Küvette in cm ist.

### 2.2.3.10 Reinigung rekombinanter 6His-Fusionsproteine aus *E. coli*

Für die Überproduktion rekombinanter Proteine unter Kontrolle des T7-Promotors wurde, soweit nicht anders angegeben, der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Dieser Stamm ist lysogen für den DE3-Phagen, der die T7-Polymerase unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors codiert. Das in den Zellen enthaltene pLysS-Plasmid exprimiert konstitutiv geringe Mengen des T7-Lysozyms, eines natürlichen Inhibitors der T7-Polymerase. Die Anwesenheit dieses Inhibitors verhindert die Expression des Zielgens in nichtinduzierten Zellen. Die Zellen sind daher hervorragend dafür geeignet, potentiell zytotoxische Proteine zu exprimieren. Nach Induktion mit IPTG wird soviel T7-Polymerase produziert, dass die Menge an T7-Lysozym austitriert und damit zu niedrig wird, um die Transkription zu unterdrücken. Es kommt zur Expression des Zielgens unter der Kontrolle des T7-Promotors.

#### 2.2.3.10.1 Induktion und Ernte von *E. coli* BL21(DE3)

Für die Anzucht wurde zunächst eine, aus einer Einzelkolonie gezogene, Übernachtskultur 1:50 in entsprechendes Medium verdünnt. Die Induktion mit 0,5-1 mM IPTG (Endkonzentration) erfolgte nach Erreichen einer Zelldichte von 0,5-0,8 OD<sub>600</sub>/ml. Vor Induktion und nach 2, 4 und 6 Std. wurden Proben entnommen, die Zelldichte bestimmt, äquivalente Zellmengen in Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) wurde die Expression im Vergleich mit Proben einer parallel behandelten Kultur, die mit leerem Vektor transformiert wurde, überprüft und die optimale Induktionsdauer ermittelt. Die Zellen wurden per Zentrifugation (10 Min., 4000xg, 4°C) geerntet, das Zellpellet zunächst in 1/50 des Kulturvolumens PBS/Pefabloc resuspendiert, über Trockeneis eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.3.10.2 Lyse

Kleine Volumina wurden durch wiederholtes Frieren und Auftauen der Zellsuspension lysiert. Diese Methode funktioniert bei BL21(DE3)pLysS optimal, da das in den Zellen enthaltene Lysozym die Zellyse unterstützt. Durch das Einfrieren bilden sich in der Zelle Eiskristalle, die die Plasmamembran beschädigen. Dadurch gelangt Lysozym in den periplasmatischen Raum,

wo das Enzym die  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung des Peptidoglykans der Zellwand spaltet. Die fortschreitende Lyse kann durch zunehmende Viskosität der Lösung beobachtet werden. Diese ergibt sich durch die aus den Zellen austretende chromosomale DNA. In der Regel genügen drei Zyklen aus Auftauen und Frieren, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Danach wurde das Lysat 15-30 Min. bei 4°C mit 100  $\mu$ g/ml DNaseI, 2 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1% Triton-X-100 auf einem Taumeltisch inkubiert, um die chromosomale DNA zu zerstören. Große Volumina wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Misonix Sonifier). Die Zellsuspension wurde ca. 10-mal für 30 Sek. mit Ultraschall einer Frequenz von 7 kHz beschallt. Zwischen den Intervallen wurde die Suspension 30 Sek. auf Eis gekühlt. DNaseI-Behandlung ist in diesem Fall nicht nötig, da die ausgetretene chromosomale DNA durch die Ultraschallbehandlung gesichert wird.

#### **2.2.3.10.3 Test auf Löslichkeit überproduzierter Proteine**

Für die Auswahl einer geeigneten Reinigungsstrategie ist die Löslichkeit des überproduzierten Proteins ausschlaggebend. Um diese zu ermitteln, wurde das Pellet einer 20 ml Testkultur nach Induktion in 1/20 Kulturvolumen PBS/Pefabloc resuspendiert und wie oben beschrieben aufgeschlossen. Nach Abtrennung von unlysierten Zellen und Zelltrümmern (10 Min., 1000xg, 4°C) wurde eine Probe des Proteinextrakts genommen und mit HU-Auftragspuffer versetzt. Der Extrakt wurde erneut zentrifugiert (15 Min., 20000xg, 4°C), um unlösliche Proteine zu pelletieren. Das Sediment wurde in 1/10 Lysatvolumen Puffer resuspendiert. Von Überstand und Pellet wurde eine Probe, die der des Gesamtzellextrakts entspricht genommen, mit HU-Auftragspuffer versetzt und die Löslichkeit des überproduzierten Proteins mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

#### **2.2.3.10.4 Reinigung von 6His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen**

Weitgehend unlösliche 6His-Fusionsproteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose gereinigt.

Dazu wurde meist schon das Zellpellet nach Induktion und Ernte (2.2.3.10.1) in Harnstoffpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) resuspendiert (5 ml/g Zellpellet) und mittels Sonifizierung (2.2.3.10.2) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation des Lysats (10 Min., 20000xg, RT) wurde dem Überstand 1 ml Ni-NTA-Agarose (50% in Harnstoffpuffer) zugegeben und zur Bindung 1 Std. bei RT inkubiert (Taumeltisch). Danach wurde die Suspension in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (BioRad) überführt, der Durchfluss gesammelt und eine Probe von Säulenmaterial und Durchfluss entnommen, um die Vollständigkeit der Bindung zu überprüfen. Die Matrix wurde mehrmals mit je 1 Säulenvolumen 8 M Harnstoffpuffer pH 8,0 gewaschen, um Reste des Zellysats zu entfernen. Dann wurde sequentiell 8 M Harnstoffpuffer

mit sinkenden pH-Werten (pH 7, pH 7,5, pH 6,3, pH 6,0, pH 5,9, pH 4,5) in Aliquots von je einem Säulenvolumen aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine eluierten erfahrungsgemäß bei pH-Werten zwischen 8,0 und 6,9, während spezifisch gebundene 6His-Fusionsproteine zwischen pH 5,9 und pH 4,5 von der Matrix gelöst wurden. Dies beruht auf der Ladung des 6His-Epitops bei verschiedenen pH-Werten. Der pKa-Wert des 6His-Epitops liegt bei 6,0. Wird der pH unter diesen Wert gesenkt, wird das Epitop protoniert. Unter diesen Bedingungen kann es nicht mehr an die Ni-Ionen der Matrix binden, das Fusionsprotein wird freigesetzt. Die Elution der Proteine wurde mit einem Farbttest verfolgt. Dazu wurden 100 µl BioRad-Reagenz mit 10 µl Eluat versetzt. Blaufärbung des Reagenz zeigt das Vorhandensein von Proteinen im Eluat an, die Intensität der Färbung gibt Aufschluss über die Proteinmenge. Jeder Puffer wurde so oft auf die Säule aufgetragen, bis im Farbttest keine Blaufärbung mehr nachzuweisen war. Zusätzlich wurden je 10 µl jeder Wasch- und Elutionsfraktion mit 10 µl HU-Probenpuffer versetzt und zusammen mit entsprechenden Proben des Durchflusses und des Säulenmaterials vor und nach Elution per SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert. Die gereinigten Proteine wurden bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.3.10.5 Isolierung von Proteinen aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)**

Die Überproduktion unlöslicher Proteine in *E. coli* resultiert oft in der Bildung von Proteineinschlusskörpern, oder *inclusion bodies*. Diese sind amorphe, unlösliche Proteinaggregate im Zytoplasma der Zellen. Sie bestehen meist zu über 90% aus dem überproduzierten Protein, und sind daher ein geeigneter Ausgangspunkt für dessen Isolierung unter denaturierenden Bedingungen. Oft lassen sich aus *inclusion bodies* gewonnene Proteine durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer in ihren nativen, funktionellen Zustand renaturieren. Zur Gewinnung der *inclusion bodies* wurde eine entsprechende, induzierte *E. coli*-Kultur geerntet, die Zellen lysiert und das Lysat durch Zentrifugation geklärt (vgl. 2.2.3.10.2). Durch einen abschliessenden Zentrifugationsschritt (15 Min., 20000xg, 4°C) wurden die *inclusion bodies* pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zunächst in 1/50 Kulturvolumen PBS/Pefabloc resuspendiert. Die Reinheit der Proteinpräparation wurde per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) überprüft. Die *inclusion body*-Suspension wurde in Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.3.10.6 Waschen von *inclusion bodies***

Stark verunreinigte *inclusion bodies* wurden vor der Weiterverwendung (z.B. der Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie) mit einer Mischung aus Harnstoff und Detergens gewaschen. Beide Chemikalien werden in solchen Mengen verwendet, dass nur die verunreinigenden Proteine solubilisiert werden, das Hauptprotein jedoch nicht in Lösung geht.

Das optimale Verhältnis von Harnstoff zu Triton-X-100 muss für jedes Protein individuell bestimmt werden. Der hier angegebene Puffer wurde für die Reinigung von Gim4p und Gim6p aus *inclusion bodies* optimiert.

Zum Waschen wurde die *inclusion body*-Suspension zentrifugiert (15 Min., 20000xg, 4°C) und das Pellet, mit Hilfe eines Potters, gründlich in 5 ml/g Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M Harnstoff, 0,5% Triton-X-100) resuspendiert. Die *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation pelletiert (15 Min., 20800xg, 4°C) und noch 2x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen (30 Min., 20800xg, 4°C) und schließlich im selben Puffer resuspendiert.

10 µl Probe jedes Pellets und jedes Zentrifugationsüberstandes wurden mit 10 µl HU-Probenpuffer versetzt und 10 µl davon per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

#### **2.2.3.10.7 Renaturierung gereinigter Proteine durch Dialyse**

In Harnstoffpuffer gereinigte Proteine wurden entweder einzeln oder, zur Rekonstitution von Komplexen, zu mehreren renaturiert. Zur Renaturierung einzelner Proteine wurde die Probe mit Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 300 mM NaCl, 8 M Harnstoff) auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt, für die Renaturierung von Komplexen wurden äquimolare Mengen jeder Untereinheit eingesetzt. Die Proteine wurden gemischt und in gewässerte Dialyseschläuche geeigneten Ausschlussvolumens (meist jedoch 3500 Da) eingefüllt. Dialysiert wurde zunächst über Nacht bei 4°C gegen 4 M Harnstoff in 20 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, pH 7,5. Danach wurde tagsüber (ca. 10 Std.) gegen HEPES-Puffer mit 2 M Harnstoff und abschliessend über Nacht gegen HEPES-Puffer ohne Harnstoff dialysiert. Bei jedem Pufferwechsel wurde die Proteinlösung durch Invertieren des Schlauches durchmischt. Nach der Dialyse wurden die Proben in geeignete Reaktionsgefäße umgefüllt, die Volumenzunahme gemessen und eine Probe für die Analyse per SDS-PAGE entnommen. Zur Entfernung eventuell ausgefallener Proteine wurden die Dialysate mittels Ultrazentrifugation (SW28, 1 Std., 70000xg, 4°C) geklärt. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße umgefüllt, eine Probe für die SDS-PAGE mit HU-Puffer versetzt. Das Pellet wurde in einem geeigneten Verhältnis zum Ausgangsvolumen, z.B. 1:20 in HU-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine wurde bestimmt und die Lösung gegebenenfalls konzentriert. Vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff, wurden die Proben mit Glycerin (Endkonzentration 10%) versetzt und aliquotiert. Die renaturierten Proteine wurden bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.3.10.8 Reinigung rekombinanter 6His-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen

Zur Reinigung rekombinanter 6His-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen wurde das Zellpellet in 25 ml/Liter Ausgangskultur Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 300 mM NaCl, Pefabloc) resuspendiert und durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (2.2.3.10.2) aufgeschlossen. Nach Klärung des DNaseI behandelten Lysats durch Zentrifugation (15 Min., 20000xg, 4°C) wurde das Lysat 1 Std. bei 4°C mit 1,2 ml 50% Ni-NTA-Agarose pro Liter Ausgangskultur inkubiert. Durch Zentrifugation (3 Min., 100xg, 4°C) wurde die Ni-NTA-Matrix sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Matrix im „batch“-Verfahren 2x 5 Min. bei 4°C mit Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) inkubiert (Zentrifugation siehe oben). Danach wurde die Suspension in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (BioRad) überführt, und solange mit je 1 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, bis im begleitenden BioRad-Farbttest (vgl. 2.2.3.10.4) keine Proteine mehr nachweisbar waren. Das gebundene 6His-Protein wurde in 1 ml Fraktionen (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) eluiert. Auch die Elution wurde per BioRad-Farbttest kontrolliert.

### 2.2.3.11 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Das Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* ist ein natürlicher Affinitätstag der spezifisch und reversibel mit Amylose interagiert. Dieser hat außerdem die Eigenschaft, die Löslichkeit der an ihn fusionierten Proteine, zu steigern. Viele Proteine, die in *E. coli* in Verbindung mit anderen Affinitätstags, wie z.B. 6His- oder GST, in unlöslicher Form produziert werden, können als MBP-Fusionen in löslicher Form aus den Zellen isoliert werden.

BL21(DE3)pLysS-Zellen, die MBP-Fusionsproteine exprimieren sollten, wurden bei 37°C in TY-Medium mit 0,2% Glukose zu einer Zelldichte von 0,5 OD<sub>600</sub> kultiviert. Der Glukosezusatz verhindert die Expression von Amylasen, die die Amylose-Affinitätsmatrix zerstören könnten. Die Expression des Zielproteins wurde mit 0,3 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach 4 Std. durch Zentrifugation (15 Min., 4000xg, 4°C) geerntet und 1:50 in Column loading Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit Pefabloc resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Frieren und Tauen (2.2.3.10.2). Zur Gewinnung der löslichen Fraktion wurde das Lysat durch 10-minütige Zentrifugation (4000xg, 4°C) geklärt, der Überstand 15 Min. bei 20000xg zentrifugiert. Die Amylose-Matrix wurde 2x mit Column loading Puffer gewaschen (5 Min., 500xg, 4°C). Pro ml Bettvolumen wurden 3,5 ml Zellextrakt zugegeben und 2 Std. bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Danach wurde die Matrix sedimentiert (5 Min., 500xg, 4°C) der Überstand weitgehend abgenommen und die Suspension in eine Poly-Prep Chromatographie-

säule (BioRad) umgefüllt. Die Matrix wurde so lange mit Column loading Puffer gewaschen, bis im BioRad-Farbstest (vgl. 2.2.3.10.4) kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Die Matrix wurde entweder in dieser Form für Präzipitationsversuche (2.2.3.16; 2.2.3.17) verwendet, oder das Fusionsprotein, z.B. für die CD-Spektroskopie, mit 10 mM Maltose (in Column loading Puffer) eluiert.

### **2.2.3.12 Reinigung des Gim-Komplexes aus *S. cerevisiae***

Zur Reinigung des Gim-Komplexes wurde zunächst ein Stamm verwendet, in dem die Gim2-Untereinheit chromosomal mit einem TEV-ProteinA-Epitop-tag fusioniert ist (KSY89). Dieser Epitop-tag enthält zusätzlich zum ProteinA-Teil, der die Bindung an IgG-Sepharose vermittelt, eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease (aus Tabak Mosaik Virus). Diese erlaubt das Entfernen des Epitop-tags nach der Reinigung.

#### **2.2.3.12.1 Aufschluss von Hefezellen im Großmaßstab**

100 g Zellpellets wurden in vier 50 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Die Reaktionsgefäße wurden mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5% Glycerin mit Proteaseinhibitoren) auf je 50 ml aufgefüllt und die Zellsuspension bei RT auf einem Taumelschüttler aufgetaut. Die Lyse erfolgte in einem EmulsiFlex Hochdruckhomogenisator der Firma Avestin. Das Gerät und das Auffanggefäß für das Zellysate wurden zunächst mit Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde in den Probenzylinder gefüllt und die Zellen unter Hochdruck (10000-15000 kPa) in 10-12 Durchläufen aufgeschlossen. Die Effizienz der Lyse wurde mikroskopisch überprüft und lag bei über 90%. Anschliessend wurde das Lysat mittels Zentrifugation (5 Min., 1000xg, 4°C) geklärt. Zur Gewinnung der löslichen Fraktion wurde das Lysat einer Ultrazentrifugation unterzogen (1 Std. 15 Min., 100000xg, 4°C), der Überstand in frische Reaktionsgefäße umgefüllt und zur Bindung an IgG-Sepharose (2.2.3.12.2) eingesetzt.

Das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens Lysispuffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde vom Überstand eine Probe mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl in Laemmli-Auftragspuffer hergestellt. Dem Sediment wurde eine äquivalente Probe (unter Berücksichtigung des Konzentrationsfaktors) entnommen und mit Laemmli-Puffer versetzt. 10 µl jeder Probe wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

### 2.2.3.12.2 Bindung an IgG Sepharose und Elution mittels TEV-Protease

Dem Lysat wurde insgesamt 1 ml 50% IgG-Sepharose (in Lysispuffer) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Durch eine kurze Zentrifugation (5 Min., 1000xg, 4°C) wurde die Matrix sedimentiert, der Überstand weitgehend abgenommen und die Sepharose in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (BioRad) umgefüllt. Eine Probe des Überstands (äquivalent zur Menge der Lysat-Probe) wurde zur Analyse per SDS-PAGE mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Die IgG-Sepharose wurde zunächst 5x mit je 3 Bettvolumen, dann 2x mit je 5 Bettvolumen 1x Lysispuffer gewaschen und mit 5 Bettvolumen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 gespült. Schließlich wurde die Sepharose in 500 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die Suspension zur Abspaltung des Epitop-tags mit 75 U TEV-Protease versetzt und ca. 3 Std. bei 16°C inkubiert. Danach wurde die Suspension in Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt und der GimC-enthaltende Überstand von der Sepharose getrennt (1 Min., 1000xg, 4°C). Für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) wurden Proben von Überstand und Sepharose genommen und mit einer äquivalenten Menge Laemmli-Auftragspuffer versetzt.

### 2.2.3.12.3 Ammoniumsulfatfällung

Zur Gewinnung größerer GimC-Mengen, wurden die Eluate mehrerer Reinigungen vereinigt und mittels Ammoniumsulfatfällung konzentriert. Dabei wurde der Probe bei 4°C, langsam und unter ständigem Rühren, festes Ammoniumsulfat zu einer Sättigung von 55% (entsprechend 326 mg/ml) zugegeben. Danach wurde weitere 30 Min. unter Rühren bei 4°C inkubiert. Die Proteinlösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 Min. bei 20800xg und 4°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Proteinsedimente wurden in je 100 µl Resuspendierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl) aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BioRad-Reagenz (2.2.3.9) bestimmt.

Die Qualitätskontrolle erfolgte, wie in 2.2.3.13.6 beschrieben, durch Gelfiltration mit einer Superdex200 Säule (Amersham Pharmacia). Der gereinigte Komplex wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.3.13 Reinigung des Gim-Komplexes aus *S. cerevisiae* nach Überexpression

Im Großmaßstab wurden der Gim-Komplex und dessen Verkürzungsmutanten über einen TEV-6His-Epitop-tag an der Gim6p-Untereinheit gereinigt. Dieser Affinitäts-tag enthält zusätzlich zum 6His-Epitop eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease (aus Tabak Mosaik Virus). Diese erlaubt das Entfernen des Epitop-tags nach der Reinigung. Von den dafür verwendeten Expressionsstämmen (UZY10 für den Wildtyp-Komplex; JSY70-JSY74 für die



Verkürzungsmutanten) wurden zunächst 50 Liter-Kulturen in SC-HIS-LEU-URA (UZY10), bzw. SC-HIS-LEU-TRP-URA angezogen. Bei einer Zelldichte von 0,6-0,8 OD<sub>600</sub> wurden die Kulturen für maximal 10 Std. mit Kupfersulfat (Endkonzentration 100 µmol/ml) induziert. Die Zellen wurden geerntet (10 Min., 4000xg, 4°C), mit 15% [w/w] 15% Glycerin vermischt und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Zellpellets wurden bei -80°C gelagert.

#### **2.2.3.13.1 Aufschluss der Hefezellen**

50 g Zellpellets wurden in zwei 50 ml Reaktionsgefäße eingewogen, mit je 25 ml 2x Lysepuffer (100 mM HEPES, 600 mM NaCl, pH 8,0 mit NaOH) mit Proteaseinhibitoren versehen und bei RT auf einem Taumelschüttler aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf je 50 ml aufgefüllt. Die Lyse erfolgte in einem EmulsiFlex Hochdruckhomogenisator der Firma Avestin, wie unter 2.2.3.12.1 beschrieben. Anschliessend wurde das Lysat mittels Zentrifugation (5 Min., 1000xg, 4°C) von unaufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern befreit. Zur Gewinnung der löslichen Fraktion wurde das Lysat erneut zentrifugiert (30 Min., 20000xg, 4°C), der Überstand in frische Reaktionsgefäße umgefüllt und zur Affinitätschromatographie (2.2.3.13.2) eingesetzt.

Das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens Lysispuffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde vom Überstand eine Probe mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl in Laemmli-Auftragspuffer hergestellt. Dem Sediment wurde eine äquivalente Probe (unter Berücksichtigung des Konzentrationsfaktors) entnommen und mit Laemmli-Puffer versetzt. 10 µl jeder Probe wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

#### **2.2.3.13.2 Affinitätschromatographie**

Dem Lysat wurden 10 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) zugegeben und 1 Std. bei 4°C (Taumeltisch) inkubiert. Durch eine kurze Zentrifugation (5 Min., 1000xg, 4°C) wurde die Ni-NTA-Matrix sedimentiert, der Überstand weitgehend abgenommen und die Agarose in eine Econo-Pac Chromatographiesäule (BioRad) umgefüllt. Eine Probe des Überstands (äquivalent zur Menge der Lysat-Probe) wurde zur Analyse per SDS-PAGE mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Die Ni-NTA Agarose wurde zunächst 6x mit je 10 ml 1x Lysispuffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8,0 mit NaOH), dann 4x mit 10 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol in 1x Lysispuffer) gewaschen. Schliesslich wurde der gebundene Komplex mit einem Imidazol-Stufengradienten in folgenden Fraktionen eluiert: 2x 5 ml, 2x 10 ml 100 mM Imidazol (in 1x Lysispuffer), 2x 5 ml, 1x 10 ml 200 mM Imidazol, 2x 5 ml 250 mM Imidazol und 1x 10 ml 400 mM Imidazol. Für die SDS-PAGE wurden von allen Wasch- und Elutionsschritten 10 µl

Probe abgenommen, vom Säulenmaterial je 100 µl Bettvolumen vor und nach Elution, sowie nach Waschen mit 20 mM Imidazol. Die Proben wurden mit derselben Menge Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 µl davon auf 15%-igen Gelen analysiert (2.2.3.2). Fraktionen, die Gim-Komplex enthalten, wurden vereint und mit Vivaspin 15 Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussvolumen 10 kDa) auf 2 ml eingengt.

### 2.2.3.13.3 Gelfiltration

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden im GimC-Eluat enthaltene Kontaminationen durch Gelfiltration mit einer Superdex200 16/60 Säule (Vol. 120 ml) abgetrennt. Zur Entfernung von Luftblasen, Schwebeteilchen, bzw. Proteinaggregaten, die die Qualität der Auftrennung und die Lebensdauer der Chromatographiesäulen beeinträchtigen, wurden verwendete Puffer vor Gebrauch gefiltert und entgast, Proteinstandard und Proben für 10 Min. bei 20800xg und 4°C zentrifugiert.

Die Säule wurde mit Lysispuffer äquilibriert und zunächst ein Größenstandard (1,44 mg Thyroglobulin, 1,44 mg Katalase, 1,44 mg Aldolase, 1,44 mg Ovalbumin, 1,44 mg Chymotrypsinogen, 2,88 mg RibonukleaseA ad 2 ml Lysispuffer) aufgetrennt. Die Gelfiltration wurde an einem FPLC-System von Amersham Biosystems mit folgendem Programm durchgeführt:

FPLC-Programm:

Flussrate:	1 ml/Min
Maximaldruck:	0,5 MPa
Volumen zum Loop spülen:	5 ml
Beginn der Fraktionierung:	nach 25 ml
Fraktionsvolumen:	2,5 ml
Ende der Fraktionierung:	nach 120 ml

Das Chromatogramm wurde bei 280 nm mit einer Schreiberempfindlichkeit von 2 V aufgezeichnet (Schreiber, Amersham Biosystems), der UV-Monitor wurde auf eine Empfindlichkeit von 0,02 AU eingestellt.

Nach erneutem Spülen der Säule wurde die GimC-enthaltende Probe mit demselben Programm aufgetrennt. Jeder Fraktion wurden 10 µl entnommen, mit 10 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 µl davon per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert. Fraktionen, die sauberen, intakten Gim-Komplex enthielten, wurden vereint und mit Vivaspin 15 Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussvolumen 10 kDa) auf ca. 1,5 ml eingengt.

#### **2.2.3.13.4 Abspaltung des 6His-Epitops mittels TEV-Protease**

Zur Abspaltung des 6His-tags mittels TEV-Protease wurde der Gesamtproteingehalt der Probe bestimmt (2.2.3.9) und TEV-Protease im Verhältnis 1:50 zum Gesamtprotein zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 4 Std. oder über Nacht. Vor und nach TEV-Inkubation wurden Proben für die SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.2) genommen.

#### **2.2.3.13.5 Affinitätschromatographie zur Entfernung des 6His-Epitops und der TEV-Protease**

Die Entfernung des abgespaltenen 6-His-Epitops und der ebenfalls mit einem 6His-Epitop fusionierten TEV-Protease aus der GimC-Präparation erfolgte wiederum durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose. Dabei binden die 6His-Proteine, aber vor allem auch noch enthaltene andere Verunreinigungen, die unspezifisch mit Ni-NTA interagieren, an die Matrix, während das gereinigte GimC im Durchlauf zurückbleibt. Um die benötigte Menge an Ni-NTA-Matrix zu bestimmen, wurde folgende Rechnung angestellt: die Menge an 6His-tag und noch enthaltenen Verunreinigungen (in mg/ml) wurde pauschal mit  $\frac{1}{4}$  des Gesamtproteins veranschlagt, die Menge zugefügter TEV-Protease (in mg/ml) addiert. Die Bindekapazität der Ni-NTA-Agarose liegt bei 5-10 mg/ml. Gerechnet wurde mit einer Kapazität von 10 mg/ml, um die Ni-NTA Menge (und damit das Volumen der folgenden Waschschrte) möglichst gering zu halten.

Nach Zugabe der Ni-NTA-Matrix wurde 30 Min. bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Die Suspension wurde in ein Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt, der Durchfluss durch kurze Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) abgetrennt und auf Eis gelagert. Die Affinitätsmatrix wurde 10x mit 1 Vol. Waschpuffer (Lysispuffer mit 5% Glycerin) gewaschen (Zentrifugation 0,5 Min., 1000xg, 4°C), die Waschfraktionen auf Eis aufbewahrt. Proben von Durchfluss und Waschschrten (7  $\mu$ l +7  $\mu$ l Laemmlis-Auftragspuffer) wurden per SDS-Gelelektrophorese (je 10  $\mu$ l) analysiert (2.2.3.2). Der Durchfluss und GimC-enthaltende Waschfraktionen wurden vereinigt und mit Vivaspin 15 Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussvolumen 10 kDa) auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml eingengt. Die gereinigten Komplexe wurden in 20  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.3.13.6 Analytische Gelfiltration mit dem SMART-System**

Zur Qualitätskontrolle wurden 50  $\mu$ g gereinigter Komplex durch Gelfiltration mit einer Superose12 PC 2.3 Säule (Amersham Pharmacia, Vol. 2,4 ml) analysiert. Die Säule wurde mit gefiltertem und entgastem Lysispuffer äquilibriert und zunächst ein Größenstandard (9  $\mu$ g Blue Dextran, 18  $\mu$ g Katalase, 18  $\mu$ g Aldolase, 18  $\mu$ g Ovalbumin, 36  $\mu$ g RibonukleaseA ad 50  $\mu$ l Lysispuffer) aufgetrennt. Die Gelfiltration wurde unter Verwendung des SMART-Systems von Amersham Biosystems mit folgendem Programm durchgeführt:

SMART-Programm:

Flussrate:	40 $\mu$ l/Min.
Maximaldruck:	2,4 MPa
Beginn der Fraktionierung:	nach 60 $\mu$ l
Fraktionsvolumen:	50 $\mu$ l
Ende der Fraktionierung:	nach 3 ml

Das Chromatogramm wurde bei 280 nm aufgezeichnet.

Nach erneutem Spülen der Säule, wurde die zentrifugierte, GimC-enhaltende Probe mit demselben Programm aufgetrennt. Der Gim-Komplex ergibt einen einzelnen Peak, der einer Größe von ca. 200 kDa entspricht.

#### **2.2.3.13.7 Umpuffern des gereinigten Gim-Komplexes**

Gereinigter Gim-Komplex wurde, für *in vitro* Translations-/Transkriptionsexperimente (2.2.3.23) mit Micro Bio-Spin 30 Säulchen (BioRad) in RTS-Puffer (55 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 28 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 11 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 5% [v/v] Glycerin) umpuffert. Dies sind vorgepackte Säulchen, die eine SSC-Puffer getränkte Acrylamidmatrix enthalten (SSC-Puffer: 150 mM NaCl, 17,5 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 0,02%  $\text{NaN}_3$ ). Das Ausschlussvolumen dieser Säulchen beträgt 40 kDa. Zunächst wurde das Gelbett durch mehrfaches Invertieren des Säulchens aufgewirbelt. Dann wurden die Verschlüsse des Säulchens entfernt, sodass der Puffer abtropfen konnte. Die Matrix wurde nun durch 3-maliges Waschen mit 500  $\mu$ l RTS-Puffer äquilibriert (Zentrifugation 1 Min., 1000xg, 4°C). Dann wurden maximal 75  $\mu$ l Proteinlösung in der Mitte des Gelbetts aufgetragen. Durch erneute Zentrifugation (4 Min., 1000xg, 4°C) wurde die Probe in den RTS-Puffer umpuffert. Da sich durch diese Methode das Volumen etwas erhöht, wurde die Proteinkonzentration im Anschluss erneut bestimmt (2.2.3.9).

#### **2.2.3.14 Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose**

Die Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose beruht auf der Bindung primärer Amine an die Matrix. Cyanogenbromid reagiert als Base mit den Hydroxylgruppen der Agarosematrix und bildet Cyanatester oder Imidocarbonate, die ihrerseits unter bestimmten Bedingungen mit primären Aminen reagieren. Für gewöhnlich werden daher Carbonat- oder Boratpuffer verwendet, die keine freien Amine (wie z.B. Tris-HCl) enthalten und die Proteine gegen Kopplungspuffer dialysiert. Der pH-Wert des Kopplungspuffers sollte zwischen 8,0 und 10 liegen, da die Aminogruppen der Proteinliganden in diesem pH-Bereich vorwiegend in der unprotonierten Form vorliegen. Die Reaktion der aktivierten Agarose mit den freien

Aminogruppen der Proteine resultiert in einer kovalenten Kopplung des Liganden an die Agarosematrix. Verbliebene reaktive Gruppen werden durch einen Überschuss an freien Aminen (Tris-HCl, Ethanolamin oder Glycin) abgesättigt. Eventuell vorhandene Reste ungekoppelter Liganden werden durch alternierendes Waschen mit Puffern hohen und niedrigen pH-Werts entfernt.

Für die Kopplung wurden 3 mg Protein pro ml Bettvolumen gequollene CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) verwendet. Zunächst wurde das Protein in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,0) resuspendiert (z.B lyophilisierte DNaseI, Roche) oder im Fall selbst gereinigter, gelöster Proteine über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert (3x 1 Liter). Die gefriergetrocknete Sepharose wurde 15 Min. in 1 mM HCl inkubiert und anschliessend auf einem Glasfilter mit 200 ml 1 mM HCl pro g Sepharose gewaschen. Die Sepharose wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, kurz zentrifugiert (5 Min., 1000xg, RT) und in 10 Vol. Kopplungspuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min., 1000xg, RT) wurde der Kopplungspuffer gegen die Proteinlösung ausgetauscht. Die Kopplung erfolgte 2 Std. bei RT (Taumeltisch). Dann wurde erneut zentrifugiert, die Proteinlösung abgenommen und Proteinreste durch Waschen mit 5 Vol. Kopplungspuffer entfernt. Anschliessend wurden freie Bindestellen durch 2-stündige Inkubation in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 M Ethanolamin blockiert. Durch alternierendes Waschen mit je 5 Vol. Acetatpuffer (100 mM NaOAc, pH 4,0, 0,5 M NaCl) und Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl) wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Schliesslich wurde die Protein-gekoppelte Sepharose mit 5 Vol. PBS gewaschen und in PBS (zur längeren Lagerung wurde dieses mit 0,02% NaN<sub>3</sub> versetzt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern) bei 4°C aufbewahrt. Um die Kopplungseffizienz zu überprüfen wurde die Konzentration der Proteinlösung vor und nach der Kopplung per BioRad-Reagenz bestimmt.

#### **2.2.3.15 Kopplung von Antikörpern an ProteinA-Sepharose**

Verglichen mit der in Punkt 2.2.3.12 beschriebenen Affinitätsreinigung von ProteinA-Fusionen über Sepharose-gekoppelte Antikörper, wird hier dasselbe Prinzip in umgekehrter Form angewandt, indem man sich die Bindung von Antikörpern an immobilisiertes ProteinA zu Nutze macht.

Für die Immobilisierung monoklonaler Antikörper, die im Westernblot 1:50 eingesetzt wurden, wurden pro 2 ml ProteinA-Sepharose (Amersham Pharmacia) 50 ml Hybridomen-Überstände ( $\alpha$ -HA, 12CA5;  $\alpha$ -Myc, 9E10) eingesetzt. Die dementsprechende Menge polyklonaler Seren (aus Kaninchen) wurde durch Vergleich der Signalstärke des jeweiligen Antikörpers mit  $\alpha$ -

HA-Antikörper-Signalen abgeschätzt und anhand der Bindungsspezifität der Sepharose und des Titers berechnet.

Serum und Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Die Sepharose wurde sedimentiert (5 Min., 2000xg, 4°C), in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (BioRad) überführt und die Matrix 3x mit 10 Bettvolumen 0,2 M Na-Borat, pH 9,0 gewaschen (5 Min., 2000xg, 4°C). Anschliessend wurde die Sepharose in 10 Bettvolumen Na-Borat Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Suspension wurden 10 µl Probe entnommen und mit 100 µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Der Crosslink zwischen Antikörper und ProteinA-Sepharose erfolgte bei RT, nach Zugabe von 20 mM Dimethylpimelimidat (1 Std., Taumeltisch). Die Matrix wurde sedimentiert (5 Min., 2000xg, RT), der Überstand abgenommen, die Sepharose 1x mit 10 Bettvolumen 0,2 M Ethanolamin, pH 8,0 gewaschen und schliesslich in 10 Bettvolumen derselben Lösung resuspendiert. Zum Blockieren ungesättigter Bindestellen wurde die Suspension 2 Std. bei RT inkubiert (Taumeltisch). Die Sepharose wurde in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (BioRad) überführt, 2x mit 10 Bettvolumen PBS gewaschen und schliesslich in PBS aufgenommen. 10 µl dieser Suspension wurden abgenommen und mit 100 µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz, wurden diese Probe und die Probe vor dem Crosslink, mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert. War der Crosslink unvollständig, d.h., konnten in der Probe nach Crosslink noch ungekoppelte Antikörper nachgewiesen werden, wurden diese durch Waschen der Sepharose mit 100 mM Glycin, pH 3,0 entfernt. Abschliessend wurde die Matrix mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub> bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.3.16 Präzipitation zytosolischer Proteine mit immobilisiertem Rpl25p**

Um die Interaktion zytosolischer Chaperone mit dem ribosomalen Protein Rpl25p zu testen, wurden aus je 100 OD<sub>600</sub> Zellen der Stämme YPH499 (Wildtyp) und JSY26 (YPH499, *srp14::SRP14-3HA*), Ganzzellextrakte hergestellt (2.2.3.1.1; Lysispuffer: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). 7-10 mg jedes Extrakts wurden mit gleichen Mengen (ca. 5 µM) MBP-Rpl25p, bzw. MBP (als Kontrollprotein) versetzt, die an eine CNBr-Matrix gebunden waren (2.2.3.15) und 2 Std. bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Anschliessend wurden die Proben in Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt. Das Lysat wurde durch eine kurze Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) entfernt, die Amylose-Matrix 3 mal mit 3 Bettvolumen Lysispuffer gewaschen und gebundene Proteine schliesslich durch Erhitzen in 1 Bettvolumen Laemmli-Probenpuffer (5 Min., 95°C) eluiert. Je 10 µl des Zellextrakts (1 µg/ml) und der Eluate wurden mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) und Westernblot (2.2.3.3) analysiert.

### 2.2.3.17 *In vitro* Bindetests mit gereinigten Proteinen

#### 2.2.3.17.1 Co-Präzipitation gereinigter Proteine mit immobilisiertem Rpl25p

Gereinigtes MBP-Rpl25p und MBP wurden an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert (2.2.3.14). Die Konzentration gekoppelten Proteins an der Matrix wurde aus der Menge eingesetzter Sepharose und Proteins unter Berücksichtigung der Kopplungseffizienz berechnet. Die Sepharose wurde zweimal mit Bindepuffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM KCl) gewaschen. Für den Bindetest wurden je 5  $\mu$ M Sepharose-gebundene und gereinigte Proteine in Mobicol-Zentrifugationssäulchen vermischt und der Ansatz mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l gebracht. Die Inkubation erfolgte für 2 Std. bei 4°C (Taumeltisch). Der Überstand wurde durch eine kurze Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) entfernt, die Sepharose 3x mit 500  $\mu$ l Waschpuffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 250 mM KCl, 0,2% Tween-20) und 2x mit 500  $\mu$ l Bindepuffer gewaschen und gebundene Proteine mit 100  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer eluiert (5 Min. 95°C). Gleiche Mengen des Totalproteins, des Überstands nach Bindung und des Eluats wurden mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

#### 2.2.3.17.2 Co-Präzipitation gereinigter Proteine mit $\alpha$ -Egd2p-ProteinA-Sepharose

Für einen 100  $\mu$ l Ansatz wurden 20  $\mu$ l Bettvolumen  $\alpha$ -Egd2p-ProteinA-Sepharose (gewaschen mit HEPES-Bindepuffer, 2.2.3.18.1), je 10  $\mu$ g gereinigtes Protein und HEPES-Bindepuffer vermischt. Nach 2 Std. Inkubation bei 4°C (Taumeltisch) wurde die Probe in Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt, der Überstand durch eine kurze Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) entfernt und die Matrix 3x mit 500  $\mu$ l Bindepuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 40  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer eluiert (5 Min. 95°C). Gleiche Mengen des Totalproteins, des Überstands nach Bindung und des Eluats wurden mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) analysiert.

### 2.2.3.18 Isolierung von Polysomen durch Dichtezentrifugation (Ribosomengradienten)

Zur Isolierung von Polysomen und Herstellung der Dichtegradienten wurden ausschliesslich RNase-freie Chemikalien, Glas- und Plastikgefäße, sowie DEPC-behandeltes Wasser verwendet. *S. cerevisiae* Zellen wurden in 200 ml geeignetem SC-Medium bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 kultiviert. Die Kultur wurde mit 100  $\mu$ g/ml Cycloheximid versetzt und rasch auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden pellettiert (3 Min., 4000xg, 4°C) und in 500  $\mu$ l/0,5 OD<sub>600</sub> CSB-Puffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml Cycloheximid und Protease Inhibitoren) gewaschen. Die Zellen wurden aufgeteilt und in CSB-Puffer mit 100  $\mu$ g/ml RNasin und 10 U/ml Apyrase, oder für die RNase-Behandlung in CSB-

Puffer mit 300 µg/ml RNaseA resuspendiert. Die Zellen wurden unter Verwendung RNase-freier Glasperlen mechanisch aufgeschlossen, die Lysate in frische Reaktionsgefäße überführt, die Glasperlen 2 x mit 250 µl CSB-Puffer nachgewaschen und die Lysate mit den entsprechenden Waschschritten vereint. Die Lysate wurden durch Zentrifugation (3 Min., 1000xg und 15 Min., 20800xg, 4°C) geklärt, die OD bei 260 nm und die Proteinkonzentration (2.2.3.9) bestimmt. Pro Gradient wurden 20 OD<sub>260</sub> aufgetragen.

#### **2.2.3.18.1 Herstellung von kontinuierlichen 20-50% Saccharosegradienten**

Kontinuierliche 20-50% Saccharosegradienten wurden mit einem Gradient Master 106 (Biocomp) hergestellt. Dafür wurden SW55Ti-Zentrifugationsröhrchen (Beckman) in einer magnetischen Halterung zunächst bis auf halbe Füllhöhe mit 20% Saccharoselösung (in CSB-Puffer) gefüllt. Diese wurde mit Hilfe einer Kanüle vorsichtig mit 50% Saccharoselösung (in CSB-Puffer) unterschichtet. Die Halterung wurde in der Mitte der Gradientenmischer-Plattform positioniert. Das Mischen der Gradienten erfolgte durch Drehen der Plattform in 2 Schritten. Erstens, für 2 Min. 50 Sek. bei einem Neigungswinkel von 55° und einer Geschwindigkeit von 25 rpm; zweitens, für 1 Min. 10 Sek. im Neigungswinkel von 83° bei 8 rpm. Die Gradienten wurden bis zur Verwendung, jedoch nicht länger als 2 Std., bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.3.18.2 Fraktionierung und Fällung der Ribosomengradienten**

Zum Aufladen der Proben wurde ein entsprechendes Volumen an der Oberfläche des Gradienten abgenommen und die Probe vorsichtig aufgetragen, ohne den Gradienten aufzuwirbeln. Die Röhrchen wurden in einen SW55Ti-Rotor (Beckman) eingesetzt und 75 Min. bei 54000 rpm (~280000xg) bei 4°C zentrifugiert. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation mit Hilfe eines Gradientenernters der Firma Labconco (Auto Densiflow) von oben nach unten, in Fraktionen steigender Dichte zu je 15 Tropfen (ca. 300 µl) geerntet. Dabei wurde die Probe durch eine Photozelle geleitet und die Verteilung der Ribosomen durch Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm dokumentiert.

Den Fraktionen wurde 55% TCA zu einer Endkonzentration von 12-15% zugegeben und mind. 30 Min. auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden pellettiert (15 Min., 20800xg, 4°C), der Überstand vollständig entfernt und das Sediment mit 100 µl kaltem (4°C) Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min., 20800xg, 4°C) wurde das Pellet luftgetrocknet, in 60 µl HU-Probenpuffer aufgenommen und 5 Min. bei 65°C erhitzt. Je 10 µl jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE (2.2.3.2) und Westernblot (2.2.3.3) analysiert.



### 2.2.3.19 Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten mittels Epitop-tag

Gesamtzellextrakte wurden aus 50OD<sub>600</sub> Zellen pro Stamm hergestellt. Die Zellen wurden sedimentiert (2400xg, 3Min.), einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen und in 500µl Lysispuffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM KCl, Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Der Aufschluss der Hefezellen und die Gewinnung des löslichen Überstandes erfolgten wie unter 2.2.3.1. beschrieben. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 1 mg der löslichen Fraktion mit 20 µl Bettvolumen ProteinA-Sepharose-gekoppelter Antikörper (2.2.3.15) versetzt und mind. 1,5 Std. bei 4°C (Taumeltisch) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in Mobicol-Zentrifugationssäulchen überführt und das Zelllysat durch Zentrifugation entfernt (2 Min., 1000xg, 4°C). Die Sepharose wurde 5x mit 500 µl Lysis-Puffer gewaschen (2 Min., 1000xg, 4°C) und schliesslich mit 2 Bettvolumen Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Gebundene Proteine wurden durch 5-minütiges Erhitzen der Proben bei 95°C von der Matrix gelöst. Je 10 µg Gesamtprotein des Zellextrakts vor IP und des Überstandes nach IP sowie 5-10 µl der eluierten Proteine wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Westernblot (2.2.3.3) analysiert.

### 2.2.3.20 Prävention der Aggregation denaturierter Proteine durch zytosolische Chaperone

Um zu untersuchen, ob zytosolische Chaperone die Aggregation denaturierter Proteine in Lösung verhindern können, wurden chemisch denaturierte Proteine in einer Quartzküvette mit verschiedenen Mengen zytosolischer Chaperone versetzt und die Aggregation photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 320 nm verfolgt.

Zur Herstellung der denaturierten Proteinsubstrate wurden 25 µl Aktin-*inclusion body*-Suspension (2.2.3.10.5) abzentrifugiert (10 Min., 20800xg, 4°C). Das Pellets wurde in 80 µl Denaturierungspuffer (6 M GuHCl, 20 mM HEPES-NaOH, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) aufgenommen und 1 Std. bei 25°C unter Schütteln denaturiert. Danach wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt (2.2.3.9).

Für den Aggregationstest wurde das denaturierte Protein in einer Quartzküvette zu einer Endkonzentration von 2 µM in Assaypuffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt (1:50-1:100; Endvolumen 200 µl). Die Aggregation wurde photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 320 nm für 10 Min. verfolgt. Um den Einfluss von zytosolischen Chaperonen auf die Aggregation nicht-nativer Proteine zu untersuchen, wurde der Assaypuffer zunächst in der Küvette mit 2-15 µM des gereinigten

Chaperons (Endkonzentration) versetzt, gut gemischt und dann das denaturierte Protein zugegeben. Erneut wurde die Absorption bei 320 nm für 10 Min. verfolgt.

#### **2.2.3.21 Crosslinking von gereinigtem GimC und Aktin**

Die Ansätze aus dem Aggregationsexperiment (2.2.3.20) wurden nach der Messung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl Probe wurden entnommen und mit 10 µl Laemmli-Probenpuffer vermischt (Totalprotein, T). Je 170 µl jedes Ansatzes wurden mit einer 5 mM Lösung des Crosslinkers DTSSP (in Assaypuffer, 2.2.3.20) versetzt (Endkonzentration 1 mM) und mit Assaypuffer auf 300 µl aufgefüllt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT (Taumeltisch) wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCl, pH 7,6 zu einer Endkonzentration von 50 mM gestoppt. Dem Ansatz wurden 20 µl Bettvolumen ProteinA Sepharose gekoppelte  $\alpha$ -Aktin-Antikörper zugegeben, das Volumen mit Assaypuffer auf 500 µl erhöht und für 1,5 Std. bei 4°C inkubiert (Taumeltisch). Anschliessend wurden die Proben in Mobicol-Zentrifugationssäulchen umgefüllt und der Durchfluss durch Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) entfernt. Die Sepharose wurde 1x mit 400 µl Assaypuffer, 1x mit 400 µl W1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0.5% DOC, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% [v/v] Triton-X-100 ), 2 x mit 400 µl W2 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% [v/v] Triton-X-100) und 1x mit 400 µl 1xPBS gewaschen. Durch eine abschließende Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) wurden Pufferreste entfernt. Die Sepharose wurde in 2 Bettvolumen Laemmli-Probenpuffer mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und gebundene Proteine durch Erhitzen auf 95°C (10 Min.) eluiert. Dabei wird auch der Crosslink gespalten. Je 10 µl des Totalproteins und des Eluats wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Fairbanksfärbung (2.2.3.5.2) analysiert. Für die Detektion im Westernblot (2.2.3.3) wurden die Totalprotein-Proben 1:20, die Eluatproben 1:8 verdünnt eingesetzt.

#### **2.2.3.22 *In vitro* Transkription/Translation**

Für die zellfreie *in vitro* Transkription/Translation wurde das RTS100 *E. coli* HY-Kit System von Roche verwendet. Das darin enthaltene *E. coli* Lysat stellt alle makromolekularen Komponenten für Translation und Transkription zur Verfügung, enthält jedoch keine zelleigene DNA. Die für das zu translatierende Protein codierende Sequenz wird unter der Kontrolle des T7-Promotors auf einem Plasmid eingebracht.

Zur Herstellung des Translationsmixes wurden die im Kit enthaltenen Komponenten wie folgt in Rekonstitutionspuffer (im Kit enthalten) resuspendiert:

Komponente	Rekonstitutionspuffer (Roche)
Aminosäuremix (ohne Methionin)	360 $\mu$ l
<i>E. coli</i> Lysat	300 $\mu$ l
Reaktionsmix	240 $\mu$ l

Dieses, von den Herstellerangaben abweichende, Mischverhältnis reduziert die Menge an Translationsmix, die pro Ansatz zugegeben werden muss und ermöglicht so die Zugabe zytosolischer Chaperone. Die Komponenten wurden vereint, in geeignete Aliquots (30, 75, 150  $\mu$ l) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für maximal einen Monat aufbewahrt. Zusätzlich wurde das im Kit enthaltene Methionin zunächst in 330  $\mu$ l Rekonstitutionspuffer resuspendiert, um eine 100  $\mu\text{M}$  Stock-Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde nach Bedarf mit RNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 3 mM verdünnt und in 100  $\mu$ l-Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Gereinigter Gim-Komplex, der dem Reaktionsansatz zugegeben wurde, wurde zuvor mit Micro Bio-Spin 30 Säulchen (BioRad) umgepuffert (2.2.3.13.7). Da die im RTS-Kit enthaltene Menge an Rekonstitutionspuffer begrenzt ist, wurde hierfür ein selbst hergestellter Puffer (RTS-Puffer: 55 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 28 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 11 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 5% [v/v] Glycerin) verwendet.

Pro RTS-Ansatz wurden 4  $\mu$ l Premix angesetzt:

1 $\mu$ l Plasmid-DNA (250 ng/ $\mu$ l)
0,5 $\mu$ l 3 mM Methionin (RTS-Kit)
0,5 $\mu$ l RNasin (30 U/ml)
2 $\mu$ l [ $^{35}\text{S}$ ] Methionin (15 mCi/ $\mu$ l)

Die RTS-Ansätze wurden wie folgt pipettiert und 3 Std. bei  $30^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert.

	Kontrolle	+ GimC
Premix	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
GimC	-	20 $\mu\text{M}$
Translationsmix	14 $\mu$ l	14 $\mu$ l
RTS-Puffer	ad 30 $\mu$ l	ad 30 $\mu$ l

Anschliessend wurde die Translation durch kurze Inkubation auf Eis gestoppt. Dem Ansatz wurden 8  $\mu$ l Probe entnommen. 3  $\mu$ l davon wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 27  $\mu$ l HU-Probenpuffer versetzt (Totalprotein, T). Der Rest der Probe wurde 30 Min. bei 20800xg,  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auch hiervon wurden 3  $\mu$ l entnommen und mit 27  $\mu$ l HU-Probenpuffer vermischt (lösliche Proteine, S). Das Sediment

(unlösliche Proteine, P) wurde mit 25 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 gewaschen (30 Min., 20800xg, 4°C) und schließlich in 50 µl HU-Probenpuffer resuspendiert. Je 5 µl der Proben wurden auf 12% SDS-Gelen analysiert, die Gele getrocknet (2.2.3.7) und per Phosphoimaging (2.2.3.23) ausgewertet. Der restliche Translationsansatz wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.3.23 Phosphoimaging und Quantifizierung**

Auf die getrockneten Gele (2.2.3.7) wurde zunächst über Nacht ein Phosphoimager Screen aufgelegt. Anhand dieses Screens wurde die optimale Expositionszeit abgeschätzt. Wichtig für eine erfolgreiche Auswertung ist, eine Übersättigung der Signale zu verhindern, da die Quantifizierung dadurch verfälscht wird. Die durch die Radioaktivität erzeugten Signale auf dem Screen wurden von einem Phosphoimager (Fuji Raytest FLA200) ausgelesen und mit der AIDA-Software (Raytest) ausgewertet. Quantifiziert wurden jene Signale, die dem *in vitro* translatierten Protein in voller Länge entsprachen. Jedes Experiment wurde mindestens 4x durchgeführt. Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung der Messergebnisse, sowie die graphische Darstellung erfolgten mit Hilfe von Microsoft Excel.

## **2.2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Pulse-Chase Faltungskinetik**

Zur Untersuchung der *in vivo* Faltungskinetik von Aktin wurden pro Hefestamm 70 OD<sub>600</sub> benötigt. Die entsprechenden Stämme wurden in SC-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 kultiviert, durch Zentrifugation (5 Min., 4000xg, RT) geerntet und mit SC-MET-CYS-Medium/ 1,2 M Sorbitol, pH 7,5 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min., 4000xg, RT) wurde das Zellpellet in 5 ml SC-MET-CYS/1,2 M Sorbitol, pH 7,5, 30 mM DTT resuspendiert und 15 Min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Min., 1500xg, RT) wurden die Zellen zur Spheroplastierung in 5 ml SC-MET-CYS/1,2 M Sorbitol, pH 7,5, 2,5 mg/ml Zymolyase 20T resuspendiert und 60 Min. bei 30°C inkubiert. Dabei wurden die Zellen von Zeit zu Zeit sanft aufgeschüttelt. Das im Medium enthaltene Sorbitol dient der Stabilisierung der Zellmembran und soll ein vorzeitiges Platzen der Spheroplasten verhindern. Während dieser Inkubation werden die Zellen außerdem in -MET-CYS-Mangelmedium ausgehungert. Dies erlaubt später den effizienten Einbau der entsprechenden radioaktiv-markierten Aminosäuren. Zur Entfernung von Zellwandtrümmern wurden die Spheroplasten

pellettiert (10 Min., 1500xg, RT), vorsichtig in 1 ml SC-MET-CYS/1,2 M Sorbitol, pH 5,5 aufgenommen, durch ein Kissen von 1,5 M Sorbitol in 3 ml Wasser zentrifugiert (10 Min., 1500xg, RT), dann mit 5 ml Medium gewaschen. Die Spheroplasten wurden nochmals sedimentiert und schließlich zur Regeneration 1 Std. in 4 ml Medium bei 30°C im Wasserbad inkubiert, wobei sie erneut immer wieder sanft aufgeschüttelt wurden.

Zur radioaktiven Markierung neu-synthetisierter Proteine wurden dem Medium zum Zeitpunkt 0 80 µCi/ml Promix (<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein, Amersham Pharmacia) zugegeben. Nach 80 Sek. wurde die radioaktive Markierung durch Zugabe von 40 µl 10 mg/ml Cycloheximid, 100 mM Methionin, 100 mM Cystein gestoppt. Zu definierten Zeitpunkten nach Zugabe des Promix wurden je 250 µl Probe entnommen, mit 250 µl kaltem 2x IP+Lysis-Puffer (2x TBS, 10 mM EDTA, 1% Tween, Proteaseinhibitoren) vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die vorherige Spheroplastierung der Zellen gewährleistet die in diesem Schritt erforderliche schnelle und effiziente Lyse.

Später wurden die Proben auf Eis aufgetaut, entlüftet und 10 Min. bei 20800xg zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden mit 50 µl HU-Probenpuffer versetzt und erneut eingefroren. Für die Präzipitation gefalteten Aktins wurden 400 µl der Proben mit 30 µl an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelter DNaseI (50% in PBS) versetzt und 90 Min. auf einem Taumeltisch bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert (1 Min., 1000xg, 4°C), in Mobicol-Zentrifugationsröhrchen überführt und der Überstand mittels Absaugapparatur entfernt. In dieser Apparatur wurden die Proben 1x mit 500 µl IP+Lysis-Puffer, 1x mit 500 µl W1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% DOC, 1% Triton-X-100), 2x mit 500 µl W2 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X-100) und 1x mit 500 µl PBS gewaschen. Pufferreste wurden durch eine kurze Zentrifugation (1 Min., 1000xg, 4°C) entfernt und die gebundenen Proteine durch Zugabe von 30 µl HU-Probenpuffer und Erhitzen (5 Min., 65°C) von der DNaseI-Matrix eluiert. Je 20 µl der Totalprotein-Proben und je 15 µl der DNaseI-Präzipitationen wurden auf 12%-SDS Gelen analysiert. Die gefärbten Gele wurden getrocknet, die radioaktiven Signale quantifiziert (2.2.3.23). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm KaleidaGraph (Synergy Software) verwendet.

#### **2.2.4.2 Test der Sensitivität von Hefestämmen gegenüber Chemikalien**

Die Sensitivität von Hefestämmen gegenüber Benomyl und Paromomycin wurde getestet, indem 10-fache serielle Verdünnungen dieser Stämme (und entsprechender Kontrollstämme) auf Platten gestempelt wurden, die verschiedene Konzentrationen der Chemikalien enthielten. Die Sensitivität gegenüber LatrunculinA wurde in Plattendiffusionstests untersucht. Die Inkubation

erfolgte für 2 Tage, meist bei 30°C und 23°C, da der Effekt das Zytoskelett beeinflussender Chemikalien bei tieferen Temperaturen ausgeprägter und dadurch besser zu beobachten ist. Paromomycin-haltige Platten wurden nur bei 30°C inkubiert.

#### **2.2.4.2.1 Herstellung serieller Verdünnungen**

Die zu testenden Stämme wurden in 3-4 ml entsprechendem SC-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Nach Messung der OD<sub>600</sub> wurde von jedem Stamm eine Verdünnung auf 0,2 OD<sub>600</sub> in 1 ml sterilem Wasser angesetzt. 500 µl davon wurden im Photometer zur Kontrolle gemessen. Ausgehend von dieser 0,2 OD<sub>600</sub>-Verdünnung wurden die Zellen in einer 96-Loch Mikrotiterplatte 10-fach seriell in je 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt. Die Verdünnungen wurden mit Hilfe eines abgeflamnten, sterilen 48-Stifte-Stahlstempels, der genau in eine halbe Mikrotiterplatte paßt, auf die Hefepplatten übertragen. Dabei wurde der Stempel nach dem Aufsetzen auf die Platte ca. 20-30 Sek. stehengelassen, damit die an den Stahlstiften haftende Flüssigkeit auf die Platte laufen konnte. Nach vollständigem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei den gewünschten Temperaturen inkubiert.

#### **2.2.4.2.2 Plattendiffusionstest**

Für den Plattendiffusionstest wurden pro zu testendem Stamm und Temperatur 10 ml Topagar hergestellt. Dazu wurden 0,05 OD<sub>600</sub> einer stationären Übernachtskultur (gewachsen in entsprechendem SC-Medium) in 5 ml vorgewärmtem SC-Medium resuspendiert und 5 ml temperierter 2x Agar zugegeben. Damit wurden entsprechende SC-Platten überschichtet. Hierbei ist es wichtig, dass auch die SC-Platten ein definiertes Volumen (35 ml pro Platte), und damit eine definierte Dicke haben. Damit soll sichergestellt werden, dass die Diffusion von LatrunculinA auf allen Platten in alle Richtungen (nach unten und seitlich in den Agar) vergleichbar ist. Nach Erkalten des Agars wurden, mit einer abgeflamnten Pinzette, auf jede Platte 4 sterile Filterplättchen (Durchmesser ca. 5 mm) in ausreichendem Abstand voneinander gelegt. Auf ein Filterplättchen wurden 10 µl DMSO, auf die anderen jeweils verschiedene Mengen einer 1 nmol/µl LatrunculinA-Lösung (in DMSO) aufgebracht und mit DMSO so ergänzt, daß auf jedes Filterplättchen insgesamt 10 µl Flüssigkeit aufgetragen wurden. Die Platten wurden nach Einziehen der Flüssigkeit in den Agar bei den gewünschten Temperaturen für 2-3 Tage inkubiert, bis klare Hemmhöfe erkennbar waren. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt.

### 2.2.4.3 *Two-Hybrid*

Das *Two-Hybrid*-System (Fields and Song, 1989) wurde zur Detektion von Wechselwirkungen zwischen Proteinen *in vivo* angewandt. Dazu wurden zwei Proteine, die hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen untersucht werden sollten, als Fusionsproteine mit der bakteriellen DNA-Bindedomäne *LexA*, bzw. der Aktivator-domäne des Transkriptionsfaktors Gal4p exprimiert. Interagieren die beiden Proteine miteinander, so werden die funktionellen Domänen der Transkriptionsfaktoren in räumliche Nähe gebracht, wodurch ein funktioneller Transkriptionsfaktor entsteht. Es kommt zur Expression des im Testerstamm codierten *LacZ*-Gens, dessen Promotor Bindestellen für den Transkriptionsfaktor enthält. Die vom *LacZ*-Gen codierte  $\beta$ -Galaktosidase bewirkt die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Somit kann die Aktivierung des Reportergens auf X-Gal-haltigem Nährmedium als Blaufärbung der Kolonien detektiert werden.

Für die *Two-Hybrid*-Studie wurden die zu testenden Gene in die Vektoren pEG202 und pMM5 (enthalten die *LexA*-Bindedomäne) und in pACTII und pMM6 (*Gal4*-Aktivator-domäne) kloniert. Der Stamm SGY37, der ein *LexA*-operator-*LacZ*-Reporterkonstrukt enthält, wurde mit den jeweiligen Plasmidpaaren transformiert, positive Transformanten auf SC-HIS-LEU-Platten, denen zusätzlich 100  $\mu$ g/ml Adenin zugegeben wurde, vereinzelt und bezüglich der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität getestet. Das zusätzliche Adenin in den Platten verhindert, dass sich aufgrund der *ade2-1*-Mutation in den Zellen ein rotes Zwischenprodukt der Purin-Biosynthese (p-Ribosyl-Aminoimidazol) anreichert. Durch die Zugabe des Adenins zum Medium bleiben die Zellen weiss, sodass die Blaufärbung durch die Aktivierung des  $\beta$ -Gal-Reporters besser zu sehen ist. Für den  $\beta$ -Galaktosidasetest wurden die Platten mit X-Gal-haltiger Agarose überschichtet. Pro Platte wurden 60 mg low melting Agarose in 3 ml Wasser gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen der Agarose auf ca. 50°C wurde diese mit 7 ml vorgewärmter Overlay-Lösung (0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 1% [w/v] SDS, 20 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) vermischt und 100  $\mu$ l 40 mg/ml X-Gal (in DMF) zugegeben. Der Topagar wurde vorsichtig auf die Platte aufgebracht, und die Platten bis zum Erscheinen der blauen Färbung bei RT inkubiert. Bei sehr starken *Two-Hybrid*-Interaktionen konnte die Färbung schon nach ca. 5 Min. beobachtet werden.

## 2.2.5 Immunologische Methoden

### 2.2.5.1 Generierung von Antikörpern

Für die Generierung polyklonaler Antiseren wurden Kaninchen mit gereinigten Proteinen immunisiert. Um geeignete Kaninchen auszuwählen, wurde den Tieren Blut entnommen, um das Präimmuserum im Streifenblot (2.2.5.1.2) auf Kreuzreaktionen mit Proteinen aus *S. cerevisiae* zu untersuchen. Ausgewählt wurden jene Tiere, deren Serum keine oder kaum Kreuzreaktionen aufwies. Zur Erstimmunisierung wurde 500 µg gereinigtes Protein als Emulsion mit 1 ml Freund'schem Adjuvans complete subkutan injiziert. Dieses Adjuvans dient der Stimulation der primären Immunantwort und enthält abgetötete, getrocknete *Mycobacterium tuberculosis*-Zellen. Für die Folgeimmunisierungen wurde das Antigen in gleicher Weise mit Freund'schem Adjuvans incomplete (ohne *M. tuberculosis*-Zellen) vermischt. Die erste Folgeimmunisierung erfolgte nach 2 Wochen. Dann wurde alternierend im Abstand von 2 Wochen entweder Blut abgenommen oder immunisiert, sodass zwischen den einzelnen Injektionen jeweils 4 Wochen lagen. Die Immunisierung wurde beendet, wenn das Serum in einer 1:10000 Verdünnung im Westernblot verwendet werden konnte, oder der Antikörpertiter vor Erreichen dieses Werts über mehrere Immunisierungen nicht mehr anstieg. Zur Gewinnung der Antiseren wurden die Kaninchen vom Tierarzt narkotisiert und ausgeblutet. Aus einem Kaninchen wurden zwischen 50 und 70 ml Serum gewonnen.

#### 2.2.5.1.1 Gewinnung des Serums aus Blutproben

Blutproben wurden zunächst für mind. 2 Std. bei 37°C, dann über Nacht bei 4°C inkubiert, damit das Blut koaguliert und sich der Blutkuchen vom Serum absetzt. Der Blutkuchen wurde durch Zentrifugation (15 Min., 20000xg, 4°C) sedimentiert und das Serum in ein frisches Reaktionsgefäß umgefüllt. Eventuell eingeschleppte Reste des Blutkuchens wurden durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Das Immuserum wurde dauerhaft bei -80°C, Arbeitsaliquots bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.1.2 Untersuchung des Präimmuserums und Bestimmung des Antikörpertiters im Streifenblot

Diese Abwandlung eines normalen Westernblots (2.2.3.3) diente der Detektion von Kreuzreaktionen des Präimmuserums mit Hefeproteinen und der Bestimmung des Antikörpertiters. Der Streifenblot zeichnet sich dadurch aus, dass mit Hilfe einer speziell angefertigten Apparatur gleichzeitig bis zu 7 verschiedene Serumverdünnungen getestet werden können.



Für den Westernblot wurden je 120 µl TCA-Extrakt aus Wildtypzellen (YPH499) und einem Kontrollstamm (z.B. einem entsprechenden Deletionsstamm) auf ein SDS-Gel mit 2 großen Taschen aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.2) und auf Nitrozellulose übertragen. Nach Inkubation der Membran in Blockierlösung (1x TBS/5% Magermilchpulver) wurde diese in eine Streifenblotapparatur (Zentralwerkstatt des MPI) eingespannt. Getestet wurden serielle 2-fache Verdünnungen des Serums in Blockierlösung (2 Std., unter leichtem Schütteln). Zur Untersuchung von Präimmunseren und des ersten Testserums (nach 2 Immunisierungen) wurden Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:6400 hergestellt. Mit fortschreitender Immunisierung richtete sich der Ausgangspunkt für die seriellen Verdünnungen nach den im letzten Streifenblot detektierten Signalen. Die Membran wurde zunächst 2x in der Apparatur, dann 2x in einer Schüssel mit 1x TBS gewaschen (je 10 Min.) und schliesslich 2 Std. mit Sekundäntikörper inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte, wie unter 2.2.3.3.2 beschrieben, mittels ECL.

### **2.2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern**

Zur Reinigung polyklonaler Seren wurden verschiedene Strategien verwendet. Zum einen wurden spezifische Antikörper an eine Affinitätsmatrix gebunden, zum anderen wurden unspezifische Antikörper über Affinitätschromatographie aus dem Serum entfernt.

#### **2.2.5.2.1 Anreicherung spezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren**

Zur Anreicherung spezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren wurde das gereinigte Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt, die spezifischen Antikörper über Affinitätschromatographie gebunden und mit Glycin eluiert. Die Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose erfolgte, wie unter 2.2.3.15 beschrieben, jedoch wurde die Ethanolamin-blockierte Matrix in diesem Fall anders gewaschen. Die Matrix wurde in einer 5 ml Chromatographiesäule der Firma Pierce mit 4 Vol. 100 mM NaOAc, pH 4,0, 500 mM NaCl, 2 Vol. PBS und 2 Vol. PBS, 1% SDS gewaschen. Die Säule wurde verschlossen und zur Denaturierung 40 Min. bei 65°C in PBS, 1% SDS inkubiert. Danach wurde die Matrix noch einmal mit PBS, 1% SDS bei RT gewaschen, mit 2 Vol. PBS, 1% Triton-X-100 gespült und schliesslich solange PBS aufgetragen, bis im BioRad Farbttest (vgl. 2.2.3.10.4) keine Türkisfärbung mehr detektierbar war. Starke Detergenzien, wie Triton-X-100, stören die Proteinbestimmung nach Bradford, da auch sie eine Farbänderung des Coomassie Blau bewirken. Diesen ungewollten Effekt bei der Proteinbestimmung macht man sich in diesem Fall zu Nutze, um das Auswaschen des Detergens zu kontrollieren.

Um gleichzeitig Antikörper aus dem Serum zu entfernen, die unspezifisch gegen *E. coli* und Hefepoteine gerichtet sind, wurden der Hauptssäule, an die das Antigen gekoppelt ist, zwei Säulen, die, wie unter 2.2.3.14 beschrieben, hergestellt wurden, vorgeschaltet.

Das zu reinigende Serum wurde aufgetaut, zentrifugiert (15 Min., 20800xg, 4°C) und vorsichtig, ohne das Gelbett aufzuwirbeln, auf die oberste Säule (*E. coli*-Extrakt an CNBr-aktivierter Sepharose) aufgetragen. Die Flussrate der Säulen sollte nicht höher als 5 ml/Min. sein. Nachdem alles Serum in die oberste Säule eingelaufen war, wurde diese mit PBS gespült, bis die Serumfront das untere Ende dieser Säule erreicht hatte. Die Säule wurde verschlossen und entfernt. Genauso wurde mit der zweiten Säule (Hefeextrakt eines entsprechenden Deletionsstammes an CNBr-aktivierter Sepharose) verfahren. Die Hauptsäule dagegen wurde nach Einlaufen des Serums so lange mit PBS gewaschen, bis im BioRad Farbttest kein Protein mehr nachgewiesen wurde. Die Matrix wurde mit 3 Vol. 300 mM NaCl, 0,1% Tween-20 und 4 vol PBS gewaschen, dann verschlossen und mind. 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Abtropfen des kalten PBS wurden die gebundenen Antikörper 5x mit 1 ml 0,2 M Glycin, 1 mM EGTA, pH 2,5 eluiert. Dabei wurden die Eluate sofort mit 3 M Tris-HCl, pH 8,0 neutralisiert, um ein Denaturieren der Antikörper zu vermeiden. Die kleinste und damit optimale Menge Tris-HCl, die ausreichend war, um den Glycinpuffer zu neutralisieren wurde jedesmal in einem Pilotexperiment bestimmt, bei dem 1 ml Glycinpuffer in 10 µl Schritten mit 10-100 µl 3 M Tris-HCl, pH 8,0 versetzt und der pH-Wert der Lösung mit pH-Papier nachgemessen wurde. Abschliessend wurde die Säule 5x mit 1 ml 4 M GuHCl, pH 7,0 gewaschen, um eventuell noch an der Säule haftende Antikörper abzulösen. Auch hier wurde der Proteingehalt der Eluate mittels BioRad Farbttest kontrolliert.

Die Glycin- bzw. GuHCl-Eluate wurden jeweils entsprechend des BioRad-Farbttests getrennt vereinigt, 10% BSA zu einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben und über Nacht gegen PBS dialysiert. Im Streifenblot (2.2.5.1.2) wurden das Serum vor und nach der Reinigung, sowie die Antikörpereluate untersucht und der Titer der gereinigten Antikörper bestimmt. Die gereinigten Antikörper wurden bei -80°C aufbewahrt.

Die Säulen wurden nach der Reinigung regeneriert und wiederverwendet. Zur Regeneration wurde die Matrix mit 6 Vol. Glycinpuffer, 3 Vol. PBS, 2 Vol. PBS, 1% SDS gewaschen. Die Säulen wurden verschlossen und 40 Min. bei 65°C inkubiert. Danach wurde die Matrix mit 2 Vol. PBS, 1% SDS und 3 vol PBS, 1% Triton-X-100 gewaschen, wobei dem Puffer beim letzten Mal waschen 0,02% NaN<sub>3</sub> zugegeben wurden, um das Wachstum von Mikroorganismen während der Aufbewahrung zu verhindern. Die Säulen wurden luftdicht verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.5.2.2 Depletion unspezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren**

Die Depletion unspezifischer Antikörper aus polyklonalen Seren erfolgte über zwei Affinitätsäulen. Dafür wurden gleiche Mengen Ganzzellextrakte aus *E. coli* und *S. cerevisiae*-Zellen an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (2.2.3.14). Der *E. coli* Extrakt wurde aus BL21(DE3)-Zellen hergestellt, die mit dem für die Antigenexpression verwendeten Vektor ohne Geninsert transformiert waren (vgl. 2.2.3.10.1). Für den Hefeextrakt (2.2.3.1) wurden Zellen verwendet, in denen das Gen, das das Zielprotein des Antikörpers codiert, deletiert war. Die Reinigung des Serums erfolgte, wie unter 2.2.5.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass hier 2 hintereinander geschaltete Säulen verwendet wurden, sodass das Serum von einer in die andere Säule tropft und die gebundenen Antikörper nicht eluiert, sondern verworfen wurden. Das auf diese Weise gereinigte Serum wurde bei -80°C aufbewahrt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone im Umfeld des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels

Verlässt eine naszente Proteinkette das Ribosom, so wird sie von einer Vielzahl verschiedener zytosolischer Chaperone gebunden, die sie während und nach der Translation gegen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder naszenten Ketten abschirmen und so ihre Aggregation verhindern. Obwohl diese Chaperone und Chaperon-Komplexe für sich genommen relativ gut charakterisiert sind, ist über deren Zusammenspiel und die funktionelle Kooperation zwischen Proteinsynthese- und Faltungsmaschinerie noch wenig bekannt. Daher sollte hier die Frage beantwortet werden, welche Chaperone direkt mit Ribosomen interagieren. Die Assoziation zytosolischer Chaperone mit Ribosomen wurde anhand von Co-Fraktionierungsexperimenten untersucht, und durch Co-präzipitation gereinigter Komponenten bestätigt. Dazu wurden zunächst Hefestämme und Antikörper hergestellt, die die Detektion und Anreicherung zytosolischer Chaperone und anderer potentiell beteiligter Faktoren, wie dem Ribosom und dem *Signal Recognition Particle* (SRP) erlauben.

##### 3.1.1 Herstellung von Hefestämmen und Antikörpern zum Nachweis zytosolischer Chaperone in *S. cerevisiae*

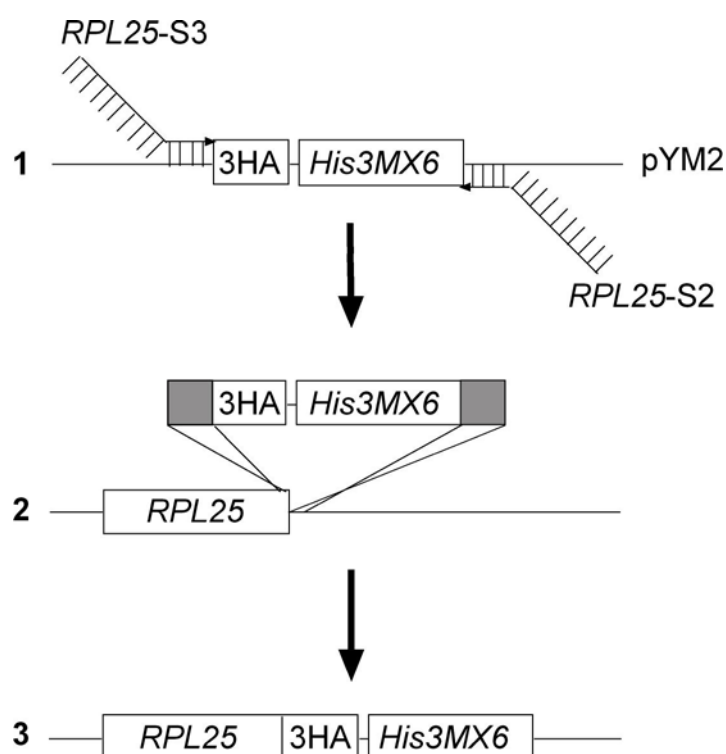
Um die Wechselwirkung zytosolischer Chaperone mit dem Ribosom untersuchen zu können, wurden zunächst Hefestämme hergestellt, die Epitop-markierte Versionen von Proteinen exprimieren, die für die Analyse als wichtig erachtet wurden. Durch eine Epitop-markierte Version von Rpl25p, einer Proteinkomponente der großen Untereinheit des Heferibosoms, sollte eine einfache Möglichkeit geschaffen werden, Ribosomen per Immunpräzipitation aus Zellextrakten anzureichern.

Gleichzeitig wurden Antikörper gegen Rpl25p und verschiedene zytosolische Chaperone generiert.

### 3.1.1.1 Herstellung Epitop-markierter Fusionsproteine

Zur schnellen und einfachen Isolierung von Ribosomen aus Zellextrakten, wurde das *RPL25*-Gen auf chromosomaler Ebene mit einem 3HA-Epitop versehen (vgl. 3.1.3).

Die dazu verwendete Methode des PCR-vermittelten Epitop-taggings (Knop et al., 1999; Wach et al., 1994), bietet vor allem den Vorteil, dass das Gen des zu untersuchenden Proteins nicht erst kloniert werden muss, sondern direkt im Organismus am chromosomalen Locus verändert werden kann. In Abb. 3.1 ist exemplarisch die chromosomale Integration der kodierenden Sequenz eines 3HA-Epitops an den offenen Leserahmen des *RPL25*-Gens dargestellt.



**Abb. 3. 1: Chromosomale Integration eines Epitop-tags am Beispiel von *RPL25***

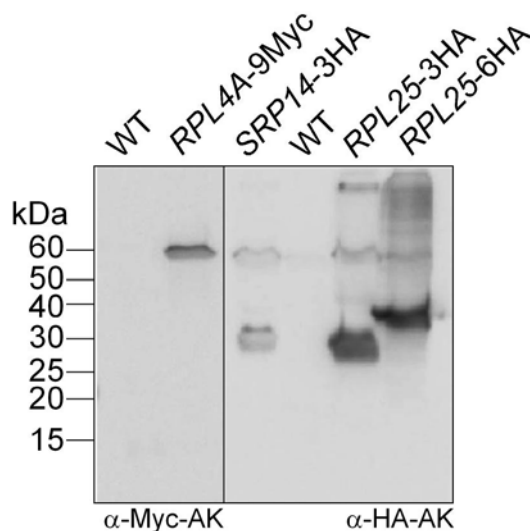
(1) Amplifizierung einer 3HA-*His3MX6*-Kassette mit genspezifischen Oligonukleotid-Primern (RPL25-S2/-S3). (2) Integration der Kassette in den *RPL25*-Locus mittels homologer Rekombination. (3) Schematische Darstellung des Rekombinationsprodukts. Das ursprüngliche Stop-Codon des *RPL25*-Gens wird ersetzt, der offene Leserahmen bis zum Stop-Codon des 3HA-Epitops erweitert.

Um Rpl25p mit dem 3HA-Epitop zu versehen (JSY18), wurde die entsprechende Epitop-Kassette mittels PCR aus dem Plasmid pYM2 (3HA-*His3MX6*) amplifiziert. Das Konstrukt besteht aus 3 Kopien des Hämagglutinin-Epitops aus dem Influenza Virus und einem geeigneten Selektionsmarker, in diesem Fall dem heterologen *HIS5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*. Der heterologe Auxotrophiemarker komplementiert die im Wildtyp YPH499 und dessen Derivaten vorhandene *his3Δ200*-Mutation und ermöglicht das Wachstum dieser Stämme auf Histidin-Mangelmedium. Gleichzeitig verhindert er das Auftreten falsch positiver Transformanten durch Genkonversion am *HIS3*-Locus der Hefen.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotid-Primer enthalten, neben Sequenzen für die Hybridisierung mit dem Epitop-Konstrukt, Sequenzen, die komplementär zu Bereichen vor und hinter dem Stop-Codon des *RPL25*-Gens sind. Es handelt sich dabei um je ca. 60 Basen des unmittelbar das Stopcodon flankierenden (*RPL25*-S3), und des 3'-untranslatierten Bereichs (*RPL25*-S2) des Gens. Diese kurzen homologen Sequenzen reichen in der Regel aus, um homologe Rekombination zu ermöglichen. Nach Amplifikation der Epitop-Sequenz wurden Zellen des Wildtyp-Stamms YPH499 mit dem PCR-Produkt transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Histidin-Mangelmedium plattiert (vgl. 2.2.1.11.1).

Analog wurde *RPL25* mit einem 6HA-Epitop (pYM3, 6HA-*klTRP1*) versehen. Ebenso wurde Rpl4ap, ein anderes Protein der 50S-Untereinheit des Heferibosoms, das nicht in der Nähe des Austrittstunnels liegt, mit einem 9Myc-Epitop (pYM28, 9Myc-*His3MX6*) fusioniert. Dieses ermöglicht ebenfalls die Präzipitation ganzer Ribosomen aus Zellextrakten, ohne jedoch mit Vorgängen am Austrittstunnel zu interferieren (vgl. 3.1.3.1). Das *SRP14*-Gen, das für eine Untereinheit des *Signal Recognition Particles* codiert, wurde zum Nachweis im Westernblot ebenfalls mit einem 3HA-Epitop (pYM2, 3HA-*His3MX6*) versehen.

Die Expression der Fusionsproteine wurde im Westernblot mit  $\alpha$ -Myc- und  $\alpha$ -HA-Antikörpern überprüft (Abb. 3.2) und konnte bei allen Stämmen nachgewiesen werden.



**Abb. 3. 2: Epitop-Markierung verschiedener Hefeproteine**

Zellextrakte der Stämme JSY33 (*RPL4A*-9Myc), JSY26 (*SRP14*-3HA), JSY18 (*RPL25*-3HA), JSY25 (*RPL25*-6HA) und des Wildtyps YPH499 wurden, nach Westernblot, zum Nachweis der Epitop-Markierung mit  $\alpha$ -Myc-, bzw.  $\alpha$ -HA-Antikörpern analysiert.

### 3.1.1.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antiseren wurden gegen die ribosomale Untereinheit Rpl25p, die Untereinheiten des Ribosomen assoziierten Komplexes (RAC), Ssz1p und Zuo1p, und die Untereinheiten des naszente Ketten-assoziierten Komplexes (NAC), Egd1p, Egd2p und Btt1p, generiert.

Um die Spezifität der Antikörper zu gewährleisten, wurden zunächst Sequenzabgleiche durchgeführt. Dabei wurden die Sequenzen von Ssz1p, eines Vertreters der untereinander eng verwandten Hsp70-Chaperonklasse und von Zuo1p, einem Mitglied der Hsp40-Familie, mit einer Hefeprotein-Datenbank (SGD) verglichen. Es zeigte sich, dass zur Generierung Ssz1p-spezifischer Antikörper nur der C-terminale Teil des Proteins (As 386-538) verwendet werden kann, da dieser Teil keine signifikante Übereinstimmung mit den Sequenzen anderer Mitglieder der Hsp70-Familie (Ssb1/2p, Ssa1-4p) aufweist. Für die Generierung Zuo1p-spezifischer Antikörper wurden die ersten 110 Aminosäuren des Proteins verwendet. Diese Fragmente und die offenen Leserahmen von Egd1p, Btt1p, Egd2p und Rpl25p wurden per PCR an chromosomaler DNA des Wildtyp-Hefestammes YPH499 amplifiziert, in geeignete Expressionsvektoren (pProExHTa, pKM260 und pGEX) kloniert und als 6His-, bzw. GST- (Glutathion-S-Transferase) Fusion in *E. coli* exprimiert. Die genannten Proteine und Proteinfragmente konnten sowohl als 6His-, als auch als GST-Fusionen stabil exprimiert werden (Abb. 3.3A und Daten nicht gezeigt). Da manche der Fusionsproteine jedoch unter nativen Bedingungen unlöslich (z.B. 6His-Rpl25p) oder instabil (z.B. GST-Btt1p) waren, wurden für die Immunisierung von Kaninchen (2.2.5.1) ausschliesslich 6His-Fusionen verwendet, die unter denaturierenden Bedingungen gereinigt wurden (Abb. 3.3B, 2.2.3.10.4). In Tabelle 3.1 sind die Plasmide für die Herstellung der Fusionsproteine aufgelistet:

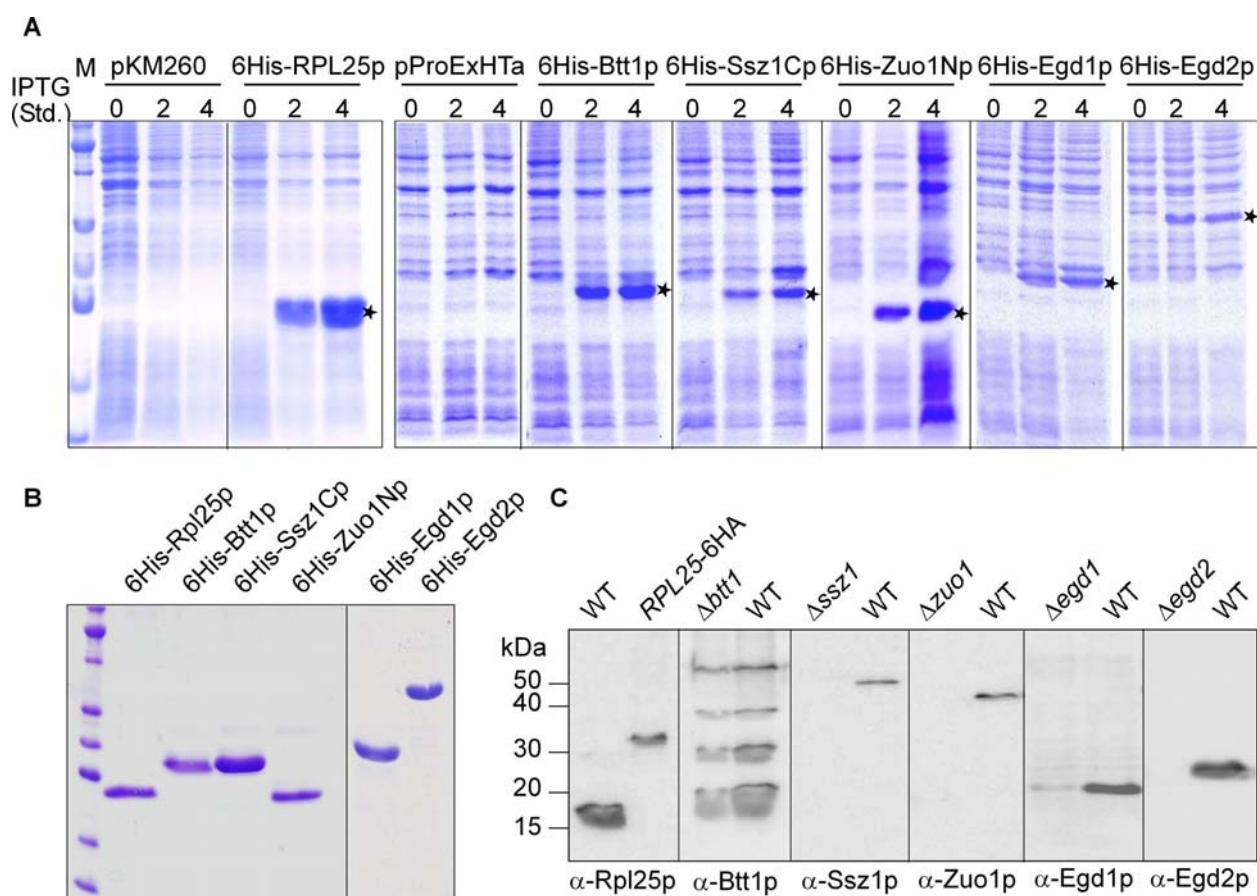
**Tabelle 3. 1: Generierung von Fusionsproteinen für die Herstellung polyklonaler Antiseren**

Plasmid	Vektor	PCR-Primer	Antikörper	Fusionsprotein
pJS35	pKM260	<i>RPL25-BamHI/NcoI</i> , <i>RPL25-BglII/XhoI</i>	$\alpha$ -Rpl25p	6His-Rpl25p
pJS48	pProExHTa	<i>ZUO1-BamHI/EheI</i> , <i>ZUO1-HindIII/XhoI</i>	$\alpha$ -Zuo1p	6His-Zuo1Np (As 1-100)
pJS54	pProExHTa	<i>BTT1-EcoRI/BamHI</i> , <i>BTT1-XhoI/HindIII</i>	$\alpha$ -Btt1p	6His-Btt1p
pJS58	pProExHTa	<i>SSZ1-386-BamHI/EheI</i> , <i>SSZ1-538-PstI/XhoI</i>	$\alpha$ -Ssz1p	6His-Ssz1Cp (As 386-538)
pJS60	pProExHTa	<i>EGD2-BamHI/EcoRI</i> , <i>EGD2-XhoI/XbaI</i>	$\alpha$ -Egd2p	6His-Egd2p
pJS62	pProExHTa	<i>EGD1-BamHI/EcoRI</i> , <i>EGD1-XhoI/XbaI</i>	$\alpha$ -Egd1p	6His-Egd1p

Die Spezifität der Antikörper wurde im Westernblot getestet. Als Kontrolle wurden meist TCA-Extrakte entsprechender Deletionsstämme verwendet. Zum Nachweis von Rpl25p, das von

einem essentiellen Gen codiert wird, wurde TCA-Extrakt eines Stamms verwendet, der eine mit dem 6HA-Epitop markierte Variante von *RPL25* exprimiert (vgl. 3.1.1.3). Die Addition des Epitops bedingt ein verändertes Migrationsverhalten gegenüber dem Wildtyp-Protein, sodass die Spezifität des Antikörpers an der Retardierung der entsprechenden Bande im Vergleich zum Wildtyp-Extrakt erkannt werden kann (Abb. 3.3C).

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden gleiche Mengen TCA-Extrakt des Wildtypstammes YPH499 und entsprechender Kontrollstämme auf SDS-Gelen aufgetrennt, per Westernblot auf Nitrozellulose übertragen und die Proteine mit den entsprechenden Antisera detektiert.



### Abb. 3.3: Herstellung polyklonaler Antikörper

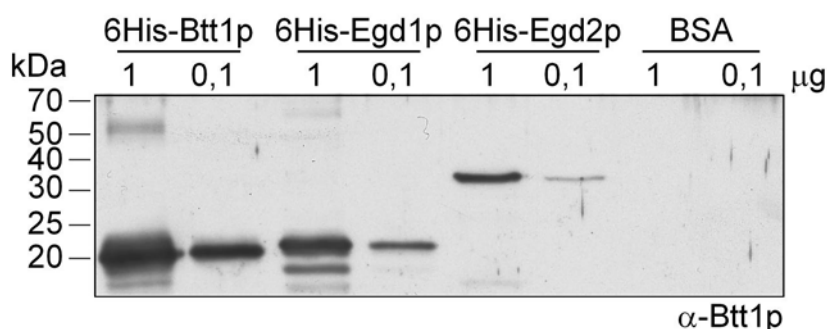
(A) Expression der zur Antikörperherstellung verwendeten Proteine und Proteinfragmente. Die Expression der 6His-Fusionsproteine wurde zum Zeitpunkt 0 mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach 0, 2 und 4 Stunden wurden Proben genommen und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die den leeren Vektor enthalten, entsprechend behandelt. Sterne markieren die Expressionsbanden. (B) SDS-PAGE der gereinigten Proteine und Proteinfragmente. (C) Überprüfung der Antikörperspezifität. Gleiche Mengen TCA-Extrakt des Wildtyps und entsprechender Kontrollstämme wurden nach Westernblot mit dem jeweiligen polyklonalen Antiserum analysiert.

Neben Rpl25p wurden auch Ssz1p, Zuo1p und Egd2p spezifisch von den jeweiligen Antisera detektiert. Es wurde im Wildtyp-Extrakt eindeutig ein sauberes, definiertes Signal erhalten, das im Extrakt des dazugehörigen Kontrollstammes nicht nachgewiesen werden konnte.



Anders verhielt es sich mit den Antiseren, die gegen die  $\beta$ -NAC Untereinheiten Egd1p und Btt1p generiert wurden. Bereits bei der Überprüfung der Antikörper während der Immunisierung zeigte sich, dass Btt1p nicht sehr immunogen ist. Als Konsequenz dessen, ist der Titer spezifischer Antikörper im Serum verhältnismäßig gering. Daher weist das  $\alpha$ -Btt1p-Serum verschiedene unspezifische Reaktionen (ca. 60-35 kDa) mit den verwendeten Hefeextrakten auf und erkennt teilweise auch die anderen Untereinheiten von NAC. Die 20 kDa-Bande im  $\Delta btt1$ -Extrakt (Abb. 3.3C) wird wahrscheinlich durch Egd1p verursacht, das fast genau so groß ist, wie Btt1p (Btt1p: 16,6 kDa, Egd1p: 17 kDa). Die Reaktion bei ca. 30 kDa könnte durch die Erkennung von Egd2p hervorgerufen werden.

Um die Wechselwirkung des polyklonalen Serums mit den NAC-Untereinheiten zu untersuchen, wurden verschiedene Mengen der für die Immunisierung hergestellten 6His-Fusionsproteine, zusammen mit entsprechenden Mengen BSA als Kontrolle, elektrophoretisch aufgetrennt. Per Westernblot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und diese mit  $\alpha$ -Btt1p-Serum inkubiert (Abb. 3.4).



**Abb. 3. 4: Kreuzreaktion des  $\alpha$ -Btt1p- Serums mit anderen NAC-Untereinheiten.**

1  $\mu$ g und 0.1  $\mu$ g gereinigte 6His-Fusionsproteine von Btt1p, Egd1p und Egd2p, sowie BSA als Kontrolle wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach Westernblot mit  $\alpha$ -Btt1p-Serum analysiert.

Es bestätigte sich, dass tatsächlich alle Komponenten von NAC durch das  $\alpha$ -Btt1p-Serum erkannt werden. Gleiche Mengen BSA erzeugten dagegen keine Reaktion (erwartetes Signal bei 67 kDa). Auch die schwache, durch das  $\alpha$ -Egd1p-Serum detektierte Bande im  $\Delta egd1$ -Zellextrakt (Abb. 3.3C), wurde in gleicher Weise untersucht und als Btt1p identifiziert (Daten nicht gezeigt).

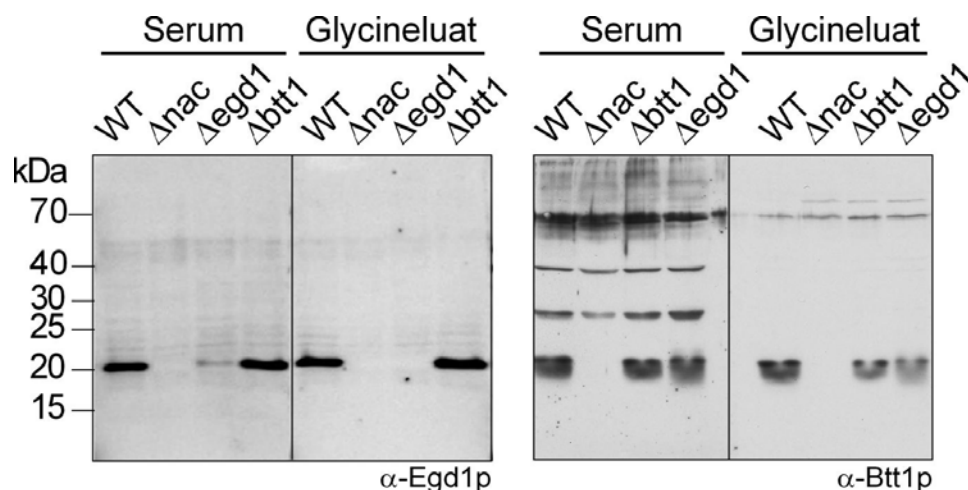
### 3.1.1.3 Reinigung des $\alpha$ -Btt1p- und $\alpha$ -Egd1p-Antiserums

Ein direkter Sequenzvergleich zwischen Egd1p und Btt1p zeigte, dass die ersten 75 Aminosäuren dieser Proteine zu 72% identisch sind. Die C-Termini dagegen weisen nur wenige Sequenzübereinstimmungen auf. Um die Antiseren per Affinitätschromatographie zu reinigen, wurden die nicht-übereinstimmenden Bereiche von Egd1p (As 76-157; Egd1 $\Delta$ Np) und Btt1p (As 76-149; Btt1 $\Delta$ Np) als 6His-Fusionen kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Um sicher

zu stellen, dass diese Fragmente für eine spezifische Anreicherung der jeweiligen Antikörper geeignet sind, wurde deren Erkennung durch die beiden Antiseren überprüft (Daten nicht gezeigt). Während das  $\alpha$ -Egd1p-Serum in der eingesetzten Verdünnung, neben Volllänge Egd1p, nur das C-terminale Egd1p-Fragment (Egd1 $\Delta$ Np) erkannte, nicht jedoch Btt1p, oder dessen C-terminales Fragment (Btt1 $\Delta$ Np), wurden sowohl Egd1p als auch Btt1p bzw. deren Fragmente durch das  $\alpha$ -Btt1p-Serum detektiert.

Aufgrund dieses Befundes wurden folgende Reinigungsstrategien für die Antiseren verfolgt: Egd1p-spezifische Antikörper wurden per Affinitätschromatographie über die Bindung an immobilisiertes Egd1 $\Delta$ Np aus dem  $\alpha$ -Egd1p-Serum angereichert. Dafür wurde Egd1 $\Delta$ Np in großem Maßstab exprimiert und denaturierend gereinigt. Im Fall des  $\alpha$ -Btt1p-Serums stellt eine  $\Delta$ btt1-Vorsäule (s.u.) den eigentlichen Reinigungsschritt dar. Diese dient der Entfernung der gegen Egd1p und Egd2p gerichteten Antikörper. Die im Serum verbleibenden  $\alpha$ -Btt1p-Antikörper wurden an immobilisiertes 6His-Btt1p gebunden und zur Konzentrierung in einem möglichst kleinen Volumen eluiert. Aufgrund der Reaktion des Serums mit dem C-terminalen Fragment von Egd1p, wurde von der Reinigung von Btt1 $\Delta$ Np abgesehen und Volllänge-Btt1p zur Kopplung verwendet. Beide Proteine wurden nach Entfernen des Harnstoffs und Dialyse gegen Kopplungspuffer an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden (2.2.3.14). Die Antikörper wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, nach Passage des Serums durch Vorsäulen mit gekoppeltem *E. coli*-Lysat und Lysaten entsprechender Hefestämme (KSY255:  $\Delta$ egd1, bzw. KSY254:  $\Delta$ btt1) per Affinitätschromatographie angereichert und mit Glycin von der Matrix eluiert (2.2.5.2.1).

Die Spezifität der gereinigten Antikörper wurde im Westernblot getestet (Abb. 3.5). Dazu wurden Westernblots mit TCA-Extrakten des Wildtyps YPH499 und entsprechender Kontrollstämme (KSY303-5:  $\Delta$ nac, KSY255:  $\Delta$ egd1, bzw. KSY254:  $\Delta$ btt1) mit dem Serum vor, bzw. den Glycin-eluierten Antikörpern nach der Affinitätsreinigung inkubiert.



**Abb. 3. 5: Überprüfung der Antikörperspezifität nach Affinitätsreinigung**

Die Spezifität der Antigenerkennung vor (Serum) und nach Affinitätsreinigung (Glycineluat) der  $\alpha$ -Egd1p- und  $\alpha$ -Btt1p-Antikörper wurde im Westernblot getestet. Analysiert wurde die Reaktion mit TCA-Extrakten des Wildtyps YPH499 (WT) als Positivkontrolle, des *egd1/egd2/btt1*-Deletionsstammes ( $\Delta$ nac) als Negativkontrolle und entsprechender Einzeldelentionsstämme ( $\Delta$ egd1,  $\Delta$ btt1).

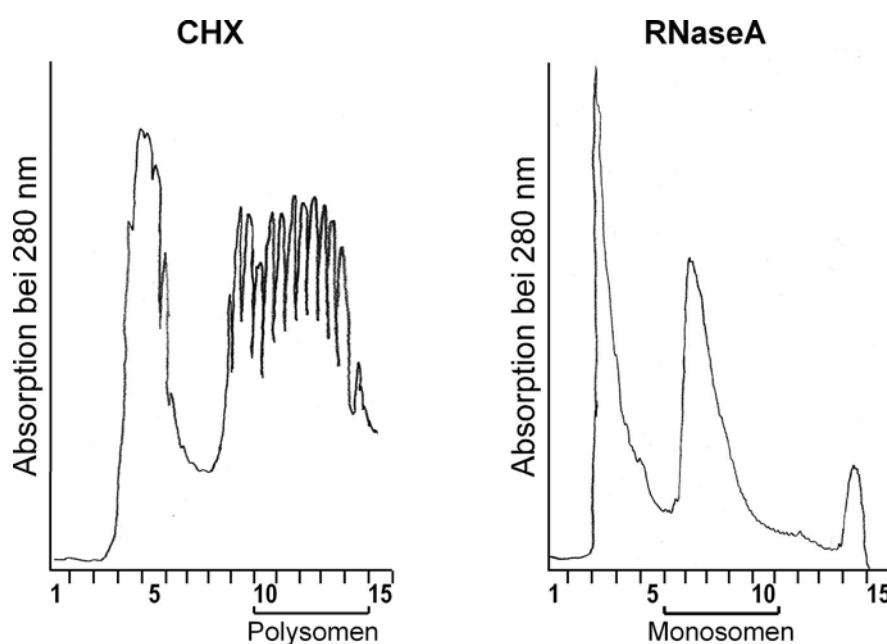
Aus dem  $\alpha$ -Egd1p-Serum konnten spezifische Antikörper angereichert und somit die Reaktion mit Btt1p eliminiert werden. Die Affinitätsreinigung des  $\alpha$ -Btt1p-Serums führte zu einer deutlichen Steigerung der Qualität der Antikörper, da der Anteil unspezifisch detektierter Signale nach der Reinigung fast vollständig reduziert wurde. Auch die Erkennung von Egd2p durch das Serum konnte vollständig eliminiert werden. Jedoch detektierten die affinitätsgereinigten Antikörper weiterhin sowohl Btt1p, als auch Egd1p. Dieser Antikörper wurde daraufhin generell zur Detektion der  $\beta$ -Untereinheiten von NAC, Egd1p und Btt1p, eingesetzt.

### 3.1.2 Co-migration von Ribosomen und zytosolischen Chaperonen

Wie Eingangs schon erwähnt (1.2), gibt es eine Reihe zytosolischer Chaperone, die direkt mit der Translationsmaschinerie interagieren. Die Assoziation dieser Chaperone mit translatierenden Ribosomen wurde in Co-Fraktionierungsexperimenten bestätigt. Dazu wurden Zellextrakte mittels Dichtegradientenzentrifugation durch lineare 20-50%-Saccharosegradienten fraktioniert (2.2.3.18). Um beurteilen zu können, ob eine eventuell beobachtete Co-Fraktionierung tatsächlich auf einer direkten Interaktion der zytosolischen Chaperone mit Ribosomen beruht, wurde ein Teil der Zellen, nach dem „Einfrieren“ der Translation mit Cycloheximid, bei der Lyse mit RNaseA behandelt, die andere Hälfte in Anwesenheit von RNase-Inhibitoren und Apyrase lysiert.

Die in Abbildung 3.6 gezeigten Profile, die während der Ernte der Gradienten bei 280 nm aufgezeichnet wurden, illustrieren eindrucksvoll den Effekt der RNase-Behandlung. Im Extrakt

ausschliesslich Cycloheximid-behandelter Zellen (CHX), finden sich in den Fraktionen 10-14 deutliche Absorptionsspitzen, die durch die unterschiedliche Länge der Polysomenketten hervorgerufen werden. Cycloheximid hemmt die Translokase der 80S Ribosomen. Die Translation wird augenblicklich gestoppt, die Ribosomen verbleiben, wie an einer Perlenschnur aufgefädelt, an der mRNA. In den RNase-behandelten Extrakten (RNase), bleiben die Ribosomen zwar auch mit der mRNA verbunden, diese wird jedoch in den zugänglichen Bereichen zwischen den einzelnen Ribosomen abgebaut. Im Profil sieht man daher nur eine Absorptionsspitze, die die einzelnen 80S Ribosomen (Monosomen) repräsentiert.

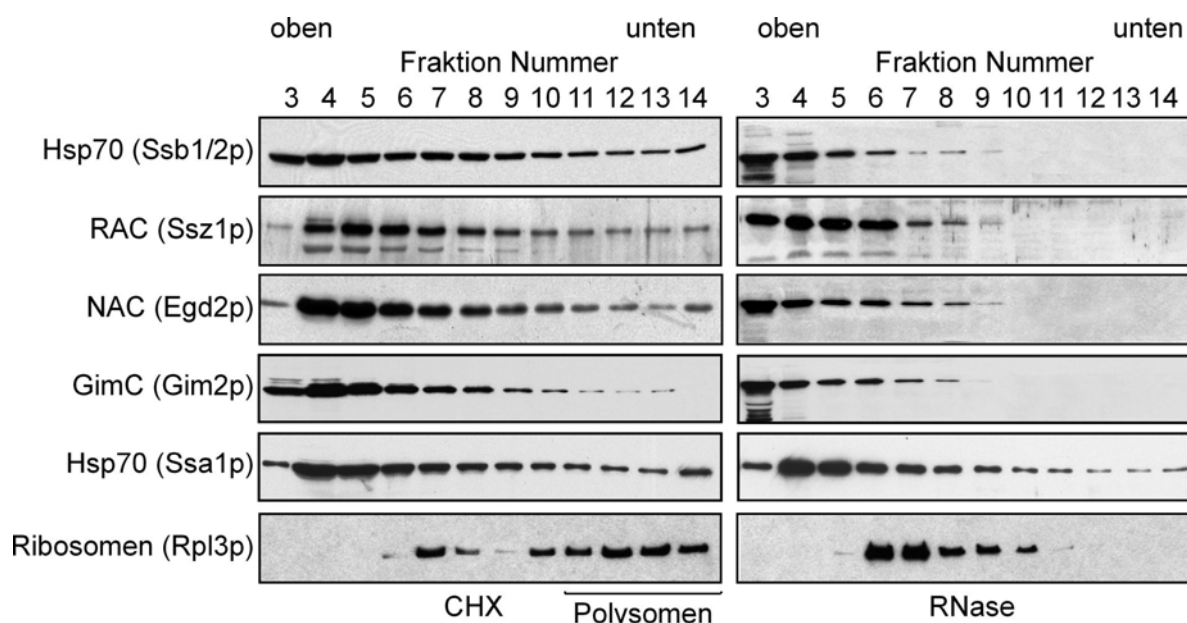


**Abb. 3. 6: Effekt von RNaseA auf Polysomen**

Cycloheximid- (CHX) und RNaseA-behandelte (RNaseA) Zellextrakte des Wildtyps YPH499 wurden mittels Zentrifugation durch kontinuierliche 20-50% Saccharosegradienten fraktioniert. Die Verteilung der Ribosomen wurde bei der Ernte anhand der Absorption bei 280 nm aufgezeichnet.

Mit translatierenden Ribosomen assoziierte Proteine sollten sich genauso verhalten, wie ihre Interaktionspartner, und nach RNaseA-Behandlung in den Monosomen-Fraktionen zu finden sein.

Um dies zu untersuchen, wurden die Proteine aus Gradienten-Fraktionen nach der Ernte mit TCA gefällt (2.2.3.18.2) und im Westernblot mit Chaperon-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Detektion von Ssa1p, einem Hitzeschock-induzierten Mitglied der Hsp70-Chaperonfamilie, diente dabei als Beispiel für ein nicht mit Ribosomen-assoziiertes Chaperon. Ribosomen wurden mit Antikörpern gegen die ribosomale Untereinheit Rpl3p lokalisiert (Abb. 3.7).



**Abb. 3. 7: Co-migration zytosolischer Chaperone mit Ribosomen**

Fractionen aus Saccharosegradienten Cycloheximid- und RNaseA-behandelter Zellextrakte des Wildtyps YPH499 wurden mit TCA gefällt und im Westernblot mit  $\alpha$ -Ssb1/2p-,  $\alpha$ -Ssz1p-,  $\alpha$ -Egd2p-,  $\alpha$ -Gim2p-,  $\alpha$ -Ssa1p und Ribosomen-spezifischen ( $\alpha$ -Rpl3p) Antikörpern analysiert.

Die Assoziation mit translatierenden Ribosomen konnte für alle getesteten Chaperone bzw., Chaperon-Komplexe, außer, wie erwartet, für Ssa1p, nachgewiesen werden. Obwohl Ssb1/2p, Ssz1p, als Repräsentant des Ribosomen-assoziierten Komplexes (RAC), Egd2p, eine Untereinheit des nascente Ketten-assoziierten Komplexes NAC und Gim2p, eine zentrale Untereinheit von GimC, im Gradienten der Cycloheximid-behandelten Probe in allen Fraktionen nachgewiesen wurden, bestätigte sich ihre Interaktion mit den Ribosomen durch die Verschiebung der Signale in die Monosomen-Fractionen nach Zerstörung der Polysomen durch RNaseA. Die beobachtete Co-migration spricht dafür, dass diese Chaperone, sowohl in einem freien Pool (Fraktionen 3-5), als auch Ribosomen-gebunden in der Zelle vorliegen. Es lässt sich aufgrund dieses Experiments jedoch nicht unterscheiden, ob diese Bindung direkt stattfindet, oder durch andere Proteine bzw. die nascente Kette vermittelt wird.

### 3.1.3 Präzipitation ganzer Ribosomen aus Zellextrakten

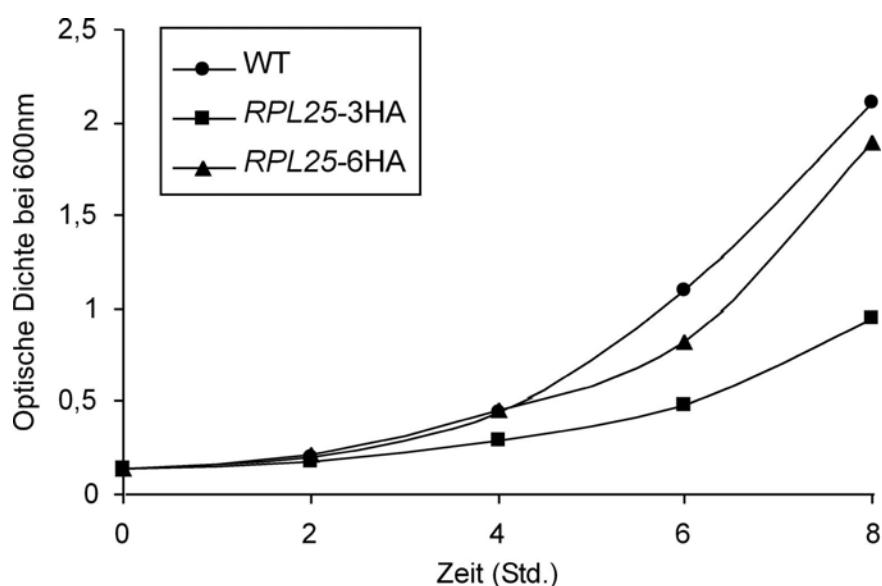
#### 3.1.3.1 Isolierung von Ribosomen über Rpl25p

Da die Fraktionierung von Zellextrakten recht aufwendig ist, wurde für eine genauere Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zytosolischen Chaperonen und Ribosomen nach einer einfachen Methode gesucht, Ribosomen zu isolieren. Inada et al. (Inada et al., 2002) konnten zeigen, dass intakte Ribosomen nach der Fusion eines C-terminalen FLAG-Tags an die ribosomale Untereinheit Rpl25p durch Immunpräzipitation aus Zellextrakten angereichert

werden können. C- und N-Terminus dieser, am ribosomalen Austrittstunnel gelegenen Untereinheit, sind auf der Außenseite des Ribosoms lokalisiert (Ban et al., 2000); sind also von der zytoplasmatischen Seite her zugänglich. Daher wurde die ribosomale Untereinheit Rpl25p, in Analogie zu der oben genannten Veröffentlichung, mit einem C-terminalen 3HA-, bzw. 6HA-Epitop fusioniert (vgl. 3.1.1.3).

### 3.1.3.1.1 Untersuchung des Phänotyps des *RPL25-3HA*-Stammes

Eine wichtige Voraussetzung für die Analyse des Zusammenspiels verschiedener Chaperone und Chaperonkomplexe am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel ist, dass die Funktion der Ribosomen durch die Addition der Epitop-tags an Rpl25p nicht beeinträchtigt wird. Es zeigte sich jedoch, dass der *RPL25-3HA*-Stamm (JSY18) einen deutlichen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp (YPH499), aber auch gegenüber dem *RPL25-6HA*-Stamm (JSY25) aufwies (Abb. 3.8). Für einen Wachstumstest wurden Übernachtskulturen dieser Stämme in SC-Complete-Medium auf 0,15 OD<sub>600</sub> verdünnt und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Alle 2 Std. wurden Proben entnommen, die optische Dichte bestimmt und graphisch aufgetragen. Gleichzeitig wurde die Verdopplungszeit der Hefestämme bestimmt (2.2.1.5).



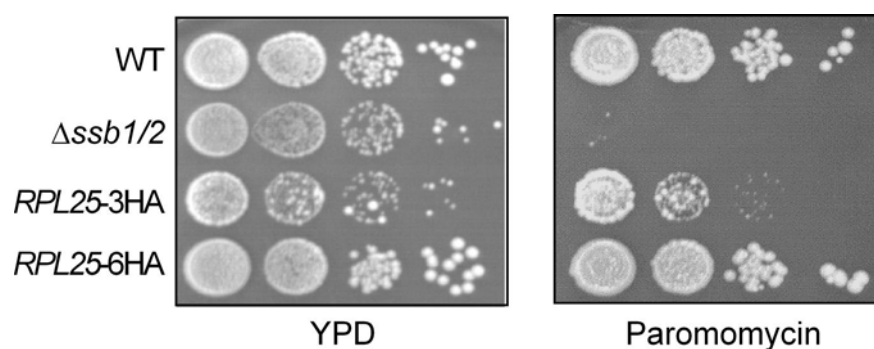
**Abb. 3. 8: Wachstumskurve der Epitop-markierten *RPL25*-Stämme**

Flüssigkulturen der Stämme YPH499 (WT), JSY18 (*RPL25-3HA*) und JSY25 (*RPL25-6HA*) wurden in SC-Complete-Medium inkubiert. Alle 2 Std. wurden Proben entnommen, die OD<sub>600</sub> bestimmt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

Der Wildtyp YPH499 wuchs mit einer Verdopplungszeit von ca. 120 Minuten. Während der *RPL25-6HA*-Stamm seine Zellzahl mit ähnlicher Geschwindigkeit verdoppelte ( $t_D$  ca. 130 Min.), zeigte der *RPL25-3HA*-Stamm dagegen ein deutlich langsames Wachstum mit einer Verdopplungszeit von 180 Min.

Da sich die *RPL25*-HA-Stämme nur durch die Länge des Epitops unterscheiden, lag die Vermutung nahe, dass das kürzere Epitop die normale Funktion der Ribosomen beeinträchtigt. Translationsdefekte können in der Hefe anhand der Sensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika, wie Paromomycin, detektiert werden. Diese sind normalerweise nur gegen Prokaryoten wirksam, da sie mit hoher Affinität an die 16S rRNA der 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms binden. Ausschlaggebend dabei ist ein bestimmter Adenosin-Rest der rRNA, der an der Akzeptorstelle des Ribosoms liegt. In Eukaryoten findet sich an derselben Stelle ein Guanosin-Rest. Dieser Unterschied bewirkt eine massive Reduktion der Affinität der Aminoglycoside zum Decodierungszentrum der Ribosomen, sodass diese Antibiotika gegen Hefen und andere Eukaryoten im Normalfall nur sehr schwach oder gar nicht wirksam sind (Recht et al., 1999). Ist die Funktion der zytosolischen Ribosomen in diesen Organismen jedoch bereits gestört, können Aminoglycosid-Antibiotika dennoch wirksam werden. Als Konsequenz der Antibiotikazugabe kommt es in diesen Fall verstärkt zu Fehlern beim Lesen der Codons, die z.B. in vorzeitigen Kettenabbrüchen und Translokationsfehlern resultieren. Die Lebensfähigkeit der Hefen wird dadurch beeinträchtigt (Rakwalska and Rospert, 2004).

Um die Epitop-markierten *RPL25*-Stämme bezüglich eventuell vorhandener Translationsdefekte zu untersuchen, wurden serielle 10-fache Verdünnungen dieser Stämme auf Vollmedium ohne und mit 150 µg/ml Paromomycin gestempelt (2.2.4.2.1) und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Ein *ssb1/2*-Deletionsstamm (KSY185), der Paromomycin-sensitiv ist und der Wildtyp-Stamm YPH499 dienten dabei als Kontrollen (Abb. 3.9).



**Abb. 3. 9: Vergleich der Paromomycin-Sensitivität der HA-Epitop-markierten *RPL25*-Stämme**

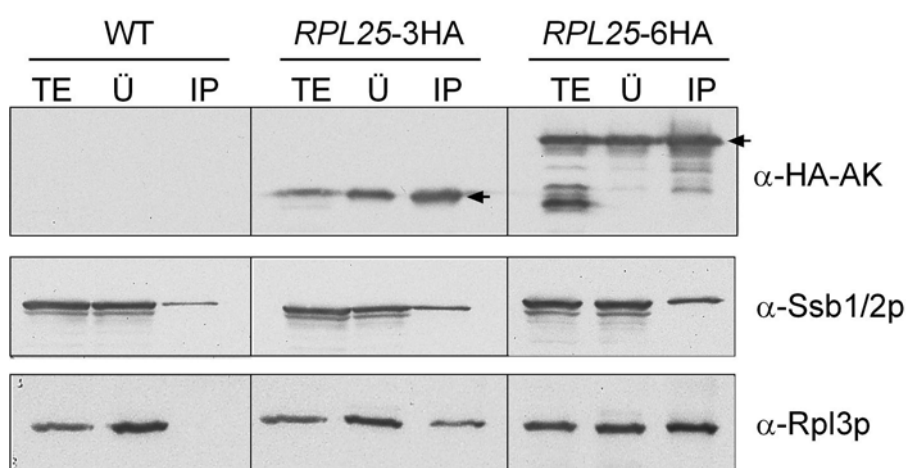
Das Wachstum der Hefestämme YPH499 (WT), KSY185 ( $\Delta ssb1/2$ ), JSY18 (*RPL25*-3HA) und JSY25 (*RPL25*-6HA) wurde in seriellen 10-fachen Verdünnungen auf Medium ohne und mit 150 µg/ml Paromomycin verglichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Der *RPL25*-3HA-Stamm wies, verglichen mit dem Wildtyp- und dem *RPL25*-6HA-Stamm, tatsächlich eine erhöhte Sensitivität gegenüber Paromomycin auf. Dies läßt darauf schliessen, dass der kürzere Epitop-tag die normale Funktion dieser ribosomalen Untereinheit beeinträchtigt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das kurze, relativ unflexible 3HA-Epitop Interaktionsstellen am ribosomalen Austrittstunnel verdeckt. Diese würden dadurch schwer

zugänglich und die Wechselwirkung zytosolischer Faktoren mit dem Ribosom gestört. Das längere 6HA-Epitop dagegen, wäre aufgrund seiner höheren Flexibilität leichter zu verdrängen und daher kein Hindernis für die Interaktion zytosolischer Faktoren mit den Ribosomen.

### 3.1.3.1.2 Co-Präzipitation zytosolischer Chaperone

Um die Hypothese zu testen, dass der kurze Epitop-tag mit der Wechselwirkung zytosolischer Faktoren mit dem Ribosom interferiert, wurde Rpl25p mit immobilisierten  $\alpha$ -HA-Antikörpern über den Epitop-tag aus Lysaten der entsprechenden Hefestämme angereichert (JSY25, JSY18) und die Co-Präzipitation des Ribosomen-assoziierten Hsp70-Chaperons Ssb1/2p und anderer ribosomaler Proteine, in diesem Fall der ribosomalen Untereinheit Rpl3p untersucht (Abb. 3.10).



**Abb. 3. 10: Co-Präzipitation von Ssb1/2p und Rpl3p mit Epitop-markiertem Rpl25p**

Rpl25-3HAp und Rpl25-6HAp wurden mit  $\alpha$ -HA-Sepharose aus Zellextrakten der Stämme JSY18 (*RPL25-3HA*) und JSY25 (*RPL25-6HA*) präzipitiert (siehe Pfeile). Ein Extrakt des Wildtyp-Stammes YPH499 (WT) wurde als Kontrolle auf gleiche Weise behandelt. Proben des Totalextrakts (TE), des ungebundenen Überstands (Ü) und des Immunpräzipitats (IP) wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit spezifischen Antikörpern bezüglich der Co-Präzipitation von Ssb1/2p und Rpl3p untersucht.

Obwohl Ssb1/2p zu einem geringen Anteil auch unspezifisch an die  $\alpha$ -HA-Sepharose bindet (vgl. YPH499, IP), kann man klar erkennen, dass die Assoziation von Ssb1/2p im *RPL25-3HA*-Hintergrund gegenüber dem *RPL25-6HA*-Stamm stark reduziert ist. Die Quantifizierung der im Westernblot mit  $\alpha$ -Ssb1/2p-Antikörpern detektierten Signale ergab, dass nur ca. 56% der im *RPL25-6HA*-Hintergrund co-präzipitierten Menge Ssb1/2p im *RPL25-3HA*-Stamm mit Ribosomen assoziiert ist. Dieser Befund liefert auch eine mögliche Erklärung für die Paromomycin-Sensitivität des *RPL25-3HA*-Stammes. Es ist bekannt, dass das Fehlen von funktionellem Ssb1/2p am Ribosom zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Translationsgenauigkeit führt. Diese wird durch Paromomycin verstärkt und korreliert mit einem starken Wachstumsdefekt (Rakwalska and Rospert, 2004). Da alle diese Phänotypen auch im Fall des *RPL25-3HA*-Stammes zu beobachten sind, ist anzunehmen, dass das kürzere Epitop tatsächlich die Assoziation von Ssb1/2p, und eventuell auch anderer zytosolischer Chaperone mit



den Ribosomen behindert und damit deren Funktion stark einschränkt. Es ist auf diese Weise jedoch nicht zu beurteilen, ob Rpl25p selbst direkt an dieser Interaktion beteiligt ist.

Auch die Co-Präzipitation anderer ribosomaler Proteine, in diesem Beispiel Rpl3p, einer weiteren Komponente der 60S Untereinheit, ist im *RPL25*-3HA-Stamm gegenüber der 6HA-markierten Variante um ca. 35% reduziert. Es kann also gut möglich sein, dass das kürzere Epitop auch die Assemblierung oder Stabilität der Ribosomen selbst beeinflusst.

### **3.1.3.2 Isolierung von Ribosomen mittels Epitop-markiertem Rpl4ap**

Aufgrund der Beeinträchtigung der Assoziation zytosolischer Chaperone mit den Ribosomen, wurde von der Verwendung von Epitop-markiertem Rpl25p als Instrument für weitere Experimente abgesehen und eine andere ribosomale Untereinheit ausgewählt, die zur Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten verwendet werden kann. Diese Untereinheit sollte möglichst weit vom ribosomalen Austrittstunnel, aber auch von anderen für die Ribosomenfunktion wichtigen Stellen, wie z.B dem Peptidyltransferase-Zentrum, das u.a. die Bindestelle für t-RNAs enthält, oder der Kontaktstelle zwischen 40S und 60S Untereinheit, entfernt liegen. Außerdem sollte der C-Terminus dieser Untereinheit von der Außenseite des Ribosoms her zugänglich sein, um nach der Fusion mit dem Epitop-tag, die Erkennung des Epitops durch spezifische Antikörper zu erlauben.

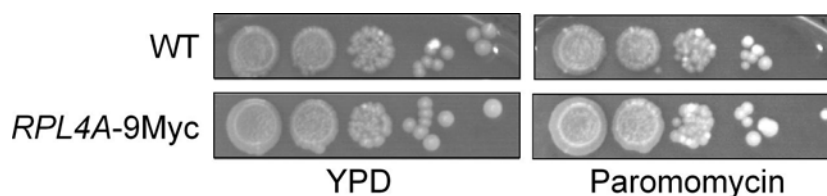
Die ribosomale Untereinheit Rpl4ap erfüllt alle diese Voraussetzungen. Aus Vergleichen der Kristallstruktur der 50S Untereinheit des Ribosoms von *Haloarcula marismortui* (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000) und der Cryo-EM Struktur des 80S Ribosoms aus *S. cerevisiae* (Spahn et al., 2001) geht hervor, dass, obwohl Rpl4ap mit einem weitläufigen Loop ins Innere des Ribosoms und in die Nähe des Peptidyltransferase-Zentrums reicht, der Großteil des Proteins und vor allem der C-Terminus an einer Stelle liegen, die sich abseits des Austrittstunnels, des Peptidyltransferase-Zentrums und der Brücke zwischen der 40S und 60S Untereinheit befindet. Somit ist nicht anzunehmen, dass ein Epitop-tag an dieser Untereinheit mit der Funktion der Ribosomen interferiert. Daher wurde Rpl4ap auf chromosomaler Ebene mit einem C-terminalen 9Myc-Epitop fusioniert (vgl. 3.1.1.3), und das Fusionsprotein bezüglich seiner Funktionalität untersucht.

#### **3.1.3.2.1 Untersuchung des Phänotyps des *RPL4A*-9Myc-Stammes**

Um zu untersuchen, ob Epitop-markiertes Rpl4ap zur Anreicherung von Ribosomen geeignet ist, wurde der *RPL4A*-9Myc-Stamm JSY33 in Analogie zu den *RPL25*-HA-Stämmen JSY18 und

JSY25 bezüglich der Sensitivität gegenüber Paromomycin und der Co-Präzipitation von Ssb1/2p getestet.

Zur Detektion einer eventuellen Paromomycinsensitivität wurde das Wachstum 10-facher serieller Verdünnungen der Stämme YPH499 (WT) und JSY33 (*RPL4A-9Myc*) auf Vollmedium ohne und mit 150 µg/ml Paromomycin nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C verglichen (Abb. 3.11).

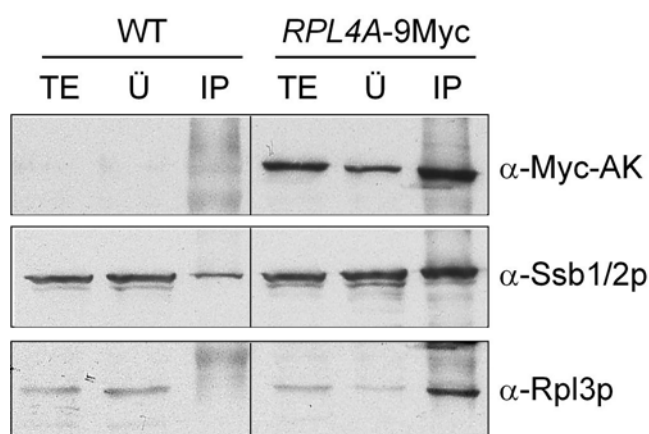


**Abb. 3. 11: Paromomycin-Sensitivität des *RPL4A-9Myc*-Stammes JSY33**

Serielle 10-fache Verdünnungen der Hefestämme YPH499 (WT) und JSY33 (*RPL4A-9Myc*) wurden auf Medium ohne und mit 150 µg/ml Paromomycin gestempelt. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Es konnte keine erhöhte Sensitivität des Epitop-markierten Stammes gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika im Vergleich zum Wildtyp-Stamm YPH499 festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Translation durch das Anhängen des Epitops an die ribosomale Untereinheit Rpl4ap nicht beeinträchtigt wird.

Auch scheint weder die Assoziation zytosolischer Chaperone mit den Ribosomen, noch die Assemblierung, bzw. Stabilität der Ribosomen selbst durch den 9Myc-tag gestört. Wie aus den in Abb. 3.12 gezeigten Westernblots hervorgeht, wird sowohl Ssb1/2p, als auch Rpl3p bei der spezifischen Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten des Stammes JSY33 (*RPL4A-9Myc*) über den Epitop-tag, mittels  $\alpha$ -Myc-Sepharose, effizient co-präzipitiert.



**Abb. 3. 12: Co-Präzipitation von Ssb1/2p und Rpl3p mit Epitop-markiertem Rpl4ap**

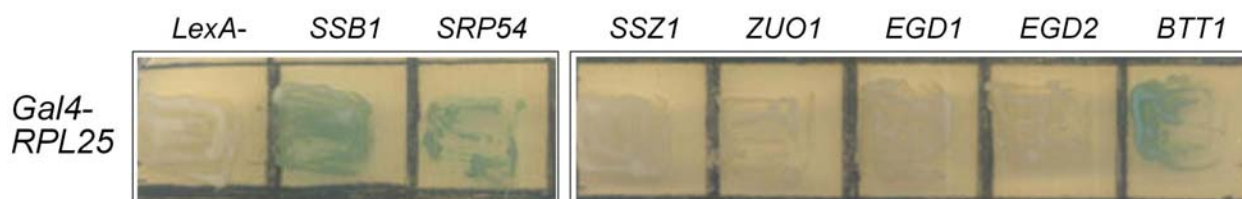
Ribosomen wurden über das 9Myc-Epitop an Rpl4ap durch Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Myc-Sepharose aus Zellextrakten der Stämme YPH499 (WT) und JSY33 (*RPL4A-9Myc*) präzipitiert. Proben des Totalextrakts (TE), des Überstands (Ü) und des Immunpräzipitats (IP) wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit entsprechenden spezifischen Antikörpern bezüglich der Co-Präzipitation zytosolischer Chaperone ( $\alpha$ -Ssb1/2p) und ribosomaler Proteine ( $\alpha$ -Rpl3p) untersucht.

Diese Daten bestätigen, dass die Epitop-Markierung von Rpl4ap eine einfache Methode darstellt, die es ermöglicht, Ribosomen per Immunpräzipitation aus Zellextrakten anzureichern.

### 3.1.4 *Two-Hybrid-Analyse der Wechselwirkung von Rpl25p mit zytosolischen Chaperonen*

Beim Vergleich der mit dem HA-Epitop markierten *RPL25*-Stämme (3.1.3.1) wurde deutlich, dass die Region um Rpl25p, oder Rpl25p selbst, für den effizienten Verlauf der Translation wichtig sein muss. Während ein kurzer, wenig flexibler Epitop-tag, wie das 3HA-Epitop, die Translation beeinträchtigt, hat ein längerer, flexibler 6HA-tag an der selben Stelle keinen merklichen Einfluss auf diesen Prozess. Co-Präzipitationsversuche hatten gezeigt, dass der Translationsdefekt mit einer reduzierten Menge Ribosomen-assoziierten Ssb1/2p korreliert. Es konnte dabei jedoch nicht unterschieden werden, ob Ssb1/2p unmittelbar mit dem Ribosom, das heisst mit Rpl25p oder einer anderen, in direkter Nachbarschaft zum Polypeptid-Austrittstunnel liegenden, ribosomalen Untereinheit oder mit naszenten Ketten interagiert. Um sich einen Überblick zu verschaffen, ob und welche Chaperone direkt an Rpl25p binden, wurde die Assoziation ausgewählter zytosolischer Chaperone mit Rpl25p zunächst mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid*-Systems gezielt untersucht.

Dafür wurden die offenen Leserahmen der Gene *SSB1*, *SRP54*, *SSZ1*, *ZUO1*, *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* in den *Two-Hybrid*-Vektor pMM5 (pRS423-*GAL1-LexA-Myc*) und der codierende Bereich von *RPL25* in den entsprechenden Partnervektor pMM6 (pRS425-*GAL1-GAL4-HA*) kloniert. Die Expression der Fusionsproteine wurde im Westernblot mit entsprechenden spezifischen Antikörpern überprüft (Daten nicht gezeigt). Durch Transformation je zweier Plasmide in den *Two-Hybrid*-Hefestamm SGY37, wurde pMM6-*RPL25* mit jeweils einem der zu testenden Interaktionspartner (im pMM5-Vektorhintergrund) kombiniert. Der Stamm SGY37 enthält ein chromosomal integriertes Reporterkonstrukt bestehend aus dem LacZ-Gen und einer vorgeschalteten LexA-Operator-Sequenz. Dieses Reporterkonstrukt wird nur aktiviert, wenn die LexA-Bindedomäne und die Gal4p-Aktivierungsdomäne durch die direkte Interaktion der Fusionsproteine in direkte räumliche Nähe gebracht werden, wodurch ein intakter, aktiver Transkriptionsfaktor gebildet wird, der an die LexA-Operator-Sequenz binden kann. Die Aktivierung des Reporterkonstrukts wird auf X-Gal-haltigen Nährmedien durch Blaufärbung nachgewiesen (2.2.4.3).



**Abb. 3.13: Two-Hybrid-Analyse der Bindung zytosolischer Chaperone an Rpl25p**

Die direkte Interaktion zytosolischer Chaperone mit der ribosomalen Untereinheit Rpl25p wurde im *Two-Hybrid*-System untersucht. Dazu wurden die offenen Leserahmen der Gene *SSB1*, *SRP54*, *SSZ1*, *ZUO1*, *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* in das LexA-Plasmid pMM5, die codierende Sequenz von *RPL25* in den dazu kompatiblen *GAL4*-Vektor pMM6 kloniert und durch Transformation im Teststamm SGY37 jeweils paarweise kombiniert. Direkte Interaktion der Fusionsproteine führt zu einer Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigem Medium.

In Abb. 3.13 ist das Ergebnis dieser Two-Hybrid-Studie zusammengefasst. Ssb1p scheint tatsächlich direkt mit Rpl25p zu interagieren. Dasselbe gilt für Srp54p, eine Untereinheit des *Signal Recognition Particles*. Die Interaktion von Srp54p mit Rpl25p diente in diesem Experiment als Positivkontrolle. Pool et al. (Pool et al., 2002), hatten zuvor durch *in vitro* Crosslinking-Experimente gezeigt, dass gereinigtes Srp54p direkt mit L23a, der Rpl25p entsprechenden Untereinheit des Weizenkeim-Ribosoms, interagiert. Während Btt1p, eine Untereinheit des naszente Ketten-assoziierten Komplexes, NAC, direkt mit Rpl25p zu interagieren scheint, bewirkt die Kombination von Rpl25p mit den Untereinheiten des Ribosomen-assoziierten Komplexes, RAC, Ssz1p oder Zuo1p keine Blaufärbung der Hefen.

### 3.1.5 Bindestudien mit MBP-Rpl25p

Um das Ergebnis der *Two-Hybrid*-Studie zu validieren, wurde die Wechselwirkung zytosolischer Chaperone mit Rpl25p in Bindestudien untersucht. Dazu wurde Rpl25p als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* gereinigt und an einer Amylosematrix immobilisiert. Die Verwendung des immobilisierten Fusionsproteins ermöglicht die isolierte Betrachtung von Rpl25p außerhalb des Kontexts ganzer Ribosomen. Mit Rpl25p interagierende zytosolische Proteine wurden zunächst durch Co-Präzipitation mit MBP-Rpl25p aus Ganzzellextrakten isoliert.

#### 3.1.5.1 Expression und Reinigung von MBP-Rpl25p

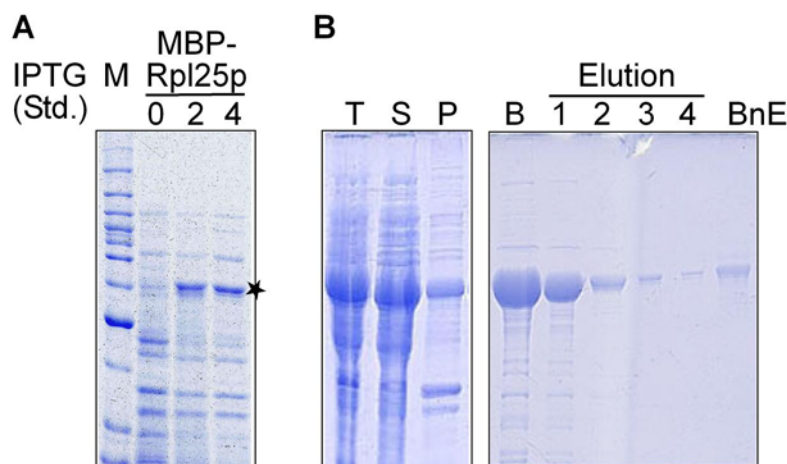
Um die direkte Wechselwirkung zytosolischer Chaperone mit Rpl25p durch Co-Präzipitation von Interaktionspartnern aus Ganzzellextrakten untersuchen zu können, sollte Rpl25p in nativer Form nach Expression in *E. coli* gereinigt und immobilisiert werden. Da Rpl25p als 6His-Fusion

(pJS35, vgl. Tab. 3.1) unter nativen Bedingungen größtenteils unlöslich war, wurden verschiedene Strategien verfolgt, die zu einer Verbesserung der Löslichkeit führen sollten.

Zum einen wurde versucht, den Anteil an löslichem 6His-Rpl25p durch Zugabe von Sarkosyl in den Lysispuffer zu erhöhen (Frankel et al., 1990). Dies hatte jedoch zur Folge, dass das nun lösliche 6His-Fusionsprotein nicht über den Affinitätstag, sondern unspezifisch an die Ni-NTA-Sepharose gebunden wurde, sodass es durch Imidazol nicht mehr von der Matrix eluiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass das mit Sarkosyl solubilisierete 6His-Rpl25p in einem unvollständig gefalteten Zustand vorliegt. Für die Untersuchung der Wechselwirkung von Chaperonen mit anderen Proteinen ist es jedoch von höchster Wichtigkeit, dass der potentielle Interaktionspartner in gefalteter Form vorliegt. Ist dies nicht der Fall, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Zustandekommen einer direkten Bindung auf einer Substraterkennung des fehlgefalteten Interaktionspartners durch das Chaperon beruht. Daher wurde diese Reinigungsstrategie nicht weiter verfolgt.

Mit der aminoterminalen Fusion des Maltose-Bindeproteins (MBP) aus *E. coli* an Rpl25p, wurde ein alternativer Affinitätstag getestet. Dieses in *E. coli* natürlich vorkommende Protein, bindet spezifisch und reversibel an Amylose. Es hat außerdem die Eigenschaft, die Löslichkeit daran fusionierter Proteine zu steigern. In vielen Fällen können Proteine, die unter Verwendung anderer Epitop-tags in *E. coli* in unlöslicher Form exprimiert werden, als MBP-Fusionen in löslicher, gefalteter Form aus den Zellen isoliert werden.

Der offene Leserahmen von *RPL25* wurde im Leseraster in einen pMalE-Fusions-Vektor kloniert (pJS81). Das Konstrukt wurde mittels Transformation in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS eingebracht und das Fusionsprotein nach Induktion mit 0,3 mM IPTG in Glukose-haltigem Medium exprimiert (Abb. 3.14). Der Glukose-Zusatz im Medium verhindert die Expression der *E. coli*-eigenen Amylasen, die später die Amylose-Affinitätsmatrix zerstören können. Nach 4 Std. Induktion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Löslichkeit des Fusionsproteins durch Zentrifugation des Totalextrakts untersucht (2.2.3.11).



### Abb. 3.14: Expression und Reinigung von MBP-Rpl25p

(A) Die Expression von MBP-Rpl25p wurde zum Zeitpunkt 0 mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach 0, 2 und 4 Std. wurden Proben genommen und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Der Stern markiert die Expressionsbande. (B) Löslichkeit von MBP-Rpl25p und Bindung an die Amylosematrix. Proben des Totalextrakts (T), der löslichen (S) und unlöslichen Fraktion (P) nach Zentrifugation, sowie des gebundenen Fusionsproteins (B), der Elutionsschritte (Elution 1,2 ,3 ,4) und der Matrix nach Elution (BnE) wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

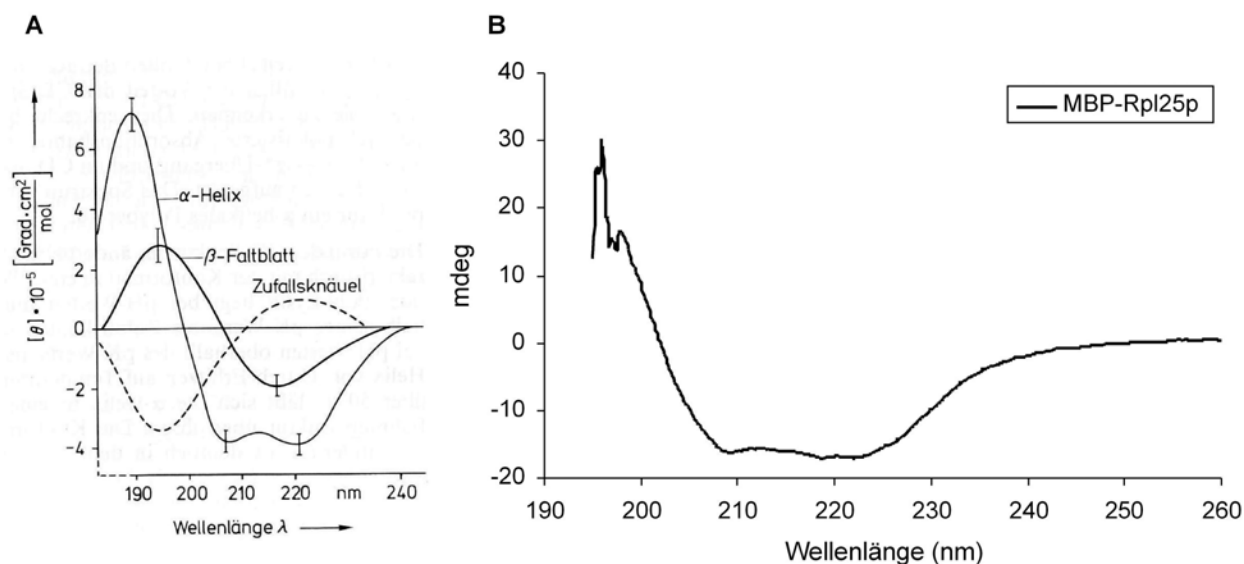
Tatsächlich trug der MBP-tag stark zur Löslichkeit von Rpl25p bei. Im Gegensatz zur 6His-markierten Variante, fanden sich ca. 80% des in *E. coli* produzierten MBP-Rpl25p nach Aufschluss und Zentrifugation in der löslichen Fraktion. Das Fusionsprotein konnte effizient an die Amylose-Matrix gebunden und auch wieder vollständig davon eluiert werden (Abb. 3.14).

Das von der Matrix eluierte Fusionsprotein wurde in der Abteilung Bioorganische Chemie (Prof. Moroder, MPI für Biochemie) per CD-Spektroskopie bezüglich seines Faltungszustands untersucht.

### 3.1.5.2 Überprüfung des Faltungszustandes von MBP-Rpl25p

Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts polarisiertem Licht. Peptidbindungen weisen im Bereich des fernen UV (180-250 nm) in Abhängigkeit ihrer Sekundärstrukturen einen zirkularen Dichroismus auf. Dies ermöglicht, die Sekundärstrukturanteile von Proteinen zu berechnen und somit den Faltungszustand von Proteinen zu bestimmen.

In Abb. 3.15A sind Referenz-Spektren für die am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturen gezeigt (Greenfield and Fasman, 1969). Proteine, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen oder unstrukturierten Bereichen aufgebaut sind, lassen sich anhand ihrer charakteristischen Kurven leicht unterscheiden.



**Abb. 3.15: Fernes UV CD Spektrum von MBP-Rpl25p**

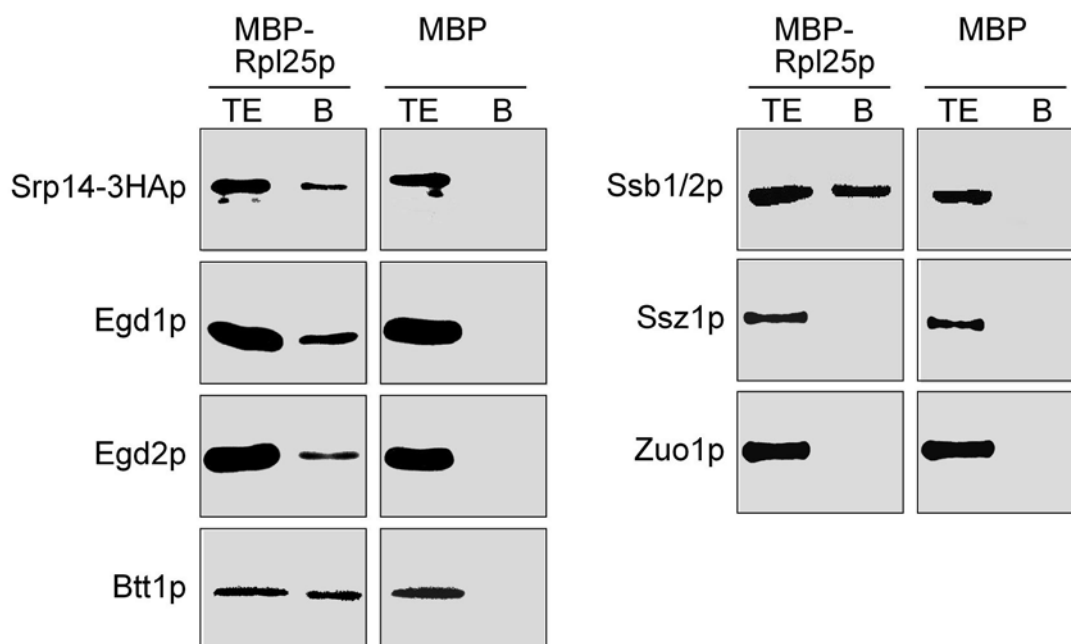
(A) Darstellung typischer CD-Spektren für die wichtigsten Strukturelemente ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und unstrukturierte Proteine (Galla, 1988)). (B) Die Konformation des MBP-RPL25p-Fusionsproteins wurde per CD-Spektroskopie untersucht (Service der Abt. Bioorganische Chemie, MPI für Biochemie, Martinsried).

Aus dem Vergleich dieser Standardkurven und eines Referenzspektrums für gereinigtes MBP (Daten nicht gezeigt) mit dem für das Fusionsprotein erhaltene Spektrum (Abb. 3.15B) geht hervor, dass das MBP-Rpl25p hauptsächlich  $\alpha$ -helikal aufgebaut ist. Es liegt also in löslicher, gefalteter Form vor und erfüllt damit eine wichtige Voraussetzung für seine Verwendung in Bindeexperimenten mit zytosolischen Chaperonen.

### 3.1.5.3 Bindestudien im Zellextrakt

Um sich einen Überblick über die Interaktionspartner von Rpl25p im Zytosol zu verschaffen, wurden zunächst Bindeexperimente mit immobilisiertem MBP-Rpl25p und Ganzzellextrakten durchgeführt. Dafür wurden gereinigtes MBP-Rpl25p, bzw. MBP als Kontrolle, an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (2.2.3.14). Dies hat den Vorteil, dass sie bei der späteren Analyse der co-präzipitierten Proteine per Coomassie-Färbung oder Westernblot nicht in Erscheinung treten, da sie auch nach Erhitzen der Proben an die Matrix gebunden bleiben.

Ganzzellextrakte des Hefestammes JSY26 (*SRP14-3HA*), der die Detektion von Srp14p, einer Untereinheit des *Signal Recognition Particles*, erlaubt, wurden für ca. 2 Std. mit je  $5 \mu\text{M}$  immobilisiertem MBP-Rpl25p bzw. MBP inkubiert. Nach dem Waschen wurden gebundene Proteine durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und im Westernblot mit spezifischen Antikörpern analysiert (2.2.3.16).



**Abb. 3. 16: Co-Präzipitation zytosolischer Proteine aus Zellextrakten mit Rpl25p**

Ganzzellextrakte des Hefestammes JSY26 (*SRP14-3HA*) wurden für 2 Std. mit 5  $\mu$ M immobilisiertem MBP-Rpl25p, bzw. MBP als Kontrolle, inkubiert. An die Matrix gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und nach SDS-PAGE und Westernblot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

Im Wesentlichen konnten die Ergebnisse der *Two-Hybrid*-Studie (3.1.4) durch die Bindestudien im Zellextrakt bestätigt werden (Abb. 3.16). Sowohl der *Signal Recognition Particle*, repräsentiert durch Srp14p, als auch der naszente Ketten-assoziierte Komplex, NAC, interagieren spezifisch mit MBP-Rpl25p. Darüber hinaus konnte im Zellextrakt gezeigt werden, dass nicht nur Btt1p, sondern auch die anderen Untereinheiten von NAC, Egd1p und Egd2p mit Rpl25p assoziiert sind.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit der *Two-Hybrid*-Studie, konnte Ssb1/2p an der Rpl25p-Matrix nachgewiesen werden. Jedoch co-präzipitierten weder Ssz1p, noch Zuo1p unter diesen Bedingungen mit Rpl25p. Die Bindung von Ssb1/2p scheint somit unabhängig von RAC stattzufinden. Dies steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass RAC für die Rekrutierung von Ssb1/2p an die Ribosomen, bzw. die naszente Kette verantwortlich ist (Gautschi et al., 2002), würde jedoch die Vermutung unterstützen, dass der Translationsdefekt durch das Anhängen eines 3HA-tags an Rpl25p durch eine verminderte Assoziation von Ssb1/2p mit den Ribosomen verursacht wird (vgl. Abb. 3.10).

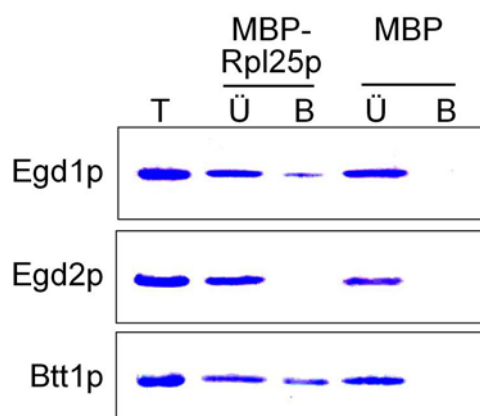
Dies könnte bedeuten, dass obwohl Ssb1/2p mit Rpl25p assoziiert ist, eine andere ribosomale Untereinheit für die Bindung des Ribosomen assoziierten Komplexes RAC verantwortlich ist. Diese Möglichkeit wurde jedoch nicht weiter untersucht.



### 3.1.5.4 Bindeexperimente mit gereinigten Komponenten

Um herauszufinden, welche Untereinheit von NAC für die Bindung des Komplexes an Rpl25p verantwortlich ist, wurden Bindeexperimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Dazu wurden die Untereinheiten von NAC, Egd1p, Egd2p und Btt1p als 6His-Fusionen einzeln in *E. coli* exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und durch Dialyse renaturiert (2.2.3.10.7). Die auf diese Weise renaturierten Proteine waren funktionell, da sie *in vitro* in der Lage waren, zu Komplexen zu assemblieren. Außerdem konnten sie, sowohl einzeln als auch als Komplex, die Aggregation denaturierter Proteine *in vitro* verhindern (Daten nicht gezeigt).

Für die Bindeexperimente wurden je 5  $\mu\text{M}$  gereinigtes Egd1p, Egd2p oder Btt1p mit äquimolaren Mengen immobilisiertem MBP-Rpl25p, bzw. MBP vermischt und 2 Std. bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Proteine durch Waschen, wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und gebundene Proteine durch Erhitzen von der Matrix eluiert. Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 3.17).



**Abb. 3. 17: Bindung gereinigter NAC-Untereinheiten an Rpl25p *in vitro***

Je 5  $\mu\text{M}$  gereinigtes Egd1p, Egd2p oder Btt1p wurden 2 Std. bei 4°C mit 5  $\mu\text{M}$  immobilisiertem MBP-Rpl25p, bzw. MBP inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer von der Matrix eluiert und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

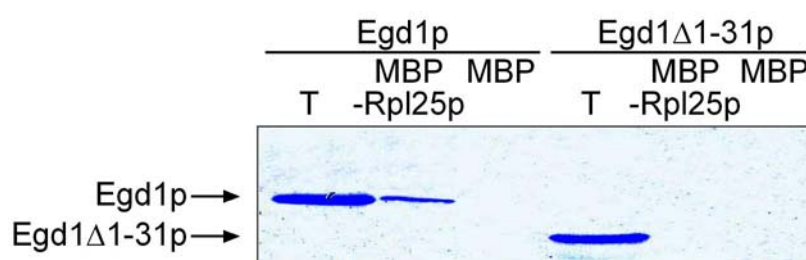
Während Egd1p und Btt1p an Rpl25p binden, wurde keine direkte Wechselwirkung zwischen Egd2p und dem ribosomalen Protein festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von NAC an Rpl25p durch die  $\beta$ -Untereinheiten Egd1p und Btt1p vermittelt sein muss, da nur diese Proteine in der Lage sind, direkt mit Rpl25p zu interagieren.

Die Frage, welcher Teil der  $\beta$ -Untereinheiten für die spezifische Bindung an Rpl25p verantwortlich ist, konnte für Egd1p eindeutig beantwortet werden. Dabei wurde der Umstand genutzt, dass bei der Reinigung von Egd1p unter bestimmten Umständen wiederholt das Auftreten eines definierten Abbauproduktes beobachtet werden konnte, das im Gegensatz zu Egd1p nicht mit Rpl25p wechselwirkt. Die Sequenzierung dieses Abbauproduktes (Service der Abteilung Proteinanalytik, Prof. Lottspeich, MPI für Biochemie) ergab, dass es sich hierbei um

ein Fragment von Egd1p handelt, das gegenüber dem Volllängeprotein N-terminal um 31 Aminosäuren verkürzt ist.

Dieses Fragment wurde kloniert (pSI449), als 6His-Fusion in *E. coli* exprimiert, entsprechend Egd1p unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer renaturiert (2.2.3.10.7).

In einem weiteren Bindeexperiment konnte gezeigt werden, dass diese verkürzte Version von Egd1p (Egd1 $\Delta$ 1-31p) nicht mehr in der Lage ist, an immobilisiertes MBP-Rpl25p zu binden (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Die Bindung von Egd1p an Rpl25p wird durch den N-Terminus von Egd1p vermittelt.**

Je 5  $\mu$ M gereinigtes Egd1p, oder Egd1 $\Delta$ 1-31p wurden 2 Std. bei 4°C mit 5  $\mu$ M immobilisiertem MBP-Rpl25p, bzw. MBP inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer von der Matrix eluiert und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Dies bedeutet, dass die Bindung von Egd1p an Rpl25p durch den N-Terminus des Proteins vermittelt wird.

Obwohl bei der Reinigung von Btt1p kein entsprechendes Fragment beobachtet werden konnte, kann aufgrund des Vergleichs der Abfolge der ersten 31 Aminosäuren von Egd1p und Btt1p (Abb. 3.19), der verdeutlicht, wie konserviert die N-Termini dieser Proteine sind, angenommen werden, dass auch die Bindung von Btt1p über den Aminoterminus vermittelt ist. Dies wurde jedoch nicht experimentell überprüft.

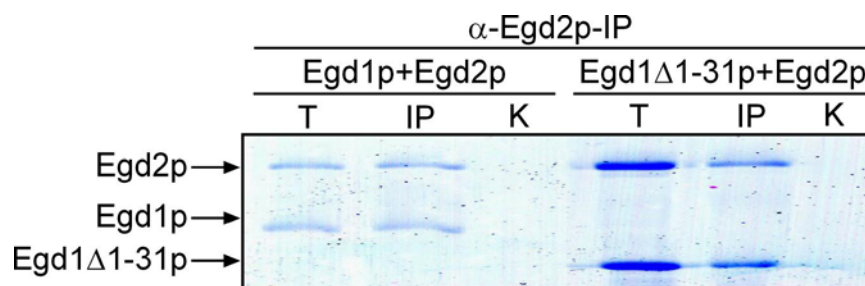
Egd1p (1-31)	MPIDQEKLAKLQKLSANNKVGGRTRKLNKK	30
	MP+DQEKLAKL KLSA NKVGGRTRK+NKK	
Btt1p (1-31)	MPVDQEKLAKLHKLSAANKVGGRTRKINKK	30

**Abb. 3.19: Sequenzvergleich der 30 N-terminalen Aminosäuren von Egd1p und Btt1p**

Die ersten 31 Aminosäuren der Proteinsequenz von Egd1p und Btt1p wurden mit Hilfe des Protein-Protein BLAST-Programms, blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)), verglichen. Die mittlere Zeile verdeutlicht Übereinstimmungen zwischen den gegenübergestellten Sequenzen. Leerstellen bezeichnen nicht übereinstimmende Aminosäuren, + bezeichnet unterschiedliche, aber ladungsgleiche Aminosäuren.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Fehlen des N-terminus von Egd1p die Interaktion mit Egd2p nicht beeinträchtigt. Dazu wurden gereinigtes Egd1p, bzw. Egd1 $\Delta$ 1-31p mit äquimolaren Mengen gereinigtem Egd2p vermischt und Egd2p mit Hilfe ProteinA-Sepharosegekoppelter spezifischer Antikörper präzipitiert (2.2.3.17.2). Als Kontrolle wurde das Proteingemisch entsprechend mit ungekoppelter ProteinA-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine

wurden durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 3.20).



**Abb. 3. 20: Co-Präzipitation gereinigter NAC-Komponenten**

Äquimolare Mengen gereinigtes, renaturiertes Egd1p, bzw. Egd1 $\Delta$ 1-31p und Egd2p wurden vermischt und Egd2p mit Hilfe immobilisierter  $\alpha$ -Egd2p-Antikörper präzipitiert. Proben des Totalproteins (T), der immunpräzipitierten Proteine (IP) und einer Kontroll-IP mit ungekoppelter ProteinA-Sepharose (K) wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Sowohl Egd1p, als auch Egd1 $\Delta$ 1-31p binden in einen 1:1-Verhältnis an Egd2p. Damit ist zum einen gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen Egd1p und Egd2p durch den C-Terminus von Egd1p vermittelt sein muss, da die Verkürzung von Egd1p um die ersten 31 Aminosäuren keinen Einfluss auf diese Interaktion hat. Zum anderen belegt dieses Experiment nochmals die Funktionalität der gereinigten, renaturierten Proteine.

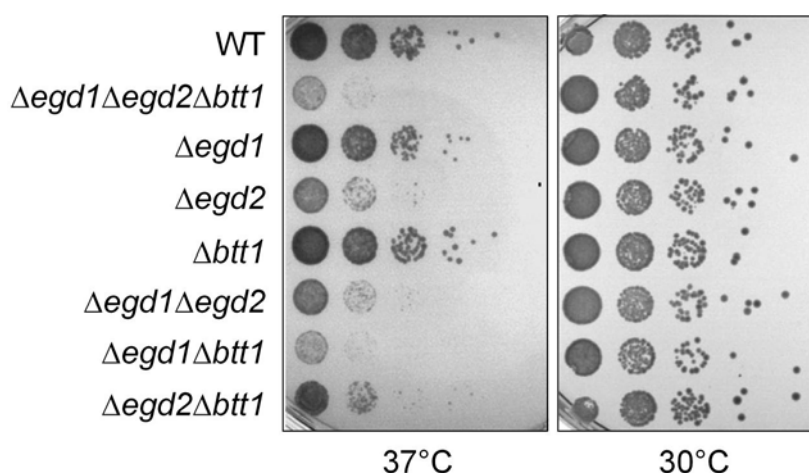
### 3.1.6 Untersuchung der Bedeutung von Btt1p

Im Anschluss sollte die Frage beantwortet werden, welche Rolle Btt1p innerhalb des Komplexes spielt. Btt1p ist eine alternative  $\beta$ -Untereinheit von NAC, die nur in der Bäckerhefe vorkommt (vgl. 1.2.1). Da die ersten 76 Aminosäuren von Egd1p und Btt1p zu 72% homolog sind und beide Proteine starke Ähnlichkeit mit dem humanen  $\beta$ -NAC-Homolog BTF3 haben, geht man davon aus, dass *BTT1* ursprünglich aus einer Genduplikation von *EGD1* entstanden ist (Hu and Ronne, 1994). Wie bereits erwähnt (vgl. 3.1.1.3), unterscheiden sich beide Proteine hauptsächlich im Carboxy-terminalen Bereich und es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine direkt mit Ribosomen, bzw. der ribosomalen Untereinheit Rpl25p interagieren (Abb. 3.17). Es bleibt jedoch unklar, welchen Stellenwert Btt1p innerhalb NACs einnimmt.

#### 3.1.6.1 Analyse des Phänotyps von Deletionsmutanten

Um Aufschluss über die Wichtigkeit und das Zusammenspiel der einzelnen NAC-Untereinheiten zu erhalten, wurden zunächst Deletionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Gene *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* einzeln, paarweise in verschiedenen Kombinationen, oder schliesslich alle 3 Gene zusammen deletiert. Das Wachstum der Mutanten wurde bei permissiver (30°C) und

erhöhter (37°C) Temperatur getestet. Dazu wurden die entsprechenden Hefestämme in 10-fachen seriellen Verdünnungen auf Vollmedium-Platten aufgebracht und 2 Tage bei entsprechender Temperatur inkubiert (Abb. 3.21).



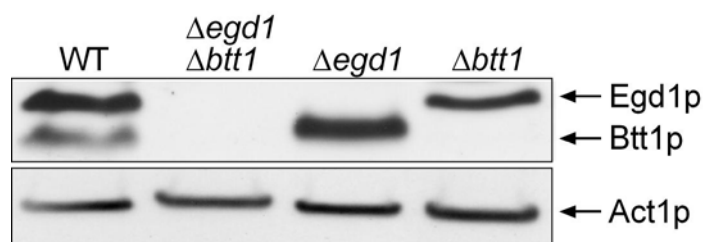
**Abb. 3. 21: Analyse des Wachstums von NAC-Deletionsmutanten bei verschiedenen Temperaturen**

10-fache serielle Verdünnungen der Hefestämme YPH499 (WT), KSY303-5 ( $\Delta egd1\Delta egd2\Delta btt1$ ), KSY255 ( $\Delta egd1$ ), KSY256 ( $\Delta egd2$ ), KSY254 ( $\Delta btt1$ ), KSY283 ( $\Delta egd1\Delta egd2$ ), KSY270 ( $\Delta egd1\Delta btt1$ ) und KSY271 ( $\Delta egd2\Delta btt1$ ) wurden auf Vollmedium verglichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C, bzw. 37°C inkubiert.

Alle getesteten Stämme zeigten bei 30°C normales Wachstum. Defekte wurden erst bei erhöhter Inkubationstemperatur sichtbar. Dabei verursachte das Fehlen des gesamten Komplexes den stärksten Defekt. Auch die Deletion der  $\alpha$ -NAC-Untereinheit *EGD2* führte zu einer Beeinträchtigung des Wachstums, wogegen das Fehlen einer der  $\beta$ -Untereinheiten *EGD1* oder *BTT1* keinen Effekt hatte. Dies deutet darauf hin, dass ein funktioneller NAC-Komplex aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen muss, und die beiden  $\beta$ -Untereinheiten funktionell redundant sind. Damit im Einklang steht die Beobachtung, dass das gleichzeitige Fehlen beider  $\beta$ -Untereinheiten den gleichen temperatursensitiven Phänotyp erzeugt, wie ein kompletter Ausfall des Komplexes ( $\Delta egd1\Delta egd2\Delta btt1$ ).

### 3.1.6.2 Analyse der Expression der $\beta$ -Untereinheiten

Ein weiteres Indiz für die Redundanz der  $\beta$ -Untereinheiten, liefert ein Vergleich der Expressionslevels von *EGD1* und *BTT1* (Abb. 3.22). Für diesen Test wurden gleiche Mengen Gesamtzellextrakt der Stämme YPH499 (WT), KSY270 ( $\Delta egd1\Delta btt1$ ), KSY446 ( $\Delta egd1$ ) und KSY247 ( $\Delta btt1$ ) mittels SDS-PAGE auf 15% Tris-Tricin-Gelen aufgetrennt und die Proteine nach Westernblot mit einem  $\beta$ -NAC spezifischen Antikörper (vgl. 3.1.1.3) detektiert. Durch die Inkubation der Membran mit einem  $\alpha$ -Aktin-Antikörper (Act1p) wurde überprüft, dass in allen Spuren äquivalente Mengen Zellextrakt enthalten sind.



**Abb. 3. 22: Vergleich der Expressionslevels von *EGD1* und *BTT1* in verschiedenen Hefestämmen**

Die Abundanz von Egd1p und Btt1p wurde in Zellextrakten der Hefestämme YPH499 (WT), KSY270 ( $\Delta egd1 \Delta btt1$ ), KSY446 ( $\Delta egd1$ ) und KSY247 ( $\Delta btt1$ ) verglichen. Dazu wurden gleiche Mengen Zellextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Membran nach Westernblot mit einem  $\beta$ -NAC-spezifischen Antikörper inkubiert. Durch Inkubation der Membran mit einem  $\alpha$ -Aktin-Antikörper wurden die Proteinmengen in den Spuren verglichen.

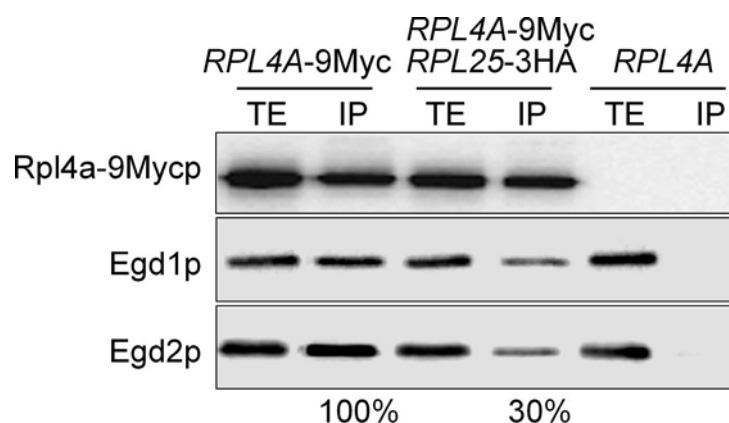
Unter normalen Bedingungen, im Wildtyp, ist Btt1p deutlich weniger abundant als Egd1p. Im  $\Delta egd1$ -Stamm dagegen, ist die Expression von Btt1p gegenüber der Wildtyp-Situation stark erhöht. Es scheint somit wahrscheinlich, dass Egd1p die hauptsächlich im Komplex vorliegende  $\beta$ -Untereinheit darstellt. Die Zelle ist jedoch in der Lage, den Verlust von Egd1p durch vermehrte Expression von Btt1p zu kompensieren.

### 3.1.7 Untersuchung der Bindung von NAC an Rpl25-3HAp

Um die Analyse der Wechselwirkung zwischen Rpl25 und NAC abzuschließen, wurde die Co-Präzipitation von NAC im *RPL25*-3HA-Stamm untersucht. Da Rpl25p als Bindestelle für NAC dient, ist es wahrscheinlich, dass der kurze 3HA-Epitop-tag, wie im Fall von Ssb1/2p (3.1.3.1.2), zu einer Reduktion der Menge an gebundenem NAC gegenüber dem Wildtyp-Stamm führt.

Um dies zu testen, wurden Ganzzellextrakte aus den Hefestämmen JSY33 (*RPL4a*-9Myc), JSY45 (*RPL25*-3HA, *RPL4a*-9Myc) und dem Wildtyp-Stamm YPH499 hergestellt und Ribosomen über das 9Myc-Epitop an Rpl4ap präzipitiert. Der Wildtyp-Stamm diente dabei als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation.

Gleiche Mengen der Zellextrakte und der Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit Egd1p- und Egd2p-spezifischen Antikörpern bezüglich der Co-Präzipitation von NAC-Untereinheiten untersucht. Durch Inkubation mit  $\alpha$ -Myc-Antikörpern wurde die Vergleichbarkeit der Proteinmengen kontrolliert. Die im Westernblot detektierten Signale wurden mittels AIDA-Software quantifiziert und der für die Co-Präzipitation von Egd1p und Egd2p im *RPL4a*-9Myc-Hintergrund erhaltene Wert, der in diesem Fall der Wildtyp-Situation entspricht, auf 100% gesetzt (Abb. 3.23).



**Abb. 3. 23: Co-Präzipitation von NAC im *RPL25-3HA*-Hintergrund**

Ribosomen wurden mit  $\alpha$ -Myc-Sepharose über das 9Myc-Epitop an Rpl4ap aus Ganzzelextrakten der Stämme JSY33 (*RPL4a-9Myc*), JSY45 (*RPL25-3HA*, *RPL4a-9Myc*) und YPH499 präzipitiert. Proben des Totalextrakts (TE) und des Immunpräzipitats (IP) wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit entsprechenden spezifischen Antikörpern bezüglich der Präzipitation von Rpl4ap und der Co-Präzipitation von NAC-Untereinheiten (Egd1p, Egd2p) untersucht. Die Menge Co-präzipitierter Proteine wurde mittels AIDA-Software quantifiziert.

Tatsächlich wird auch die Wechselwirkung von NAC mit Ribosomen durch den 3HA-tag an Rpl25p stark beeinflusst. Es kommt zu einer ca. 70%-igen Reduktion der Co-Präzipitation von Egd1p und Egd2p im *RPL25-3HA*-Hintergrund, im Vergleich zur Wildtyp-Situation (*RPL4a-9Myc*).

Somit konnte gezeigt werden, dass Rpl25p als Bindestelle für den nascente Ketten-assoziierten Komplex (NAC) dient. Die Bindung von NAC wird durch den Aminoterminus der funktionell redundanten  $\beta$ -Untereinheiten Egd1p und Btt1p vermittelt, wobei Egd1p die hauptsächlich im Komplex vorliegende  $\beta$ -Untereinheit darstellt. Vergleichbar mit den Daten bezüglich der Assoziation von Ssb1/2p, das ebenfalls mit Rpl25p interagiert und dessen Bindung durch ein 3HA-Epitop an Rpl25p negativ beeinflusst wird (3.1.3.1.2), kommt es auch im Fall von NAC unter diesen Bedingungen zu einer Reduktion der Bindung, die wahrscheinlich durch sterische Effekte des kurzen, unflexiblen Epitops hervorgerufen wird.

### 3.1.8 Charakterisierung der Bindestelle auf Rpl25p

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Rpl25p als Bindestelle für zytosolische Chaperone, wie NAC und Ssb1/2p dient und die Interaktionsregion von NAC auf den Aminoterminus der  $\beta$ -Untereinheiten eingegrenzt wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, welcher Bereich von Rpl25p für diese Interaktion verantwortlich ist.

Als Anhaltspunkt dienten dabei Veröffentlichungen, die sich mit Rl23p, dem *E. coli* Homolog von Rpl25p, beschäftigen. In diesen Studien wurde zum einen gezeigt, dass Rl23p die Bindestelle für Triggerfaktor, eine Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase mit generellen Chaperoneigenschaften darstellt. Diese Bindestelle konnte durch die Analyse gezielter Mutationen auf

eine definierte Region, sowohl von Triggerfaktor, als auch des ribosomalen Proteins eingegrenzt werden, wobei auf der ribosomalen Seite ein Glutaminsäurerest an Position 18 (E18) für die Interaktion von Rl23p mit Triggerfaktor ausschlaggebend ist (Kramer et al., 2002). Zum anderen konnte, in Übereinstimmung mit Daten aus dem eukaryotischen System, die belegen, dass der *Signal Recognition Particle* über Srp54p direkt mit Rpl25p interagiert (Pool et al., 2002), gezeigt werden, dass das bakterielle SRP-Homolog Ffh (für *Fifty-four homologue*) an Rl23p bindet. Dabei scheint Ffh mit Triggerfaktor um die gleiche Bindestelle zu kompetitieren, da Triggerfaktor *in vitro* durch einen Überschuss an Ffh fast vollständig vom *E. coli*-Ribosom verdrängt werden kann. (Ullers et al., 2003).

Die ribosomalen Proteine Rpl25p und Rl23p scheinen daher funktionell stark konserviert zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass die in *E. coli* identifizierte Binderegion um E18 auch bei der Assoziation zytosolischer Faktoren mit eukaryotischen Ribosomen eine wichtige Rolle spielen könnte.

### 3.1.8.1 Komplementation von *RPL25* durch *RL23* aus *E. coli*

Um sich einen Überblick über den Grad der Konservierung zwischen Rl23p aus *E. coli* und seinem Hefe-Homolog Rpl25p zu verschaffen, wurden zunächst die Aminosäuresequenzen beider Proteine gegenübergestellt. Dabei wurden die Sequenzen solchermaßen aneinandergelagert, dass sich möglichst viele Übereinstimmungen ergaben. Dieser direkte Vergleich zeigte, dass sich Rpl25p hauptsächlich durch einen N-terminalen Anhang von 50 Aminosäuren, der in Rl23p nicht vorhanden ist, von seinem *E. coli* Gegenpart unterscheidet (Abb. 3.24).

L23	1	-----MIREERL--L
L25	1	MAPSAKATAAKKAVVKG TNGKKALKVRTSATFRLPKTLKLARAPKYASKAVPHYNRLDSY
L23	9	KVLRAPHVSEKASTAMEKSNITVLKVAKDATKAETKAAVQKLEFEVEVEVNTLVVKGVK
L25	61	KVLEQPI TSE T AMKKVEDGNILVFOVSMKANKYQIKKAVKELYEVDVLKVN TLV-----
L23	69	RHGQRIGRRSDWKKAYVTLKEGQNLD FVGGAE-----
L25	115	-----RPNGTKKAYVRLT--ADYDALDIANRIGYI

**Abb. 3. 24: Vergleich der Aminosäuresequenz von Rl23p (*E. coli*) und Rpl25p (*S. cerevisiae*)**

Die Aminosäuresequenzen von Rl23p (L23) und Rpl25p (L25) wurden zum direkten Vergleich so aneinandergelagert, dass Gemeinsamkeiten in der Aminosäureabfolge hervorgehoben wurden. Schwarz hinterlegte Bereiche markieren identische Aminosäuren, grau hinterlegte Bereiche unterschiedliche, aber ladungsgleiche Aminosäuren. Striche markieren Positionen an denen sich in der jeweiligen Sequenz keine Aminosäure befindet.

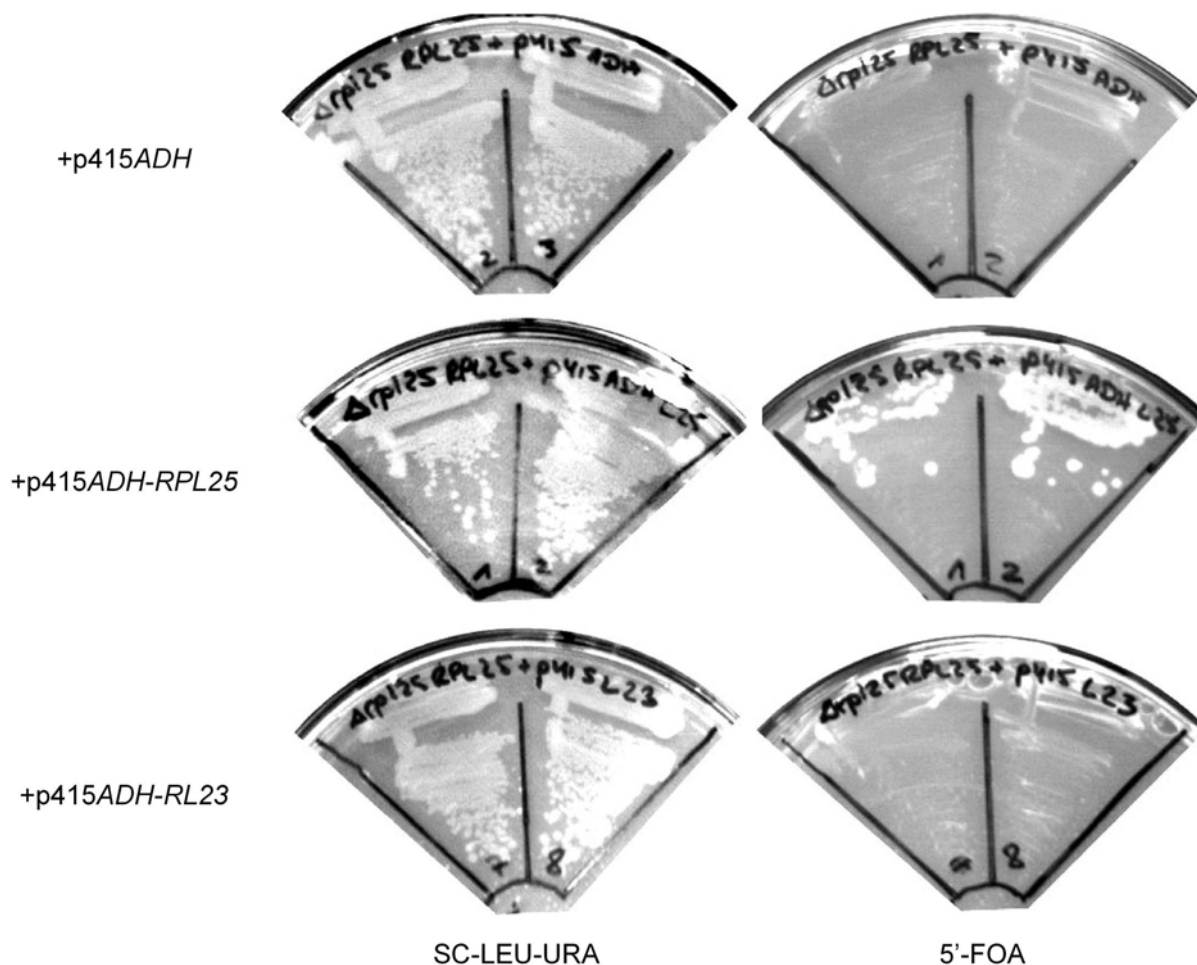
Der homologe Bereich (As 51-136 in der Rpl25p-Sequenz) weist ca. 43% identische Aminosäuren mit Rl23p auf. Die für die Bindung von Triggerfaktor verantwortliche Region in Rl23p, sowie die entsprechenden Reste in Rpl25p, sind durch einen roten Rahmen in der Sequenz hervorgehoben. Es wird deutlich, dass auch dieses Aminosäure-Triplett konserviert ist.

Der Glutaminsäurerest (E), der in Rl23p für die Bindung von Triggerfaktor essentiell ist, ist auch in Rpl25p vorhanden. Es kann daher angenommen werden, dass Rl23p die Funktion von Rpl25p in der Hefe übernehmen können sollte.

*RPL25* ist ein essentielles, das heißt lebenswichtiges Gen. Der Verlust des Gens oder dessen Funktion führt zum Tod der Zelle. Daher musste für den Komplementationsversuch zunächst ein sogenannter „*shuffle*-Stamm“ für *RPL25* hergestellt werden. Dazu wurde der offene Leserahmen des Gens unter der Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors in ein Plasmid kloniert, das außerdem den *URA3*-Selektionsmarker codiert (pJS39). Dieses wurde durch Transformation in den haploiden Wildtyp-Stamm YPH499 eingebracht. In einem zweiten Schritt wurde die einzige chromosomale Kopie des *RPL25*-Gens durch eine PCR-generierte lox*PHIS5*loxP-Deletionskassette ersetzt (2.2.1.11.2). Das Überleben des resultierenden *shuffle*-Stamms (JSY21) ist somit von der verbleibenden, Plasmid-codierten Genkopie von *RPL25* abhängig.

Für den Komplementationsversuch per Plasmid-*shuffle* (2.2.1.12) wurden außerdem Plasmide hergestellt, in denen das *RPL25*- (pJS40), bzw. das *RL23*-Gen (pJS41) ebenfalls unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors stehen, die jedoch, im Gegensatz zu pJS39, den *LEU2*-Selektionsmarker codieren. Jedes dieser Plasmide, sowie das Ausgangsplasmid p415*ADH*, wurden einzeln durch Transformation in den *RPL25*-*shuffle*-Stamm JSY21 eingebracht. Somit wurden Hefestämme generiert, die je ein p416*ADH-RPL25*-Plasmid (*URA3*), in Kombination mit entweder p415*ADH* (*LEU2*) als Negativ-Kontrolle, mit p415*ADH-RPL25*, als Positiv-Kontrolle, oder mit p415*ADH-RL23* enthalten. Positive Transformanden wurden auf SC-LEU-URA-Platten identifiziert und vereinzelt. Inkubation dieser Stämme auf 5'-FOA-haltigem Medium führte zum Verlust des *URA3*-Plasmids, womit der Effekt des Gens auf dem in der Zelle verbleibenden *LEU2*-Plasmid sichtbar wurde (Abb. 3.25).



$\Delta rpl25/p416ADH-RPL25$ 

**Abb. 3. 25: Komplementation der Deletion von *RPL25* durch *RL23* in *S. cerevisiae***

Der *RPL25-shuffle*-Stamm JSY21 wurde mit Plasmiden transformiert, die neben dem *LEU2*-Marker verschiedene zu testende Gene unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors codieren (p415*ADH*, p415*ADH-RPL25*, p415*ADH-RL23*). Das Wachstum dieser Hefestämme wurde auf SC-LEU-URA und auf 5'-FOA-haltigem Medium verglichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

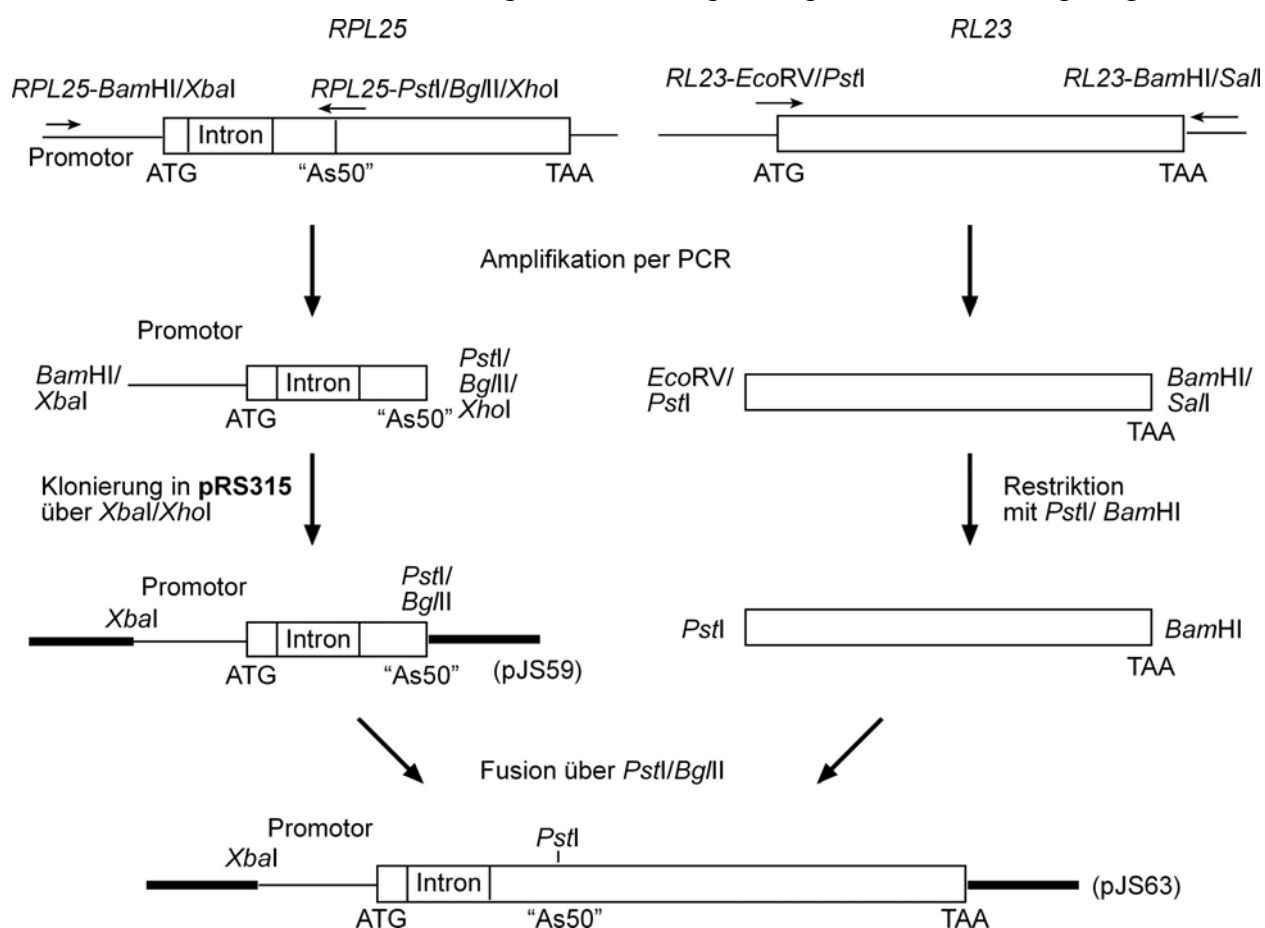
Während alle Stämme in der Lage sind, auf Leucin-Uracil-Mangelmedium zu wachsen (Abb. 3.25, linke Seite), wird nach Verlust der auf dem *URA3*-Plasmid codierten Genkopie von *RPL25* auf 5'-FOA-haltigem Medium deutlich, dass *RL23* aus *E. coli* die Funktion des Hefegens nicht komplementieren kann (Abb. 3.25, rechte Seite). Nur die Positiv-Kontrolle, das heisst der Stamm, der das *RPL25*-codierende *LEU2*-Plasmid (p415*ADH-RPL25*, pJS40) enthält kann auf 5'-FOA-haltigem Medium überleben.

### 3.1.8.2 Konstruktion eines chimären Fusionsproteins

Wie bereits erwähnt (3.1.7.1), unterscheiden sich Rpl25p und Rl23p hauptsächlich durch einen 50 Aminosäuren langen, N-terminalen Anhang an Rpl25p. Dieser Bereich, der bei bakteriellen Homologen nicht vorkommt (Raue et al., 1989), enthält zwei Kernlokalisationssequenzen (As 12-16 und As 21-25), die zwar nicht essentiell, aber für die volle Funktionsfähigkeit von

Rpl25p wichtig sind. Mutanten, denen die ersten 41 Aminosäuren fehlen, sind lebensfähig, haben jedoch eine extrem niedrige Wachstumsrate, zeigen eine stark veränderte Zellmorphologie und haben Translationsdefekte (Schaap et al., 1991). Es konnte gezeigt werden (van Beekvelt et al., 2001), dass dieser Bereich des Proteins außerdem für das effiziente Prozessieren der (pre-)rRNA, einen essentiellen Schritt bei der Ribosomen-Biogenese, durch den die im Ribosom vorkommenden rRNAs (18S, 5,8S und 25S) aus einem 35S Vorläufermolekül gebildet werden, wichtig ist. Es ist also möglich, dass Rl23p aus *E. coli* die Funktion des Hefeproteins nicht übernehmen kann, weil dieser funktionelle Bereich fehlt.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein chimäres Protein aus Rpl25p und Rl23p konstruiert, indem die ersten 50 Aminosäuren von Rpl25p N-terminal an Rl23p fusioniert wurden. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.26 gezeigt.



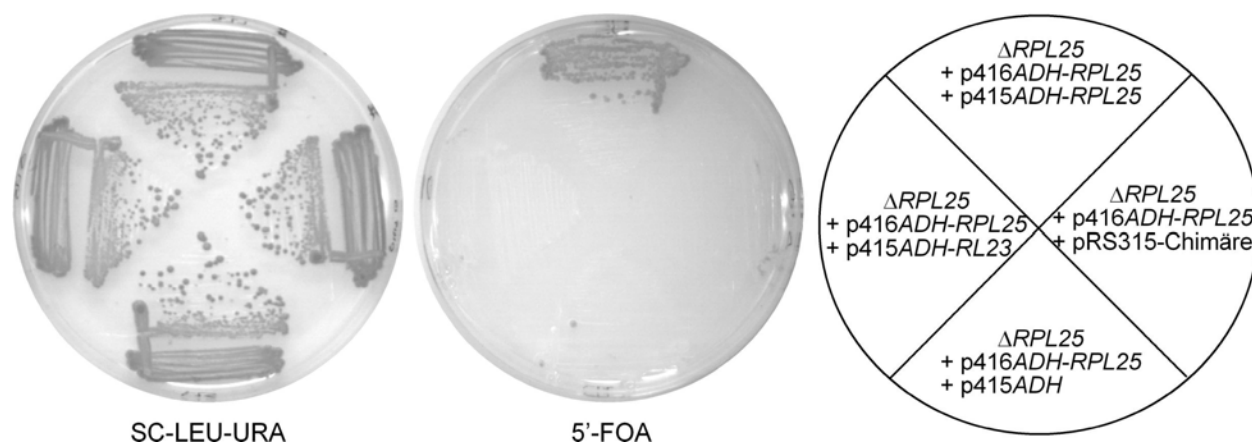
**Abb. 3. 26: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Fusion von *RPL25* und *RL23***

Durch Kombination verschiedener PCR-Produkte wurde ein Fusionskonstrukt aus *RPL25* und *RL23* hergestellt, das die N-terminalen 50 Aminosäuren von Rpl25p und das gesamte Rl23p-Protein unter der Kontrolle des nativen *RPL25*-Promotors codiert. Dünne Pfeile kennzeichnen die Position spezifischer Oligonukleotidprimer. Die Bezeichnungen der Plasmide, die Zwischen- oder Endprodukte darstellen, sind in Klammern angegeben. (ATG) Start-Codon, (TAA) Stop-Codon, („As50“) bezeichnet das für die 50. Aminosäure von Rpl25p codierende Codon. Erläuterungen im Text.

Zunächst wurde der Bereich, der den ersten 50 Aminosäuren entspricht (dieser ist durch ein Intron unterbrochen) zusammen mit ca. 430 bp aus dem Promotorbereich von *RPL25* mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer (*RPL25-Bam*HI/*Xba*I und *RPL25-Pst*I/*Bgl*II/*Xho*I) mittels PCR an chromosomaler DNA des Wildtyp-Hefestammes YPH499 amplifiziert. Dieses Fragment wurde, über die durch die Oligonukleotidprimer angefügten Schnittstellen für *Xba*I und *Xho*I, nach Restriktion mit den entsprechenden Enzymen, in pRS315 eingefügt (pJS59).

Parallel dazu wurde der offene Leserahmen des *RL23*-Gens mittels Kolonie-PCR (2.2.2.4.1) aus dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  isoliert. Die *RL23*-spezifischen Oligonukleotidprimer (*RL23-Eco*RV/*Pst*I und *RL23-Bam*HI/*Sal*I) wurden so gewählt, dass das Start-Codon (ATG) von *RL23* nicht mit amplifiziert wurde. Nach Restriktion mit *Pst*I und *Bam*HI wurde dieses Fragment in pJS59 (pRS315-*P<sub>RPL25</sub>-rpl25N<sub>(As1-50)</sub>*) eingefügt, wobei der Umstand ausgenutzt wurde, dass *Bgl*II und *Bam*HI kompatible überhängende Enden erzeugen. Das Gelingen dieser Strategie wurde durch Sequenzierung (2.2.2.11) der erhaltenen Klone überprüft.

Für den Komplementationstest wurde der *RPL25-shuffle*-Stamm JSY21 mit pJS63 (pRS315-*P<sub>RPL25</sub>-rpl25N<sub>(As1-50)</sub>-RL23*), bzw. pJS40 (p415*ADH-RPL25*), als Positivkontrolle, p415*ADH*, als Negativkontrolle, oder pJS41 (p415-*RL23*) transformiert und das Wachstum der erhaltenen Transformanten auf SC-LEU-URA und 5'-FOA-haltigem Medium verglichen (Abb. 3.27).



**Abb. 3. 27: Komplementation von *RPL25* durch ein chimäres Fusionskonstrukt aus *RPL25* und *RL23***

Der *RPL25-shuffle*-Stamm JSY21 wurde mit pJS63 (pRS315-Chimäre), pJS40 (p415*ADH-RPL25*), pJS41 (p415*ADH-RL23*), bzw. p415*ADH* transformiert. Die Anordnung der Stämme ist rechts schematisch dargestellt. Das Wachstum der resultierenden Hefestämme wurde auf SC-LEU-URA und auf 5'-FOA-haltigem Medium verglichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

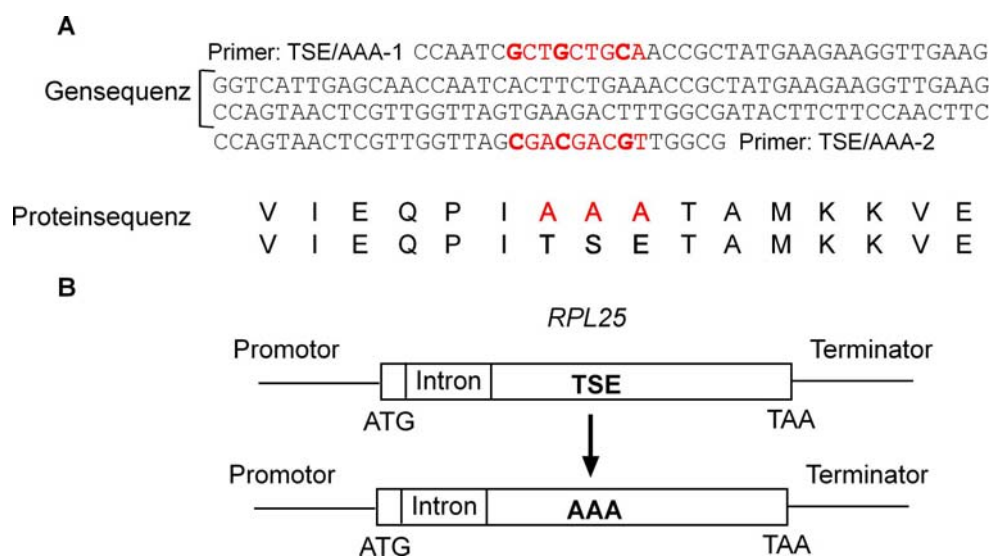
Es zeigte sich, dass auch das chimäre Fusionsprotein nicht in der Lage ist, die Funktion von Rpl25p zu übernehmen. Erneut war nur der Stamm, der nach dem Plasmid *shuffle* eine Wildtyp-Kopie von *RPL25* behält, in der Lage auf 5'-FOA-haltigem Medium zu wachsen. Es muss also, neben dem N-terminalen Anhang, noch andere Unterschiede zwischen Rpl25p und seinem *E. coli* Homolog Rl23p geben, die für dessen Funktion essentiell sind.

### 3.1.8.3 Untersuchung der Bedeutung von „E18“ für Rpl25p

Wenn Rl23p die Funktion von Rpl25p in der Hefe nicht ohne weiteres übernehmen kann, stellt sich die Frage, welche Rolle das VSE-Motiv, mit dem konservierten Glutaminsäurerest (E18), das in *E. coli* für die Bindung von Triggerfaktor an Rl23p verantwortlich ist, in der Hefe spielt. Wie bereits erwähnt, ist dieses Motiv konserviert und daher, in schwach abgewandelter Form (TSE) auch in Rpl25p vorhanden (3.1.7.1). In *E. coli* führt das Ersetzen dieses Aminosäure-Triplets durch Alanin (AAA) zu einer starken Reduktion der Bindung von Triggerfaktor an Rl23p (Kramer et al., 2002).

#### 3.1.8.3.1 Gezielte Veränderung von „E18“ durch Aminosäureaustausch

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung des TSE-Motivs im Hefeprotein zu einer Reduktion der Assoziation zytosolischer Faktoren mit Rpl25p führt, wurden diese Aminosäuren durch gezielte PCR-Mutagenese durch Alanin ersetzt. Die Mutation wurde dabei über spezifische Oligonukleotidprimer eingeführt. Diese und die durch die Mutagenese entstandenen Veränderungen in der Proteinsequenz von Rpl25p sind in Abb. 3.28A dargestellt.

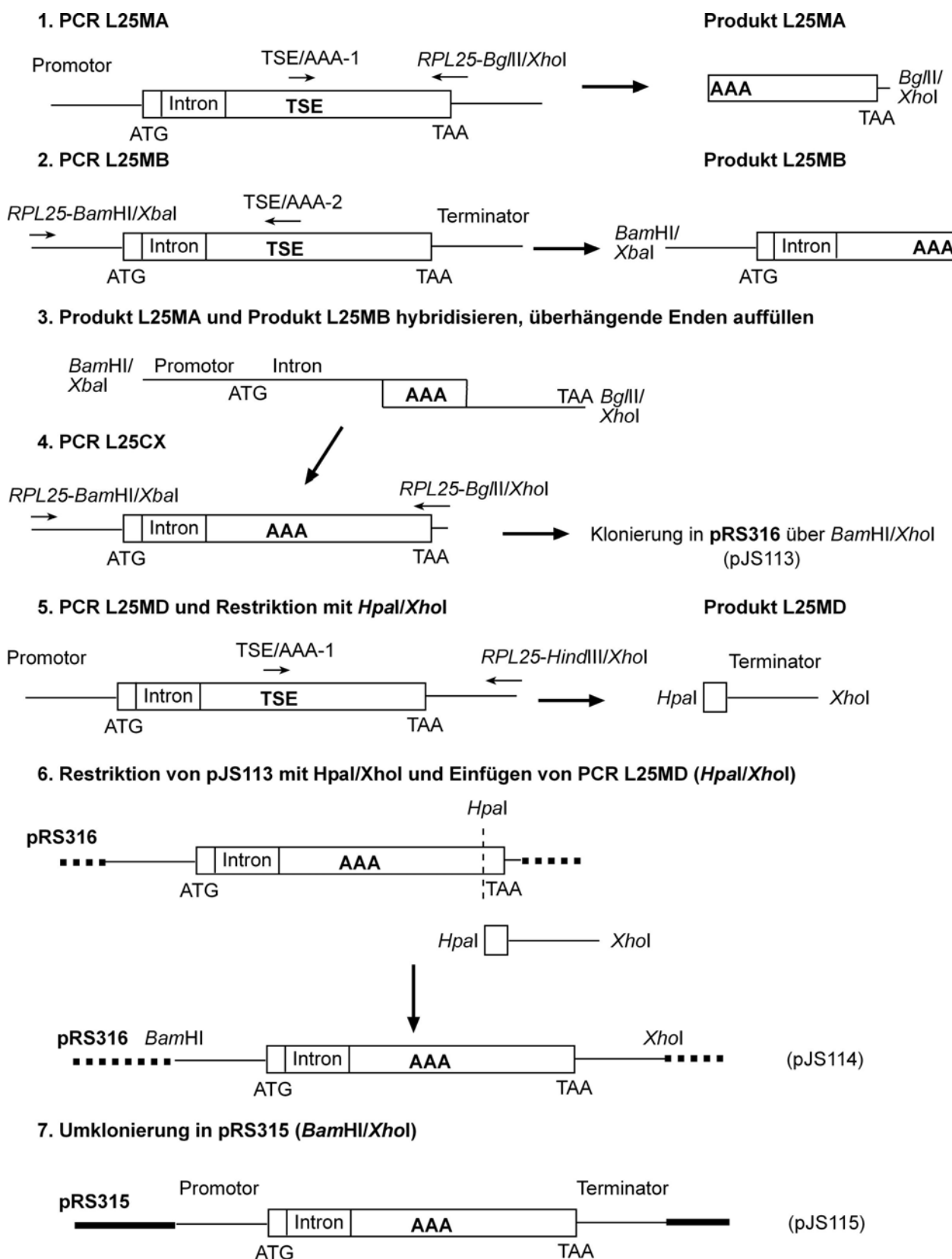


**Abb. 3. 28: Gezielte Mutagenese von *RPL25***

(A) Darstellung der Oligonukleotidprimer für die gezielte PCR-Mutagenese und der dadurch entstehenden Veränderungen in der Proteinsequenz von Rpl25p. (B) Schematische Darstellung der Konstrukte für den Komplementationstest.

Um den Effekt der Mutation im Komplementationstest untersuchen zu können, sollte sowohl das Wildtyp-, als auch das veränderte Gen zusammen mit dem endogenen *RPL25*-Promotor und Terminator in pRS315 kloniert werden (Abb. 3.28B). Dies sollte sicherstellen, dass beide Konstrukte zu 100% vergleichbar sind und alle Bereiche, die für die Funktion von Rpl25p wichtig sein können, wie z.B. Signale für Genregulation, Kern-Import und -Export oder das

Splicing des Introns, vorhanden sind. Die PCR- und Klonierungsschritte zur Herstellung der Mutante sind in Abb. 3.29 zusammengefasst.



**Abb. 3.29: Zielgerichtete Mutagenese des TSE-Motivs und Klonierung in pRS315**

Schematische Darstellung der PCR- und Klonierungsstrategie zur Erzeugung einer Aminosäureaustausch-Mutante von Rpl25p. Erläuterungen im Text.

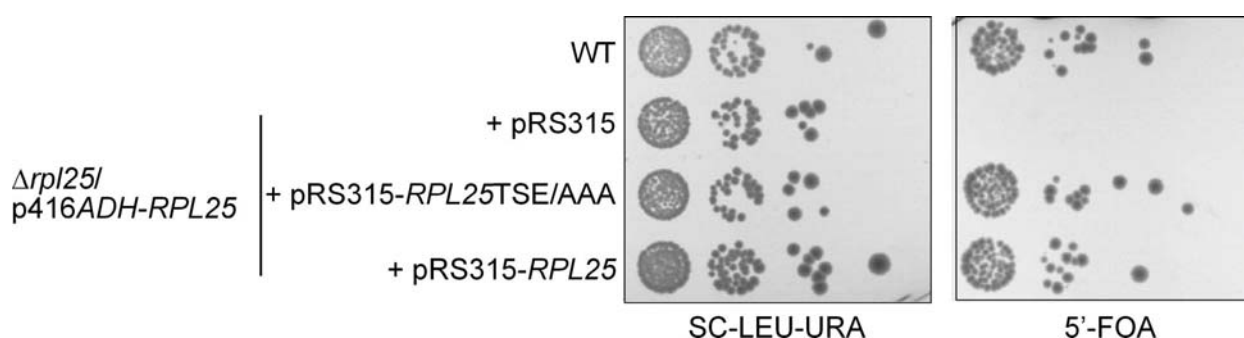
Zunächst wurde die Mutation per PCR in 3 Schritten eingeführt und das PCR-Produkt, das den *RPL25*-Promotor und das veränderte Gen enthält, in pRS316 kloniert (pJS113). Als Matritze für die PCR diente, wenn nicht anders angegeben, chromosomale DNA des Wildtyp-Stammes YPH499. Im ersten Schritt wurde der Genabschnitt, der den C-Terminus von Rpl25p codiert, mit den Primern TSE/AAA-1 und *RPL25-BglIII/XhoI* amplifiziert (PCR L25MA). Es ergibt sich ein Fragment, das am 3'-Ende den Basennaustausch und am 5'-Ende über den Rückwärtsprimer eingeführte Restriktionsschnittstellen enthält (Produkt L25MA). Im zweiten Schritt wurde entsprechend der Bereich, der den N-terminalen Teil von Rpl25p codiert, zusammen mit dem endogenen Promotor, mit den Primern *RPL25-BamHI/XbaI* und TSE/AAA-2 amplifiziert (Produkt L25MB). Im dritten Schritt wurden die beiden PCR-Produkte im Verhältnis 1:1 gemischt und als Matritze für die nächste PCR verwendet. Dabei werden die Doppelstränge zunächst durch Erhitzen auf 95°C getrennt. Beim anschließenden Abkühlen auf 54°C hybridisieren die kompatiblen Bereiche der Einzelstränge aufgrund der kurzen Sequenzüberlappung beider PCR-Produkte rund um den Aminosäureaustausch (vgl. Abb. 3.28A). Während dieses Hybrid in den ersten Zyklen der PCR mit Hilfe der Primer *RPL25-BamHI/XhoI* und *RPL25-HindIII/XhoI* zum vollständigen Doppelstrang aufgefüllt wird, dient es während der folgenden Zyklen als Matritze für die Amplifikation von *RPL25*TSE/AAA und des *RPL25*-Promotors (PCR L25CX). Das PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit *BamHI* und *XhoI* zunächst in pRS316 kloniert (pJS113).

Das 3'-Ende von *RPL25* und der *RPL25*-Terminator wurden in einer 5. PCR amplifiziert, und nach entsprechendem Restriktionsverdau an das in pJS113 vorhandene Gen-Fragment angehängt. In einem letzten Schritt wurde das gesamte Konstrukt in pRS315 umklontiert (pJS115). Diese, etwas umständliche, Strategie wurde notwendig, da die Amplifizierung des 5'-Endes von *RPL25* und des Terminators (PCR L25MD), die ursprünglich als 2. PCR-Schritt geplant war, nur mit der sehr fehleranfälligen Taq-Polymerase erfolgreich war. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts, zeigte das Fehlen einer Base im vorderen Abschnitt, das zu einer Verschiebung im Leseraster führte. Daher wurde die ursprüngliche Strategie geändert, PCR L25MB, wie in Abb. 3.29 gezeigt, als 2. PCR-Schritt verwendet, und der dadurch fehlende *RPL25*-Terminator über eine endogene *HpaI*-Schnittstelle in *RPL25* aus PCR L25MD in pJS113 eingefügt (pJS114). Da jedoch der in pRS315 codierte *LEU2*-Resistenzmarker ebenfalls eine *HpaI*-Erkennungssequenz enthält, war es nötig, diese Klonierung mit pRS316 (*URA3*) als Zwischenstufe durchzuführen, und das fertige Konstrukt am Ende in pRS315 (*LEU2*) umzusetzen. Alle im Rahmen dieser Klonierung generierten PCR- und Zwischenprodukte wurden mittels Sequenzierung bezüglich ihrer Richtigkeit überprüft (2.2.2.11).

Das entsprechende Wildtyp-Konstrukt wurde mittels *gap repair* (2.2.1.13) aus pJS114 (pRS316- $P_{RPL25}$ -*RPL25*TSE/AAA- $T_{RPL25}$ ) hergestellt und im Anschluss wiederum in pRS315 umklontiert. Dazu wurde pJS114 mit *EcoRI* und *HpaI* linearisiert. Die Verwendung der *HpaI*-Schnittstelle als singuläre Restriktionsstelle ist, wie oben erklärt, nur im pRS316-Hintergrund möglich. Dabei wird ein 350bp-Fragment freigesetzt, das die Mutation (TSE/AAA) enthält. Da es sich bei *RPL25* um ein essentielles Gen handelt, wurde die linearisierte DNA mittels Transformation in den diploiden Wildtyp-Hefestamm YPH501 eingebracht, wo das Plasmid durch homologe Rekombination mit einer der chromosomalen Genkopien geschlossen wurde, während die zweite Genkopie das Überleben der Zellen gewährleistet. Das rezirkularisierte Plasmid wurde nach der Isolierung aus der Hefe, zur Amplifikation in *E. coli*-Zellen eingebracht, daraus reisoliert und das Wildtyp-*RPL25*-Fragment mit Promotor und Terminator über die flankierenden *BamHI* und *XhoI*-Schnittstellen in pRS315 umklontiert (pJS117). Der Erfolg dieser *gap repair* wurde durch Sequenzierung (2.2.2.11) überprüft.

### 3.1.8.3.2 Untersuchung des Phänotyps von *RPL25*TSE/AAA

Die Funktionalität der Plasmide wurde zunächst durch Komplementation untersucht. Dazu wurde der *RPL25-shuffle*-Stamm JSY21 mit pRS315, pJS115 (pRS315- $P_{RPL25}$ -*RPL25*TSE/AAA- $T_{RPL25}$ ) und pJS117 (pRS315- $P_{RPL25}$ -*RPL25*- $T_{RPL25}$ ) transformiert. Die resultierenden Stämme wurden in 10-fachen seriellen Verdünnungen auf SC-LEU-URA und 5'-FOA-haltigem Medium mit dem Wildtyp-Stamm YPH499 verglichen (Abb. 3.30).



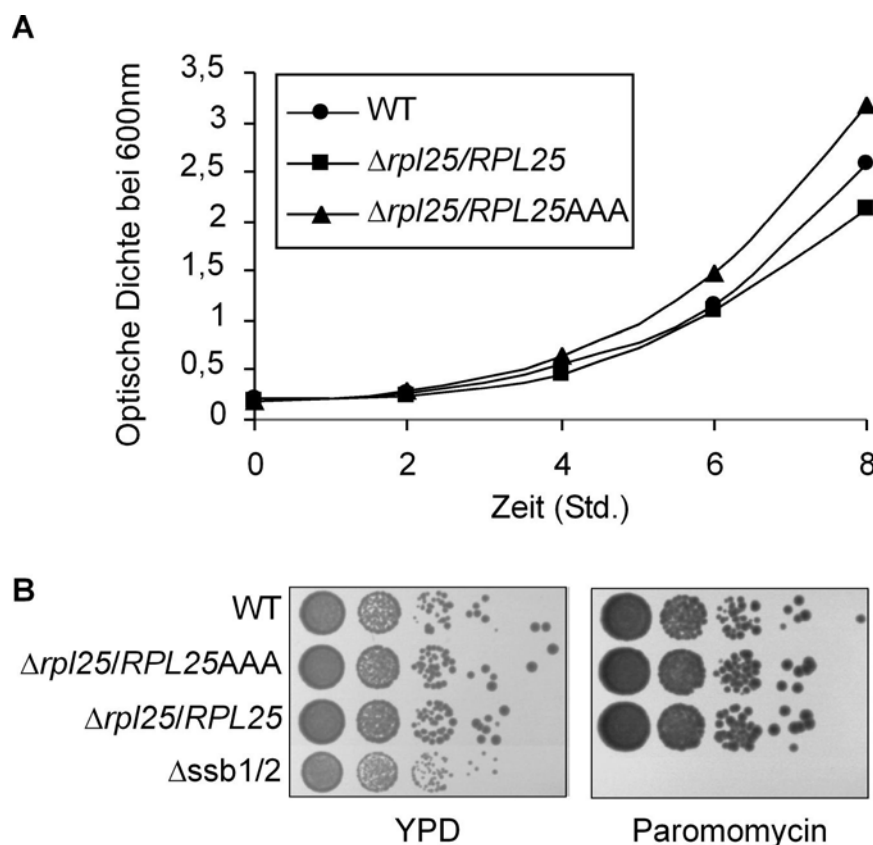
**Abb. 3. 30: Überprüfung der Funktionalität von *RPL25*TSE/AAA durch Komplementation**

Das Wachstum des, mit pRS315, pJS115 (pRS315-*RPL25*TSE/AAA) oder pJS117 (pRS315-*RPL25*) transformierten *RPL25-shuffle*-Stammes JSY21, wurde mit dem Wildtyp YPH499 verglichen. Dazu wurden 10-fache serielle Verdünnungen der Stämme auf SC-LEU-URA und 5'-FOA-haltigem Medium für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Es konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm YPH499 und den zu testenden Stämmen festgestellt werden. Dies lässt zum einen den Schluss zu, dass die Plasmid-codierten Konstrukte alle für die Funktion von Rpl25p wichtigen Elemente enthalten, zum anderen deutet

es darauf hin, dass die in *RPL25* eingeführte Mutation nicht mit der Funktion von Rpl25p interferiert.

Diese Schlussfolgerung konnte durch Wachstumstests mit den, nach der Selektion auf 5'-FOA erhaltenen, Hefestämmen in Flüssigkultur und auf Paromomycin-haltigem Medium bestätigt werden (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Überprüfung der *RPL25AAA*-Mutante bezüglich Wachstums- und Translationsdefekten**

(A) Das Wachstum des mit pJS115 (pRS315-*RPL25*TSE/AAA) oder pJS117 (pRS315-*RPL25*) transformierten *RPL25-shuffle*-Stammes JSY21, nach Selektion auf 5'-FOA wurde mit dem Wildtyp YPH499 in Flüssigkultur und, (B) in 10-fachen seriellen Verdünnungen, auf Medium ohne oder mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Paromomycin verglichen. In diesem Fall diente der *ssb1/2*-Deletionsstamm KSY185, der Paromomycin-sensitiv ist, als Vergleich.

Im Gegensatz zu den Befunden im *RPL25*-3HA-Hintergrund, zeigt der Stamm, der die *RPL25AAA*-Mutation trägt, weder einen Wachstumsdefekt (Abb. 3.31A), noch einen Translationsdefekt (Abb. 3.31B) im Vergleich zum Stamm mit der Wildtyp-Kopie von *RPL25*. Auch dies ist ein Indiz dafür, dass die Mutation des TSE-Motivs in *RPL25* die Bindung zytosolischer Chaperone nicht beeinflusst.

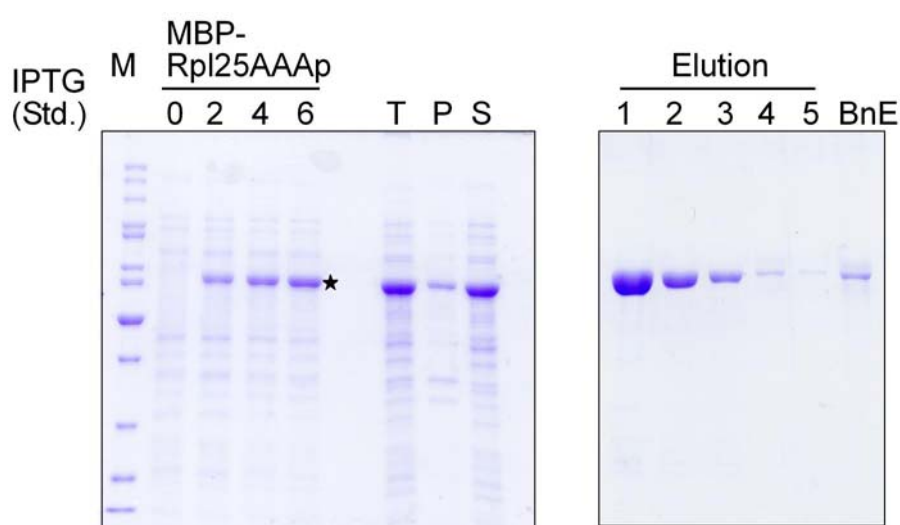
### 3.1.8.3.3 Expression und Reinigung von MBP-Rpl25AAAp

Um diese ersten Beobachtungen durch Bindetests im Zellextrakt validieren zu können, sollte auch Rpl25AAAp als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Um dieses Konstrukt herzustellen, wurde der offene Leserahmen der veränderten



Genvariante mittels PCR an pJS115 amplifiziert und in den pMalE-Vektor kloniert (pJS116). Da Bakterien nicht in der Lage sind, Introns durch Splicing zu entfernen, wurde für die PCR ein Vorwärts-Oligonukleotidprimer verwendet, der 5' und 3' vom Intron mit der Matrize hybridisiert. Durch dessen Bindung wird das Intron in Form einer Schleife verdrängt und somit bei der PCR nicht amplifiziert.

Das Konstrukt wurde mittels Transformation in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS eingebracht und das Fusionsprotein nach Induktion mit 0.3 M IPTG in Glukose-haltigem Medium exprimiert (2.2.3.11). Nach 6 Std. Induktion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Löslichkeit des Fusionsproteins untersucht (Abb. 3.32).



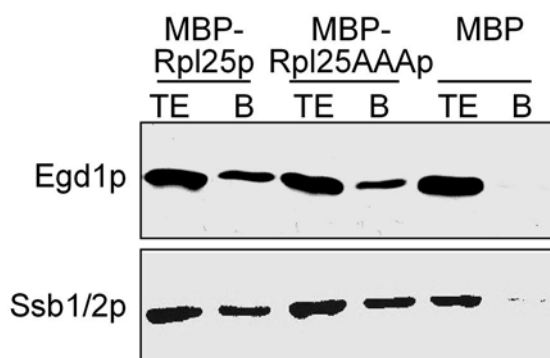
**Abb. 3. 32: Expression und Reinigung von MBP-Rpl25AAAp**

Die Expression von MBP-Rpl25AAAp wurde zum Zeitpunkt 0 mit IPTG induziert. Proben 2, 4 und 6 Std. nach Induktion, sowie Proben des Totalextrakts (T), der unlöslichen (P) und löslichen (S) Fraktion nach Zentrifugation, der Elutionsschritte (Elution 1-5) und der Matrix nach Elution (BnE) wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Der Stern markiert die Expressionsbande.

Wie erwartet, konnte auch dieses MBP-Fusionsprotein effizient exprimiert und gereinigt werden. Ca. 80-90% des im Zellextrakt vorhandenen Proteins waren löslich, und konnten nach Bindung an die Amylosematrix wieder vollständig eluiert werden.

**3.1.8.3.4 Bindung von Egd1p und Ssb1/2p an Rpl25AAAp**

Für den Bindetest wurde das gereinigte Fusionsprotein an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert (2.2.3.14). Ganzzellextrakte des Wildtyp-Hefestammes YPH499 wurden für ca. 2 Std. mit je 5 µM immobilisiertem MBP-Rpl25p, MBP-Rpl25AAAp, oder MBP, als Kontrolle, inkubiert. Nach dem Waschen wurden gebundene Proteine durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen die direkt mit Rpl25p interagierenden Proteine Egd1p und Ssb1/2p analysiert (Abb. 3.33).



**Abb. 3. 33: Co-Präzipitation zytosolischer Proteine aus Zellextrakten mit Rpl25p und Rpl25AAAp**

Ganzzellextrakte des Wildtyp-Stamms YPH499 wurden für 2 Std. mit 5  $\mu$ M immobilisiertem MBP-Rpl25p, MBP-Rpl25AAAp, oder MBP als Kontrolle inkubiert. An die Matrix gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer eluiert und nach SDS-PAGE und Westernblot mit ausgewählten spezifischen Antikörpern analysiert.

Wie erwartet, co-präzipitierten Egd1p und Ssb1/2p effizient mit Rpl25p, jedoch nicht mit der MBP-Kontrolle (vgl. 3.1.5.3). Die Quantifizierung der Signale für Egd1p und Ssb1/2p in den Präzipitaten (B) ergab, dass die Bindung von Egd1p im *RPL25AAA*-Hintergrund leicht (ca. 25%) reduziert ist, während die Bindung von Ssb1/2p nicht beeinflusst wird.

Dieser Befund führte zu der Schlussfolgerung, dass das TSE-Motiv in Rpl25p zur Bindung von Egd1p, und damit von NAC, an Ribosomen beiträgt, jedoch nicht die alleinige und alles entscheidende Bindestelle darstellt. Das heißt, dass sich dieses Motiv, trotz der Konservierung auf Sequenzebene, funktionell weiterentwickelt haben muss. Zusätzlich muss in der Hefe eine andere Region des Proteins an der spezifischen Bindung von Egd1p, bzw. NAC beteiligt sein. Die Beobachtung, dass die Interaktion von Ssb1/2p mit Rpl25p durch die Mutation nicht beeinflusst wird, zeigt, dass das TSE-Motiv bei der Bindung von Ssb1/2p an Rpl25p keine Rolle spielt und deutet die Möglichkeit an, dass sich Ssb1/2p und NAC verschiedener Bindestellen an dieser ribosomalen Untereinheit bedienen.

Mit diesem Ergebnis wurde die Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel beendet.

## 3.2 Charakterisierung des Gim-Komplexes durch Analyse von Verkürzungsmutanten

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Vorgängen, die neben der initialen Abschirmung naszenter Ketten durch Ribosomen-gebundene Chaperone stattfinden. Anders als die meisten Proteine der Hefe, für die diese Abschirmung ausreichend ist, um ihren nativen Zustand zu erreichen, benötigen die hochabundanten, essentiellen Zytoskelett-Proteine, Aktin und die Tubuline, dazu die Hilfe einer spezialisierten Faltungsmaschinerie. Diese besteht, wie in der Einleitung detailliert dargestellt, aus dem Gruppe II-Chaperonin TRiC/CCT und seinem Co-Chaperon, dem Gim-Komplex, GimC (s. 1.2).

Der Beitrag, den die einzelnen GimC-Untereinheiten zur Interaktion mit ungefalteten Substratproteinen leisten, wurde mit Hilfe von Verkürzungsmutanten untersucht, denen die N- und C-terminalen hydrophoben Bereiche fehlen, die diese Interaktion vermitteln. Der Vorteil dieser Mutanten besteht darin, dass die Assemblierung des Komplexes durch die Verkürzung nicht gestört wird, wie dies etwa bei Deletionsmutanten der Fall wäre, sodass die Funktion einzelner Untereinheiten gezielt und isoliert betrachtet werden kann.

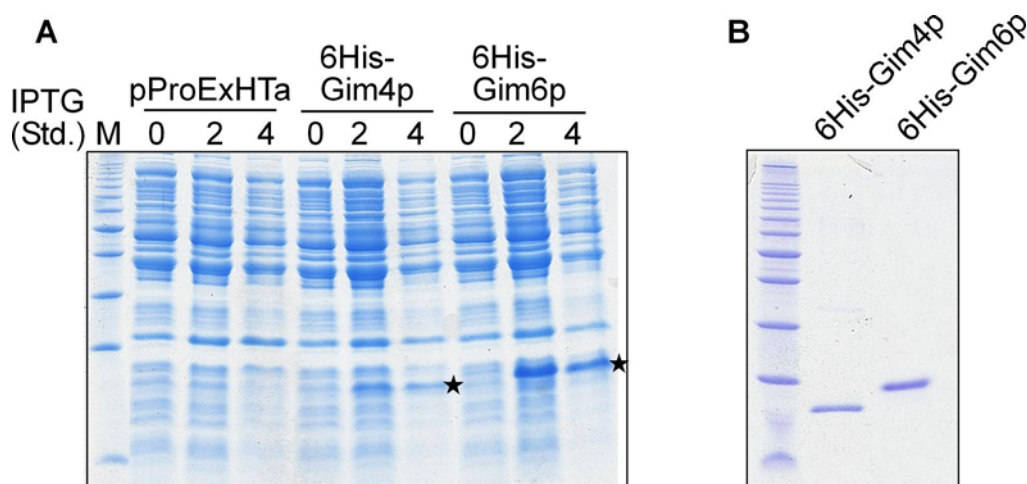
Die Mutanten wurden zunächst einzeln *in vivo* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Chemikalien, die das Aktin-, bzw. Tubulin-Zytoskelett beeinflussen, charakterisiert. Um die Ergebnisse dieser Versuche *in vitro* zu validieren, wurde eine Strategie zur effizienten Überproduktion und Reinigung von Wildtyp-GimC und verschiedener Mischkomplexe aus der Hefe entwickelt. Diese gereinigten Komplexe wurden bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, die Aggregation denaturierter Substratproteine zu verhindern, und auch neu-synthetisiertes Aktin und  $\alpha$ -Tubulin in Lösung zu halten.

Zunächst wurden jedoch spezifische Antikörper zur Detektion der Untereinheiten Gim4p und Gim6p hergestellt, um das vorhandene GimC-Antikörpersortiment zu vervollständigen.

### 3.2.1 Herstellung spezifischer Antikörper zum Nachweis der GimC-Untereinheiten Gim4p und Gim6p

Um alle GimC-Untereinheiten im Westernblot nachweisen zu können, wurden polyklonale Antiseren gegen Gim4p und Gim6p hergestellt. Antikörper, die spezifisch die übrigen Untereinheiten Gim1p, Gim2p, Gim3p und Gim5p detektieren, waren bereits vorhanden.

Die offenen Leserahmen von *GIM4* und *GIM6* wurden per PCR an chromosomaler DNA des Wildtyp-Stammes YPH499 amplifiziert, in geeignete Expressionsvektoren (pProExHTa und pGEX-5X1) kloniert und als 6His-, bzw. GST-Fusion in *E. coli* exprimiert (Abb. 3.34A und Daten nicht gezeigt). Da die Fusionsproteine in beiden Fällen unter nativen Reinigungsbedingungen unlöslich waren, wurden für die Immunisierung von Kaninchen (2.2.5.1) 6His-Fusionen verwendet. Sowohl 6His-Gim4p, als auch 6His-Gim6p bilden bei der Überexpression in *E. coli* stabile Einschlusskörper (sog. „inclusion bodies“), die nach Aufschluss der Zellen einfach durch Zentrifugation aus den Lysaten isoliert wurden. Die *inclusion bodies* wurden unter Zugabe von Harnstoff und Detergens gewaschen (2.2.3.10.6), in Puffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und die solubilisierten Fusionsproteine anschliessend an eine Ni-NTA-Matrix gebunden. Da die Eluate der Affinitätsäulen in beiden Fällen noch relativ prominente Verunreinigungen enthielten, wurden ausgewählte Fraktionen mit Harnstoffpuffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht und je ca. 2 mg Gesamtprotein auf präparativen SDS-Gelen aufgetrennt. Nach Färben der Gele mit Kupferchlorid (2.2.3.5.3), wurde die dem betreffenden Fusionsprotein entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, das darin enthaltene Protein durch Elektroelution wieder in Lösung gebracht und auf diese Weise isoliert (2.2.3.6). Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 3.34B). Für die Immunisierung wurden je ca. 500 µg der Antigene verwendet.



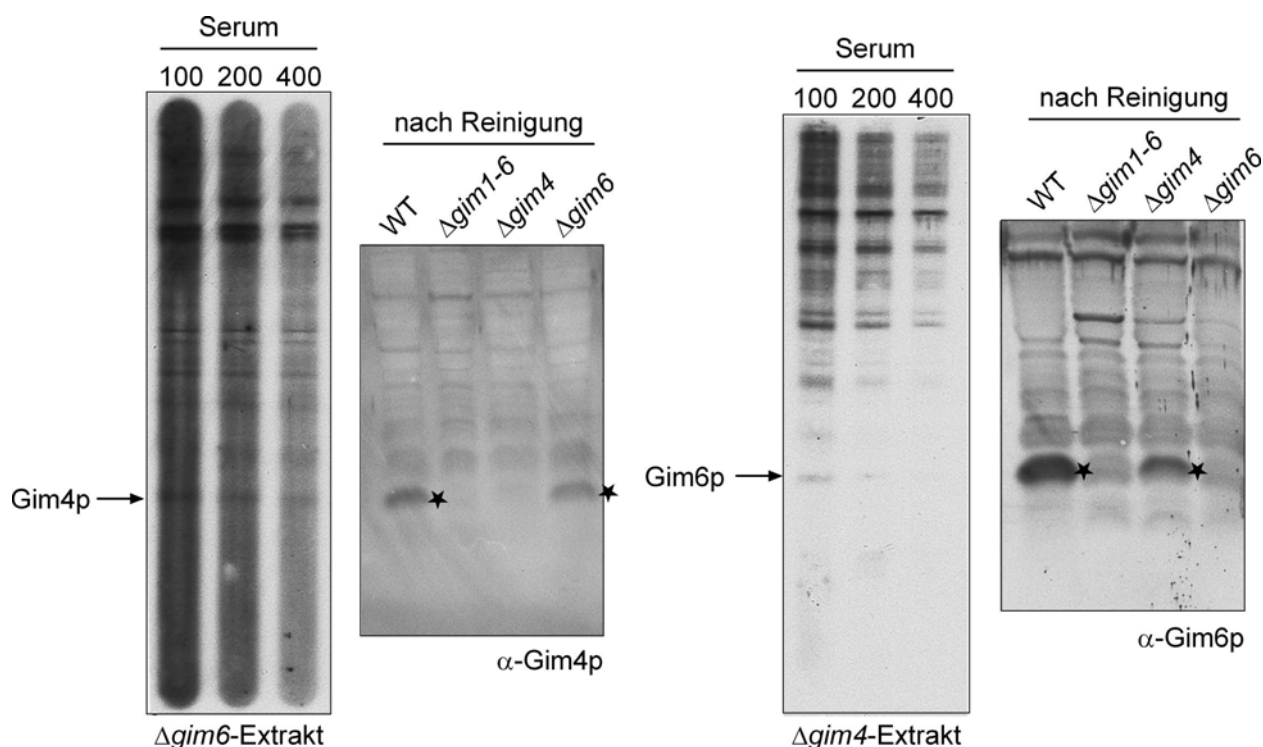
**Abb. 3.34: Expression und Reinigung von Gim4p und Gim6p zur Herstellung polyklonaler Antisera**

(A) Die Expression der 6His-Fusionsproteine wurde zum Zeitpunkt 0 mit 0,5 mM IPTG induziert. Proben 2 und 4 Std. nach Induktion wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die den leeren Vektor enthalten, entsprechend behandelt (pProExHTa). Sterne markieren die Expressionsbanden. (B) 15%-Tricinegel der gereinigten Proteine.

Die Spezifität der Antikörper wurde zunächst im Streifenblot getestet (2.2.5.1.2). Dabei wurden die Seren in seriellen Verdünnungen (1:100-1:400) eingesetzt. Da Gim4p und Gim6p ähnlich groß sind (Gim4p: 14,3 kDa, Gim6p: 12,7 kDa), sind diese selbst auf hochauflösenden SDS-Gelen nur schwer voneinander zu unterscheiden. Daher wurde zum eindeutigen Nachweis von

Gim4p eine Membran mit TCA-Extrakt eines  $\Delta gim6$ -Stammes, zum Nachweis von Gim6p, eine Membran mit TCA-Extrakt eines  $\Delta gim4$ -Stammes verwendet.

Beide Antiseren wiesen sehr starke unspezifische Reaktionen, sowohl mit anderen Hefeproteinen, als auch, besonders im Fall des  $\alpha$ -Gim4p-Serums, mit der Westernblotmembran auf (Abb. 3.35). Diese konnten weder durch Verwendung eines anderen Membranmaterials (z.B. PVDF) noch eines anderen Proteins zur Blockierung unspezifischer Bindestellen auf der Membran (z.B. BSA) merklich reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Da gereinigtes Gim4p und Gim6p zudem in Lösungen, deren Harnstoffgehalt unter 4 M liegt, sofort aggregieren, wurde das Koppeln der Proteine an CNBr-aktivierte Sepharose, oder Affigel unmöglich, da Harnstoff die Kopplungsreaktion stört. Daher schien die Anreicherung spezifischer Antikörper durch Affinitätsreinigung der Seren zunächst nicht durchführbar und unspezifische Antikörper wurden stattdessen über Säulen mit gekoppeltem *E. coli*-Lysat und entsprechenden Hefeextrakten (SGY115:  $\Delta gim4$  und KSY84:  $\Delta gim6$ ) depletiert. Die auf diese Weise gereinigten Seren wurden im Westernblot getestet (Abb. 3.35).



**Abb. 3. 35: Überprüfung der Spezifität der gereinigten Antiseren**

Die spezifische Antigenerkennung durch das  $\alpha$ -Gim4p- und  $\alpha$ -Gim6p-Serum vor und nach der Depletion unspezifischer Antikörper wurde im Westernblot untersucht. Dazu wurden TCA-Extrakte eines  $\Delta gim4$ -, bzw.  $\Delta gim6$ -Stammes per Westernblot auf eine Membran übertragen und in einer Streifenblotapparatur mit verschiedenen Verdünnungen der entsprechenden Seren vor der Reinigung inkubiert (Serum). Nach der Reinigung wurden die Seren im Westernblot mit TCA-Extrakten der Deletionsstämme ( $\Delta gim4$ ,  $\Delta gim6$ ), des Wildtyps YPH499 (WT) und eines GimC-Deletionsstammes ( $\Delta gim1-6$ ) getestet. Die, durch die verwendeten Antiseren detektierten, spezifischen Signale sind mit Sternen gekennzeichnet.

Dazu wurden Westernblots mit TCA-Extrakten des Wildtyps YPH499 und entsprechender Kontrollstämme (KSY117:  $\Delta gim1-6$ , SGY115:  $\Delta gim4$ , KSY84:  $\Delta gim6$ ) mit dem Serum nach der Depletion in einer 1:400 Verdünnung inkubiert. In beiden Fällen konnte der unspezifische Hintergrund durch die Reinigung der Seren zwar nicht vollständig eliminiert, aber zumindest soweit abgeschwächt werden, dass das spezifische Signal eindeutig erkennbar und am prominentesten war.

### 3.2.2 Konstruktion von Verkürzungsmutanten

Hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine entscheidende Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen. So erkennen auch Chaperone ihre Substrate daran, dass diese Seitenketten hydrophober Aminosäuren, wie z.B. Valin, Isoleucin, Tyrosin oder Tryptophan exponieren, die bei nativen Proteinen normalerweise im Inneren, das heißt von der Umgebung abgeschirmt, vorliegen. Durch die Interaktion mit ebenfalls hydrophoben Bereichen des Chaperons, werden diese Reste vor Wechselwirkungen mit anderen ungefalteten Proteinketten und somit vor Aggregation geschützt, bis das Protein seinen nativen Zustand erreicht hat, oder ein anderes Chaperon die Proteinkette übernimmt (vgl. 1.1.1). Sequenzvergleiche mit dem archaellen GimC-Homolog Prefoldin legen nahe, dass diese Bereiche bei GimC an den C- und N-Termini der  $\alpha$ -Helices der einzelnen Untereinheiten liegen (s.u.).

Jede GimC-Untereinheit besteht, wie bereits angesprochen (vgl. 1.2.4), aus 2  $\alpha$ -helikalen Bereichen. Je nach Untereinheitstyp, sind diese durch eine ( $\beta$ -Untereinheiten), oder zwei ( $\alpha$ -Untereinheiten)  $\beta$ -Faltblattstrukturen unterbrochen. Die  $\alpha$ -helikalen Bereiche der Untereinheiten bilden sog. „coiled coils“. Solche superspiralisierten  $\alpha$ -Helices, die an verdrehte Telefonkabel erinnern, entstehen, indem sich zwei  $\alpha$ -Helices umeinander verdrillen. Die Ausbildung solcher Strukturen wird durch das Fehlen von Prolin und das reichliche Vorkommen von Leucin, Alanin und Glutamat begünstigt. Regelmäßigkeiten in der Aminosäuresequenz fördern die Entstehung superspiralisierter Helices. Diese bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von 7 Resten (*abcdefg*), sog. „heptad repeats“, von denen *a* und *d* gewöhnlich hydrophob sind. Die Reste *a* und *d* bilden ein Zickzackmuster aus Erhebungen und Vertiefungen, die sich entsprechend mit dem Muster des anderen Stranges verschränken, sodass ein passgenauer fester hydrophober Kern entsteht. Dagegen sind die Reste *b*, *c* und *f*, die an der Peripherie der Superhelix liegen, meist geladen. Da die Ganghöhe von  $\alpha$ -Helices ca. 3,6 Aminosäuren beträgt, entspricht ein *heptad repeat* ungefähr zwei Windungen der Helix.

Um den Beitrag einzelner GimC-Untereinheiten zur Erkennung der Hauptsubstrate Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zu untersuchen und herauszufinden, ob alle Untereinheiten für alle Substrate gleich wichtig sind, oder ob unterschiedliche Substrate von unterschiedlichen Untereinheiten gebunden werden, wurden die hydrophoben Bereiche dieser Superhelices mittels einer PCR-basierten Mutagenese-Strategie entfernt.

In Anlehnung an die Mutanten, die zur Untersuchung der Funktion des archaeellen GimC Homologs Prefoldin aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* verwendet wurden (Siegert et al., 2000), wurden die  $\alpha$ -Untereinheiten (Gim2p und Gim5p) C- und N-terminal um ca. 5 Windungen der  $\alpha$ -Helices, die  $\beta$ -Untereinheiten (Gim1p, Gim3p, Gim4p, Gim6p) um ca. 4 Umdrehungen der Helices verkürzt. Die Verkürzungen sind im Sequenzvergleich der Untereinheiten von Archaeen (*M. thermoautotrophicum*, Mt) und der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*, Sc) in Abb. 3.36 durch senkrechte Striche dargestellt.



**Abb. 3.36: Darstellung der Verkürzungsmutanten anhand des Sequenzvergleichs archaeeller und eukaryotischer Gim-Proteine**

Sequenz- und Strukturvergleich der GimC-Untereinheiten aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mt) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Der Bereich, der den verwendeten Verkürzungsmutanten entspricht, ist auf beiden Seiten durch senkrechte Striche begrenzt, Strukturelemente sind durch Buchstaben gekennzeichnet (h:  $\alpha$ -Helix, s:  $\beta$ -Faltblatt). a und d bezeichnen hydrophobe Reste der *heptad repeats* der Superhelices. Hydrophobe Reste sind farblich hervorgehoben: grün im N- und C-terminalen Bereich der GimC-Untereinheiten, der nicht mit den archaeellen Untereinheiten überlappt, rot im Bereich der *heptad-repeats*, blau im Bereich der  $\beta$ -Faltblattstrukturen.

Um die C- und N-terminalen Enden der  $\alpha$ -Helices zu entfernen, wurden die für die Untereinheiten codierenden Gene mittels PCR an chromosomaler DNA des Wildtyp-Hefestammes YPH499, oder geeigneter Plasmid-DNA amplifiziert. Dabei wurden durch die verwendeten Oligonukleotidprimer jeweils neue Start- und Stop-Codons eingeführt, um die offenen Leserahmen der Verkürzungsmutanten zu definieren. In den Primern codierte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme erlaubten zudem die Klonierung der PCR-Produkte unter die Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors (p415*ADH*).

### 3.2.3 Charakterisierung der Verkürzungsmutanten *in vivo*

Zur individuellen Charakterisierung der Verkürzungsmutanten wurden die Plasmide, die die verkürzten GimC-Untereinheiten codieren, einzeln per Transformation in entsprechende Deletionsstämme eingebracht, denen die zu untersuchende Untereinheit fehlt. Parallel dazu wurden dieselben Deletionsstämme mit p415ADH, als Kontrolle transformiert. Positive Transformanden wurden auf SC-LEU-Platten identifiziert und vereinzelt. Zur Vereinfachung werden im Folgenden nur die relevanten Genotypen, also z.B. *gimINTCT* statt  $\Delta\text{gim1/p415ADH-gimINTCT}$ , bzw.  $\Delta\text{gim1}$  statt  $\Delta\text{gim1/p415ADH}$ , angegeben. Um die Mutanten *in vivo* zu charakterisieren, wurden diese zunächst bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, den Effekt von Chemikalien, die das Aktin-, bzw. Tubulin-Zytoskelett beeinträchtigen, zu kompensieren.

#### 3.2.3.1 Sensitivität gegenüber LatrunculinA

LatrunculinA ist ein sog. Makrolid. Als Makrolide bezeichnet man makrozyklische Laktone mit 8-62 Ringgliedern (Abb. 3.37). Diese Naturstoffe finden sich insbesondere in Pilzen und Bakterien, aber auch in Schwämmen, wie dem in Roten Meer heimischen *Latrunculia magnifica*, aus dem LatrunculinA gewonnen wird. LatrunculinA zerstört auf rapide, aber reversible Weise das Aktin-Zytoskelett, indem es spezifisch an Aktin-Monomere bindet und dadurch deren Polymerisation in Filamente verhindert (Morton et al., 2000; Spector et al., 1989). Wildtyp-Zellen können die Sequestrierung der Aktin-Monomere durch vermehrte Neusynthese ausgleichen. Bei den GimC-Deletionsstämmen manifestiert sich dagegen ein Wachstumsdefekt, der darauf beruht, dass die Aktin-Biosynthese dieser Mutanten stark verlangsamt und weniger effizient ist (Geissler et al., 1998).

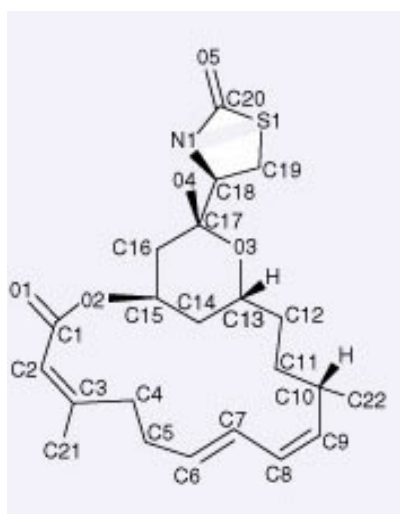
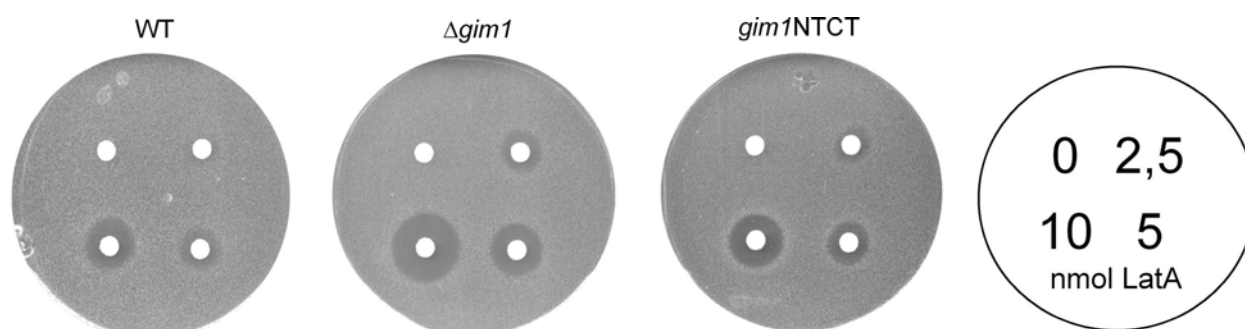


Abb. 3. 37: Chemische Struktur von LatrunculinA aus *Latrunculia magnifica* (Morton et.al., 2000)



Der Einfluss dieser Chemikalie auf das Wachstum der GimC-Deletions- und Verkürzungsmutanten wurde im Plattendiffusionstest untersucht (2.2.4.2.2). Dazu wurden Übernachtskulturen der zu testenden Stämme in 1x Agar verdünnt und Platten mit der Zellsuspension überschichtet. Nach Erkalten des Topagars wurden sterile Filterplättchen aufgebracht und mit unterschiedlichen Mengen LatrunculinA (2,5-10 nmol pro Filterplättchen) getränkt. Zur Kontrolle wurde auf ein Filterplättchen DMSO aufgebracht, das als Lösungsmittel für LatrunculinA verwendet wird. Bei der folgenden Inkubation diffundiert die Lösung in den Agar und verteilt sich dort radial um das Filterplättchen, wobei sich ein Konzentrationsgradient ausbildet. Entsprechend der relativen Sensitivität der Hefezellen im Topagar, bilden sich um die Filterplättchen Hemmhöfe aus, deren Grenze diejenige Konzentration von LatrunculinA repräsentiert, bei der die Hefen gerade noch in der Lage sind zu wachsen.

Abb. 3.38 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines solchen Plattendiffusionstests. In diesem Beispiel wurden der Wildtypstamm YPH499 (WT), der *GIMI*-Deletionsstamm (SGY101,  $\Delta gim1$ ) und der mit der *GIMI*-Verkürzungsmutante komplementierte Deletionsstamm (*gim1NTCT*) bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber LatrunculinA verglichen.



**Abb. 3. 38: Untersuchung der LatrunculinA-Sensitivität mittels Plattendiffusionstest am Beispiel von *GIMI***  
Die Sensitivität des Wildtypstammes YPH499 (WT), des *GIMI*-Deletionsstammes ( $\Delta gim1$ ) und der Verkürzungsmutante (*gim1NTCT*) gegenüber der Aktin-depolymerisierenden Chemikalie LatrunculinA (LataA) wurde im Plattendiffusionstest getestet. Die auf die Filterplättchen aufgegebenen Mengen sind rechts dargestellt. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Während der Wildtyp YPH499 relativ große Mengen LatrunculinA tolerieren kann, bevor es zur Ausbildung eines signifikanten Hemmhofes kommt, ist der *GIMI*-Deletionsstamm deutlich sensibler. Bereits um den Filter mit 5nmol LatrunculinA bildet sich ein Hemmhof in einer Größe, die beim Wildtyp erst mit der doppelten Menge der Chemikalie erreicht wird. Die Verkürzungsmutante dagegen, zeigt eine gegenüber dem Wildtyp leicht verstärkte Sensitivität, ist jedoch deutlich weniger sensitiv als die Deletionsmutante. Dies deutet darauf hin, dass die hydrophoben Enden der Gim1p-Untereinheit nicht wesentlich an der Interaktion des Komplexes mit Aktin beteiligt sind.

Deletions- und Verkürzungsmutanten für alle sechs GimC-Untereinheiten wurden auf dieselbe Weise getestet. Zur Bestimmung der relativen LatrunculinA-Sensitivität der verschiedenen Stämme wurden die Radien der Hemmhöfe, die um den Filter mit 10 nmol LatrunculinA gebildet wurden, gemessen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der höheren Sensitivität aller Mutanten gegenüber LatrunculinA, im Vergleich zum Wildtyp, lässt sich klar feststellen, dass die Effizienz der Aktin-Biosynthese von GimC abhängig ist. Das Aktin-System der Deletionsmutanten ist dabei stärker beeinträchtigt, als das der entsprechenden Verkürzungsmutanten, die meist einen eher intermediären Phänotyp zeigen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Fehlen einer ganzen Untereinheit, oft erhebliche Auswirkungen auf den Komplexaufbau hat. Zum Beispiel können in Abwesenheit einer der zentralen  $\alpha$ -Untereinheiten, Gim2p oder Gim5p, keine voll funktionellen Komplexe mehr gebildet werden. Aber auch das Fehlen der peripheren Untereinheit Gim1p, hat Konsequenzen für den Komplexaufbau, da in diesem Fall auch Gim3p nicht nachgewiesen werden kann (vgl. Einleitung). Da die Verkürzungsmutanten keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Komplexes haben sollten, lässt die Sensitivität gegenüber LatrunculinA in diesem Fall einen direkten Rückschluss auf die Wichtigkeit jeder einzelnen Untereinheit für die Interaktion des Komplexes mit Aktin zu.

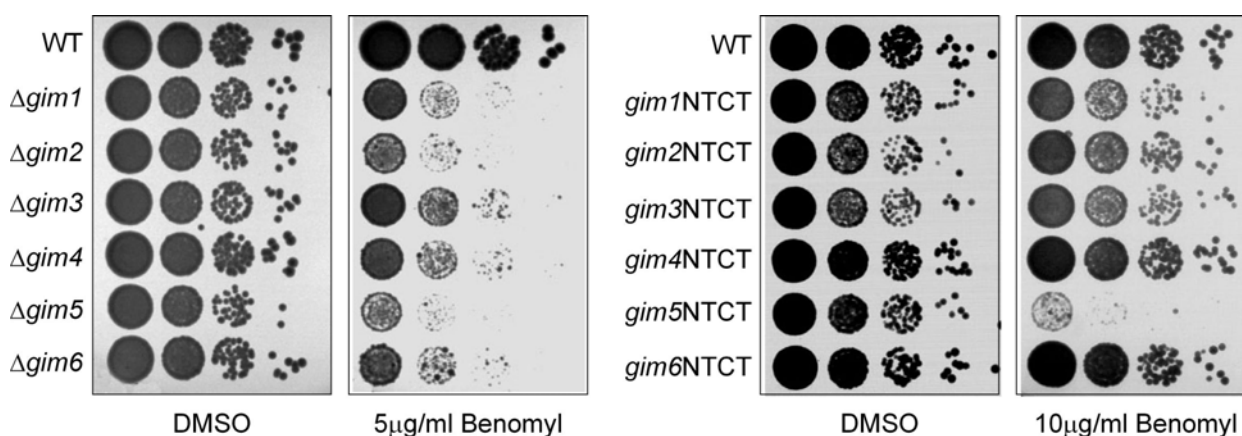
Die Verkürzungsmutanten, zeigten meist intermediäre Phänotypen gegenüber den entsprechenden Deletionsmutanten und dem Wildtyp. Den eindeutig stärksten Effekt hatten die Verkürzungen der  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p. Zu einer deutlichen Reaktion auf LatrunculinA führte auch die Verkürzung von Gim3p. Im Vergleich dazu waren die Verkürzungsmutanten von Gim1p, Gim4p und Gim6p deutlich unempfindlicher. Daher kann man aus dieser initialen Charakterisierung ableiten, dass die Untereinheiten Gim5p, Gim2p und Gim3p wohl den größten Beitrag zur Interaktion von GimC mit ungefaltetem Aktin leisten, während Gim1p, Gim4p und Gim6p zwar daran beteiligt sind, dabei jedoch eher untergeordnete Rollen spielen.

### 3.2.3.2 Sensitivität gegenüber Benomyl

Um die Wichtigkeit der einzelnen GimC-Untereinheiten für das Tubulin-System zu untersuchen, wurden die Deletions- und Verkürzungsmutanten bezüglich der Sensitivität gegenüber Benomyl getestet. Benomyl (Methyl 1-(butylcarbonyl)-2-benzimidazolcarbamoyl) wirkt auf ähnliche Weise wie LatrunculinA, indem es an Tubulin-Dimere bindet und deren Polymerisation in Filamente verhindert. Wiederum können Wildtypzellen die Sequestrierung der Tubulin-Dimere

durch erhöhte Neusynthese kompensieren und zeigen daher keinen Benomyl-assoziierten Wachstumsdefekt.

Für den Wachstumstest mit Benomyl wurden Übernachtskulturen der GimC-Deletionsstämmen, die mit p415ADH, oder den für Verkürzungsmutanten codierenden Plasmiden transformiert waren (s.o.) seriell 10-fach verdünnt und auf Platten mit verschiedenen Benomyl-Konzentrationen (2,5 µg/ml bis 10 µg/ml) gestempelt (Abb. 3.39).



**Abb. 3. 39: Untersuchung der Benomylsensitivität der GimC-Deletions- und Verkürzungsmutanten**

Serielle 10-fache Verdünnungen des Wildtyps YPH499 (WT) und verschiedener GimC Deletionsstämmen, die mit p415ADH ( $\Delta gim1$ - $\Delta gim6$ ) oder mit für Verkürzungsmutanten einzelner Untereinheiten codierenden Plasmiden ( $gim1NTCT$ - $gim6NTCT$ ) transformiert waren, wurden auf Platten ohne (DMSO) und mit Benomyl getestet. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Dabei zeigte sich auch hier, dass die Deletionsstämmen generell viel sensitiver sind, als die entsprechenden Verkürzungsmutanten. Bereits mit 5 µg/ml Benomyl konnten bei den Deletionsstämmen ausgeprägte Wachstumsdefekte beobachtet werden. In Einklang mit ihrer Bedeutung für den Komplexaufbau, führte das Fehlen der zentralen Untereinheiten Gim2p oder Gim5p zum stärksten Defekt, während das Fehlen der  $\beta$ -Untereinheiten Gim1p, Gim3p, Gim4p oder Gim6p, zwar auch schwerwiegende, aber nicht ganz so drastische, Auswirkungen auf das Wachstum der entsprechenden Hefestämme hatte. Die Stämme mit den Verkürzungsmutanten dagegen sind viel resistenter gegenüber Benomyl. Einzig der  $gim5NTCT$ -Stamm zeigt einen starken Wachstumsdefekt, der jedoch erst bei 10 µg/ml Benomyl mit dem Defekt des entsprechenden Deletionsstammes vergleichbar ist. Die übrigen Stämme dagegen sind nicht ( $gim4NTCT$ ,  $gim6NTCT$ ) oder nur wenig sensitiv gegenüber Benomyl ( $gim1NTCT$ ,  $gim2NTCT$ ,  $gim3NTCT$ ) und scheinen daher bei der Interaktion von GimC mit ungefalteten Tubulinen keine oder nur eine untergeordnete Rolle neben Gim5p zu spielen.

Die Ergebnisse der *in vivo* Analyse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Der Beitrag der einzelnen GimC-Untereinheiten zur Interaktion des Komplexes mit Aktin und den Tubulinen wird dabei anhand der Sensitivität entsprechender Verkürzungsmutanten gegenüber LatrunculinA und Benomyl bewertet.

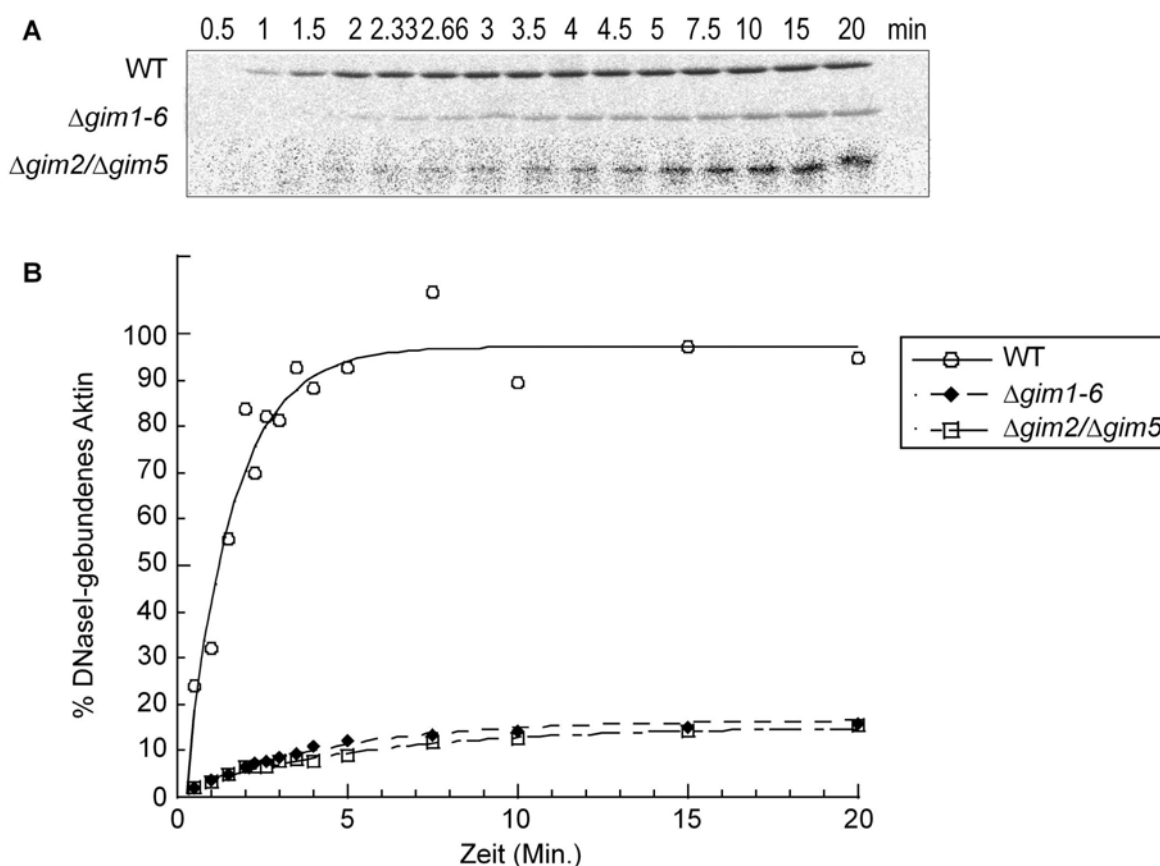
**Tabelle 3. 2: Zusammenfassung der *in vivo* Charakterisierung**

GimC-Untereinheit	Interaktion mit Tubulinen	Interaktion mit Aktin
Gim1p	+	++
Gim2p	+	+++
Gim3p	+	++(+)
Gim4p	-	++
Gim5p	++++	++++
Gim6p	-	+

+ wichtig für Interaktion, - unwichtig für Interaktion

### 3.2.3.3 Funktionelle Tests *in vivo* (Aktinfaltungskinetik)

Die Messung der Aktinfaltungskinetik (2.2.4.1) erlaubt die direkte Untersuchung der Geschwindigkeit und Effizienz der *de novo* Synthese nativen Aktins in lebenden Zellen. Für dieses Experiment werden Zellen der zu testenden Hefestämme spheroplastiert und anschliessend in Medium ohne Methionin und Cystein für diese Aminosäuren ausgehungert. Zur radioaktiven Markierung neu-synthetisierter Proteine wird zum Zeitpunkt 0 eine Mischung von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin und Cystein zugegeben. Nach weiteren 80 Sek. werden Translation und Einbau der radioaktiven Aminosäuren durch Zugabe von Cycloheximid und eines Überschusses an nicht-markiertem Methionin und Cystein gestoppt. Zu definierten Zeitpunkten, nach Zugabe der Radioaktivität, werden Proben entnommen und mit hypotonem IP-Puffer vermischt. Dieser bewirkt die sofortige Lyse der Spheroplasten. Das Lysat wird zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus diesen Proben wird im Anschluss natives Aktin mit Hilfe immobilisierter DNaseI präzipitiert. Dabei macht man sich zu Nutze, dass DNaseI spezifisch natives Aktin, nicht jedoch naszierende oder nicht-native Aktinketten bindet. Die Präzipitate werden per SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele getrocknet und die radioaktiven Signale durch Exposition eines Phosphorimager Screens detektiert. Die Quantifizierung des DNaseI-gebundenen, radioaktiven Aktins ermöglicht die direkte Messung der Geschwindigkeit und Effizienz der Bildung und Faltung neu-synthetisierten Aktins. Zur Auswertung wird die relative Menge DNaseI-gebundenen Aktins gegen die Zeit aufgetragen. Der Sättigungswert der, für den Wildtyp gemessenen Kurve wird dabei auf 100% gesetzt (Abb. 3.40).



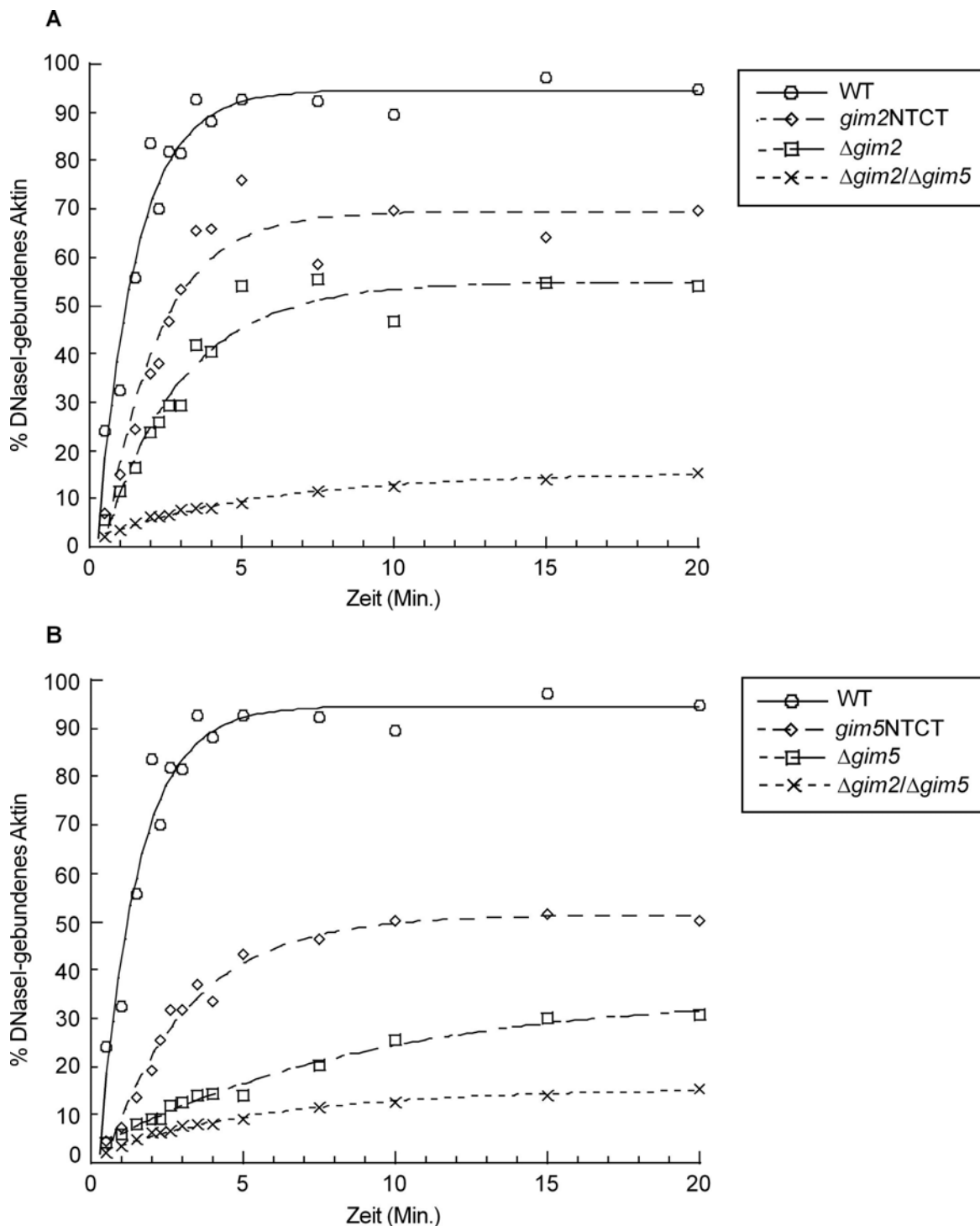
**Abb. 3.40: Effekt des Verlustes der GimC-Funktion auf die Aktinfaltungskinetik**

Die Geschwindigkeit und Effizienz der *de novo* Synthese von Aktin des Wildtypstammes YPH499, des GimC-Deletionsstammes KSY117 ( $\Delta gim1-6$ ) und des  $\Delta gim2/\Delta gim5$ -Stammes KSY210 wurden verglichen. Die, nach der Präzipitation nativen Aktins mit immobilisierter DNaseI, im Autoradiogramm detektierten Signale (A), wurden mit Hilfe der AIDA-Software quantifiziert. Zur graphischen Auftragung der erhaltenen Werte wurde das Programm Kaleidagraph verwendet (B).

In dem in Abb. 3.40 gezeigten Experiment wurde der Beitrag, den GimC generell zur *de novo* Synthese von Aktin liefert, untersucht. Dazu wurde die Kinetik der Aktinfaltung im Wildtypstamm YPH499, in einen Stamm, in dem alle 6 GimC-Untereinheiten deletiert sind ( $\Delta gim1-6$ , KSY117) und in einem Stamm, dem die für die zentralen  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p codierenden Gene fehlen ( $\Delta gim2/\Delta gim5$ , KSY210), untersucht.

Obwohl die GimC-codierenden Gene nicht essentiell sind, verdeutlicht dieses Beispiel eindrucksvoll die Bedeutung des Gim-Komplexes bei der *de novo* Synthese von Aktin. Während das gesamte Aktin, das in den 80 Sekunden des radioaktiven Pulses translatiert wurde in der Wildtyp-Situation nach nur ca. 1-2 Min. korrekt gefaltet und an DNaseI gebunden vorliegt, ist sowohl die Geschwindigkeit der Aktinfaltung, als auch die Ausbeute an gefaltetem Aktin in Zellen ohne funktionelles GimC stark reduziert (ca. 5-fach). Dabei verhält sich der GimC-Deletionsstamm ( $\Delta gim1-6$ ) genauso, wie der Stamm, dem nur die  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\Delta gim2/\Delta gim5$ ) fehlen. Dieser Befund unterstreicht nochmals die Bedeutung der zentralen  $\alpha$ -Untereinheiten für den Komplexaufbau. Betrachtet man dagegen den Effekt von Mutanten, bei

denen nur eine der zentralen Untereinheiten, Gim2p oder Gim5p, verändert ist, auf die *de novo* Synthese von Aktin, so zeigt sich wiederum (vgl. LatrunculinA, 3.2.3.1), dass die Deletion einer ganzen Untereinheit drastischere Auswirkungen hat, als die Verkürzung der  $\alpha$ -helikalen Enden (Abb. 3.41).



**Abb. 3.41: Vergleich der Aktinfaltungskinetik von *GIM2* und *GIM5*-Mutanten**

Deletions- und Verkürzungsmutanten in *GIM2* (A) und *GIM5* (B) wurden bezüglich der Geschwindigkeit und Effizienz der *de novo* Synthese von Aktin mit dem Wildtypstamm YPH499 (WT) und dem  $\Delta$ *gim2*/ $\Delta$ *gim5*-Stamm KSY210 verglichen.

Das Fehlen einer  $\alpha$ -Untereinheit alleine, führt jedoch noch nicht zum völligen Funktionsverlust. Daraus kann man, in Übereinstimmung mit den bereits dargestellten Co-Präzipitationsversuchen zur Untersuchung des Komplexaufbaus (Abb. 1.6) ableiten, dass in diesem Fall Teilkomplexe gebildet werden, die, in eingeschränktem Maße, dazu in der Lage sind, ungefaltete Aktinketten zu binden und an TRiC zu übergeben. Im direkten Vergleich dieser Mutanten wird deutlich, dass die Teilkomplexe funktionell sehr unterschiedlich sind. So können in Abwesenheit von Gim5p (Abb. 3.41B) nur ca. 30% des im Vergleich zum Wildtyp translatierten Aktins korrekt gefaltet und an DNaseI gebunden werden. Auch die Geschwindigkeit der Aktinfaltung, die an der Steigung der Kurve abzulesen ist, ist in diesem Fall gegenüber dem Wildtyp stark reduziert. Im Gegensatz dazu, erreichen im *gim2*-Deletionsstamm ( $\Delta gim2$ , Abb. 3.41A) immerhin rund 50% der translatierten Aktin-Polypeptide den nativen Zustand.

Wie bereits ausgeführt, ist der Komplexaufbau bei den Verkürzungsmutanten nicht beeinträchtigt, der Einfluss der jeweiligen Mutation anhand der Aktinfaltungskinetik also direkt ablesbar. Der Vergleich des Effekts der Verkürzungsmutanten in *GIM2* (A) und *GIM5* (B) verdeutlicht, dass die Gim5p-Untereinheit für Generierung nativen Aktins tatsächlich wichtiger zu sein scheint, als Gim2p. Während, trotz des Fehlens der hydrophoben Enden der Gim2p-Untereinheit (*gim2NTCT*), noch 70% des translatierten Aktins den nativen Zustand erreichen, kann im *gim5NTCT*-Hintergrund nur noch die Hälfte des gebildeten Aktins korrekt gefaltet werden.

### 3.2.4 Expression und Reinigung verschiedener Gim-Komplexe

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Reduktion der Geschwindigkeit und Effizienz der *de novo* Synthese nativen Aktins durch die Verkürzung der hydrophoben Enden der Gim2p- und Gim5p-Untereinheit tatsächlich auf einer Beeinträchtigung der Interaktion von GimC dem ungefalteten Substrat beruht, sollte die Bindung von GimC an Aktin (und im Weiteren auch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin) durch *in vitro* Experimente mit gereinigten Komponenten genauer betrachtet werden. Dazu sollten, neben dem Wildtyp-Komplex, verschiedene Mischkomplexe mit einer oder mehreren verkürzten Untereinheiten aus der Hefe gereinigt werden.

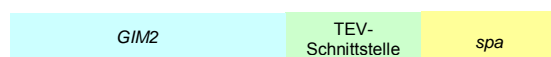
Da GimC in Hefezellen nicht sehr abundant ist (ca. 0,001% der löslichen Proteinfraction), wurden verschiedene Hefestämme hergestellt, die die effiziente Überproduktion sowohl des Wildtyp-Komplexes, als auch beliebiger Mischkomplexe aus unveränderten und verkürzten Untereinheiten ermöglichen. Basierend auf einer bereits etablierten Methode zur Reinigung nativer Mengen GimC aus der Hefe (Siegers and Schiebel, 2000), wurde ein

Reinigungsprotokoll entwickelt, mit Hilfe dessen die überproduzierten Proteine als Komplexe mit sehr hohem Reinheitsgrad aus der Hefe isoliert werden können.

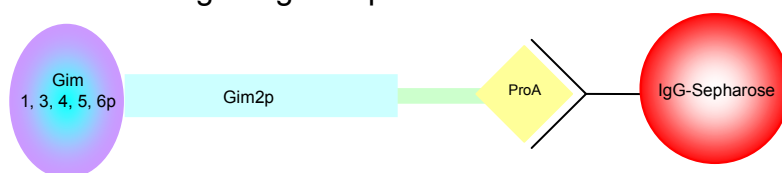
### 3.2.4.1 Konventionelle Reinigung von GimC

Zum besseren Verständnis der Überlegungen, die letztendlich der Entwicklung der verwendeten Expressionsstämme und Reinigungsstrategie zugrunde lagen, soll hier kurz das Prinzip der Reinigung endogener Mengen des Wildtyp-Komplexes erläutert werden (Siegers and Schiebel, 2000). Für die Reinigung wurde ein haploider Hefestamm verwendet, in dem das *GIM2*-Gen auf chromosomaler Ebene mit einer für ProteinA codierenden Sequenz aus *Staphylococcus aureus* (*spa*) fusioniert ist (KSY89, *GIM2*-TEV-*spa*). Eine dazwischenliegende Erkennungssequenz für die TEV-Protease erlaubt die Abspaltung des ProteinA-Anhangs. Nach Lyse der Zellen wurde der Komplex durch Bindung der Epitop-markierten Gim2p-Untereinheit an IgG-Sepharose angereichert. ImmunglobulinG (IgG) interagiert spezifisch mit ProteinA (ProA). Nach Entfernung ungebundener Proteine durch Waschen, wurde der Komplex durch Inkubation mit TEV-Protease freigesetzt. Protease und Komplex wurden durch eine abschliessende Gelfiltration voneinander abgetrennt (Abb. 3.42).

#### Chromosomal integriertes *GIM2*-TEV-ProteinA Konstrukt



#### Lyse und Bindung an IgG-Sepharose



#### Freisetzung des Komplexes durch Spaltung mit TEV-Protease



#### Entfernen der TEV-Protease durch Gelfiltration

**Abb. 3. 42: Schematische Darstellung der konventionellen Reinigungsstrategie für Wildtyp-GimC**  
Wildtyp-GimC wurde über Affinitätschromatographie mit IgG-Sepharose aus Zellen des Stammes KSY89 (*GIM2*-TEV-*spa*) angereichert. Nach Abspaltung des Epitops mittels TEV-Protease wurde diese durch Gelfiltration vom freigesetzten Komplex abgetrennt.



Obwohl der Komplex mit Hilfe dieser Methode in sehr hohem Reinheitsgrad aus der Hefe isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt), war es nicht möglich, dieses Protokoll erfolgreich im Großmaßstab anzuwenden (vgl. 2.2.3.12). Probleme traten vor allem bei der TEV-Spaltung auf, die auch bei sequentieller Protease-Behandlung kleinerer Sepharosealiquots nicht vollständig war. Zusätzlich trugen verschiedene Konzentrierungsschritte, die durch den Großmaßstab nötig wurden, zum Proteinverlust bei. Daher konnten nur ca. 30% des im Lysat enthaltenen GimC am Ende der Reinigung gewonnen werden. Bei 500 g Zellmasse, die als Ausgangsmaterial für die Reinigung dienten, entsprach dies ca. 40 µg. Unter der Annahme dass 75% der im Lysat enthaltenen Proteine löslich, und 0,001% davon GimC sind, wäre eine Ausbeute von 160 µg GimC erwartet worden.

Generell hat die Anwendung dieser Methode jedoch gezeigt, dass es möglich ist, den gesamten Gim-Komplex durch Affinitätsreinigung über einen Epitop-tag an nur einer Untereinheit aus Zelllysaten anzureichern. Daher wurde, ausgehend von diesem Prinzip ein Protokoll entwickelt, dass es erlaubt, große Mengen GimC für *in vitro* Experimente effizient aus der Hefe zu isolieren.

### 3.2.4.2 Konstruktion eines Überexpressionsstammes für Wildtyp-GimC

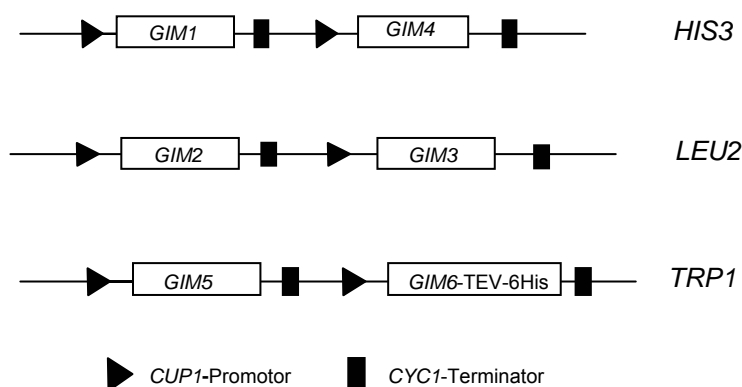
Um den Gim-Komplex effizient und in ausreichenden Mengen aus der Hefe reinigen zu können, musste zunächst der GimC-Gehalt in den Zellen erhöht werden. Eine einfache Methode stellt hier die Überexpression der Zielgene unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors dar.

Im Hefesystem hat sich zu diesem Zweck vor allem das Galaktose-System (unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors) bewährt. Durch Zugabe von Galaktose zum Medium wird die Expressionsrate der Zielgene ca. 1000-fach erhöht (Johnston and Davis, 1984). Jedoch ist die Handhabung dieses Systems vergleichsweise aufwändig und teuer, da die Zellen, um Diauxie, d.h. die Repression des Galaktosestoffwechsels durch Glukose zu vermeiden, vor der Induktion in Medium ohne Glukose angezogen werden müssen. Als alternative Kohlenstoffquelle für die Anzucht vor der Induktion wird in der Regel Raffinose verwendet, die, genauso wie Galaktose, sehr teuer ist.

Eine kostengünstigere, ähnlich effektive Alternative hierzu stellt das Kupfersystem unter der Kontrolle des *CUPI*-Promotors dar. Das Metallothionein-Gen (*CUPI*) der Hefe codiert ein cysteinreiches Metall-bindendes Protein, das den Zellen Resistenz gegenüber Kupfer und Cadmium vermittelt. Die Transkription des *CUPI*-Gens ist durch die Zugabe von Kupfersalzen ins Medium steuerbar. So wird das System bei Zugabe von 100 µM Kupfersulfat stark (ca. 50-fach) induziert (Butt et al., 1984; Mascorro-Gallardo et al., 1996). Da der *CUPI*-Promotor, im Gegensatz zum *GALI*-Promotor, jedoch auch ohne Induktion eine relativ hohe

Basalaktivität zeigt, ist die Expressionsrate unter Kupfer-Kontrolle durchaus mit den im Galaktose-System erzielten Raten vergleichbar. Durch Verwendung von  $2\mu$ -Multicopy-Plasmiden kann die Ausbeute des unter der Kontrolle des Kupferpromotors überproduzierten Proteins noch weiter gesteigert werden.

Um Wildtyp-GimC im Kupfersystem zu exprimieren, wurden die sechs für GimC-Untereinheiten codierenden Gene in p*CUPI*-Vektoren kloniert. Dazu wurden die Gene paarweise in  $2\mu$ -Plasmiden kombiniert, wobei jedes Gen unter die Kontrolle eines eigenen Promotor/Terminator-Paares (*CUPI*/*CYC1*) gestellt wurde (Abb. 3.43).



**Abb. 3. 43: Schematische Darstellung der Expressionsplasmide für Wildtyp-GimC**

Zur Überproduktion von GimC unter der Kontrolle des induzierbaren *CUPI*-Systems wurden die sechs für GimC-Untereinheiten codierenden Gene paarweise in  $2\mu$ -p*CUPI*-Vektoren kloniert. Dabei wurde jedes Gen unter die Kontrolle eines eigenen Promotor-/Terminator-Paares gestellt.

Um die schnelle und einfache Isolierung des Komplexes durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Sepharose zu ermöglichen, wurde das *GIM6*-Gen mit einem TEV-spaltbaren 6His-tag fusioniert. Der Komplex kann mit Imidazol von der Matrix freigesetzt und das Epitop, wenn nötig, im Anschluss durch Behandlung mit TEV-Protease abgespalten werden. Diese Änderung der bisherigen Reinigungsstrategie, trägt zur Steigerung der Ausbeute bei. Die Freisetzung des Komplexes von der Matrix mittels TEV-Spaltung wird umgangen und somit Verluste durch ineffiziente Elution vermieden (vgl. 3.2.4.1). Für die Epitop-Markierung wurde die Gim6p-Untereinheit ausgewählt, da deren Veränderung in den *in vivo* Experimenten (3.2.3) kaum Auswirkungen auf das Aktin- und Tubulinsystem der Zellen hatte. Dazu wurde das *GIM6*-Gen zunächst im Wildtyp-Stamm YPH499 auf chromosomaler Ebene mit einem TEV-6His-tag versehen. Das Fusionskonstrukt (*GIM6-TEV-6His*) wurde durch PCR aus chromosomaler DNA des resultierenden Stammes isoliert und für die Klonierung in p*CUPI*-Vektoren eingesetzt.

Für die Expression des Komplexes sollte ein diploider Hefestamm verwendet werden. Dadurch kann die Ausbeute an Protein nochmals gesteigert werden, da diploide Zellen eine höhere Expressionskapazität haben. Daher wurde auch das *GIM6*-Gen des haploiden Wildtyp-Stammes

YPH500, der sich von YPH499 nur im Paarungstyp (*MAT $\alpha$*  statt *MATa*) unterscheidet, mit dem TEV-6His-Epitop versehen. Die haploiden Stämme wurden zunächst mit je einem GimC-Expressionsplasmid transformiert und durch Kreuzung dieser Stämme ein diploider Hefestamm mit zwei Plasmiden generiert. Schliesslich wurde der Expressionsstamm durch Transformation des diploiden Stamms mit dem dritten Expressionsplasmid vervollständigt.

Die oben dargestellte Strategie wurde gemeinsam mit Ute Zeidler im Rahmen ihrer Diplomarbeit mit dem Titel „Expression und Reinigung des Gim-Komplexes der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“ (eingereicht an der Universität Salzburg/Österreich, Anfang 2005) in die Tat umgesetzt. Gegenstand dieser Arbeit war u.a. die Epitop-Markierung der Hefestämme und die Überprüfung deren Funktionalität im Benomylistest, die Klonierung der Expressionsplasmide, die Generierung des diploiden Expressionsstammes und die Reinigung von GimC nach Überexpression.

In Tabelle 3.3 sind diejenigen Hefestämme und Plasmide aufgelistet, die im Rahmen dieser Diplomarbeit hergestellt und im weiteren Verlauf des Projektes verwendet wurden.

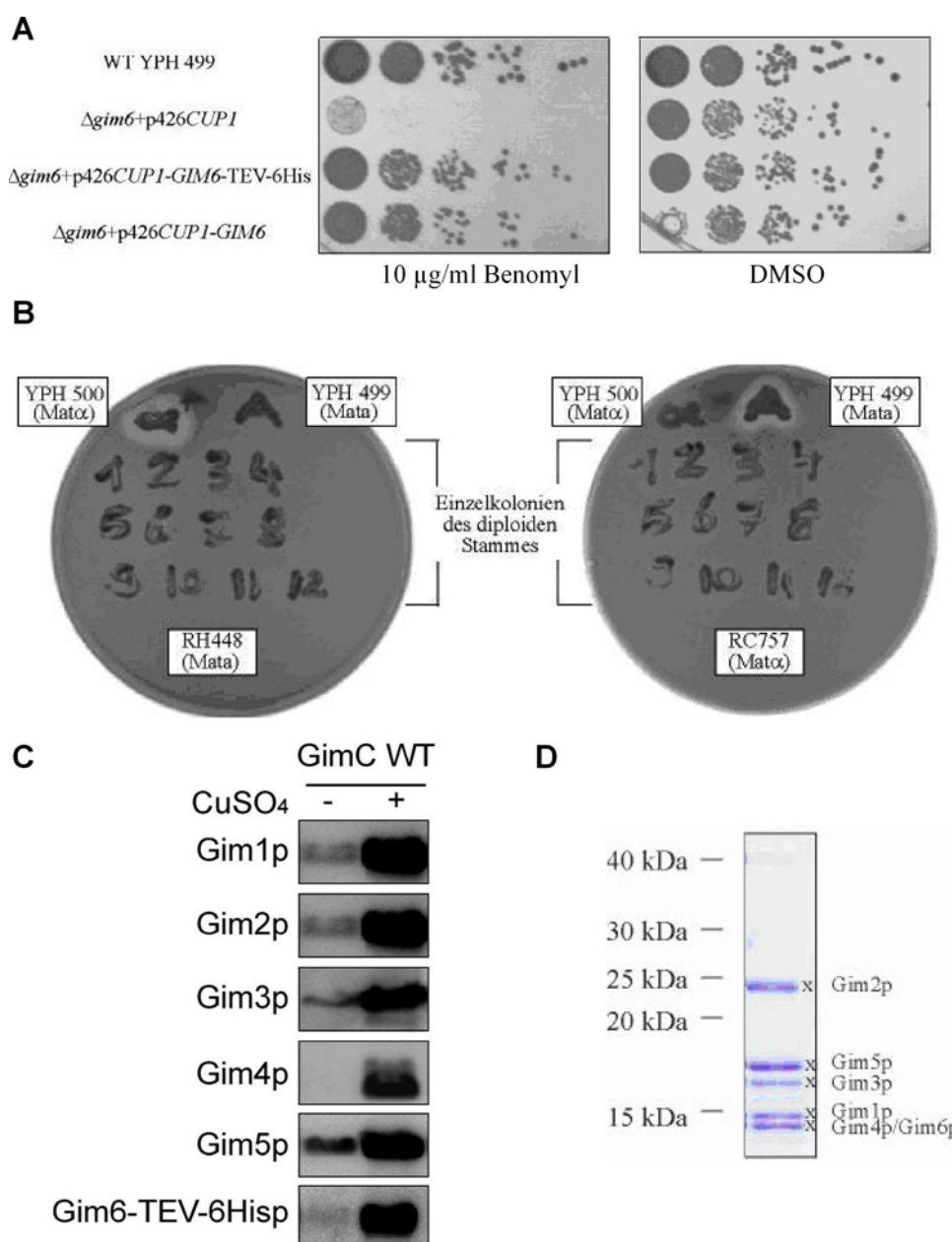
### **3. 3: Relevante Plasmide und Hefestämme aus der Diplomarbeit von Ute Zeidler**

<b>Name</b>	<b>Hefe/DNA</b>	<b>Relevanter Genotyp oder Beschreibung</b>
UZY5	YPH499	<i>MATa gim6::GIM6-TEV-6His</i>
UZY6	YPH500	<i>MAT<math>\alpha</math> gim6::GIM6-TEV-6His</i>
UZY10	UZY5 x UZY6	<i>MATa/ MAT<math>\alpha</math> gim6::GIM6-TEV-6His/gim6::GIM6-TEV-6His</i> pUZ5, pUZ11, pUZ10 (s.u.)
pUZ1	Plasmid	p424 <i>CUP1-GIM3</i>
pUZ5	Plasmid	p425 <i>CUP1-GIM2-CUP1-GIM3</i>
pUZ8	Plasmid	p426 <i>CUP1-GIM6-TEV-6His</i>
pUZ9	Plasmid	p423 <i>CUP1-GIM4</i>
pUZ10	Plasmid	p423 <i>CUP1-GIM1-CUP1-GIM4</i>
pUZ11	Plasmid	p424 <i>CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind in Abb. 3.44 dargestellt; die Teilabbildungen sind im Wesentlichen der Arbeit von U. Zeidler entnommen.

Zunächst wurden, durch Intergration einer TEV-6His-Epitop-Kassette an den *GIM6*-Locus der Hefestämme YPH499 (*MATa*) und YPH500 (*MAT $\alpha$* ), die Stämme UZY5 und UZY6 hergestellt, die als Ausgangspunkt für die Herstellung des diploiden Expressionsstammes dienen. Im Anschluss wurde das *GIM6*-Fusionsgen mittels PCR aus chromosomaler DNA von UZY5 isoliert und in p426*CUP1* eingebracht. Das entstandene Konstrukt (pUZ8), wurde im Benomylistest bezüglich der funktionellen Komplementation des  $\Delta$ *gim6*-Phänotyps getestet (Abb. 3.44A). Zur Herstellung des Expressionsstammes wurden die haploiden Ausgangsstämme UZY5 und UZY6 zunächst mit jeweils einem Expressionsplasmid (UZY5 mit pUZ5 und UZY6 mit pUZ11) transformiert, und positive Transformanden gekreuzt. Der Paarungstyp der

resultierenden Stämme wurde, wie unter 2.2.1.10 beschrieben, überprüft (Abb. 3.44B). Während haploide Stämme bei Kontakt mit Zellen des Testerstammes entgegengesetzten Paarungstyps Hemmhöfe ausbilden (siehe obere Zeile der Testplatten), erzeugen diploide Zellen mit keinem der beiden Testerstämme Hemmhöfe (s. Klone 1-12), da sie keine Pheromone sekretieren. Die getesteten Klone (1-12) waren also alle diploid. Zum Abschluss wurde der diploide Stamm mit dem noch fehlenden Expressionsplasmid (pUZ10) transformiert.



**Abb. 3. 44: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zum Thema „Expression und Reinigung des Gim-Komplexes der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“**

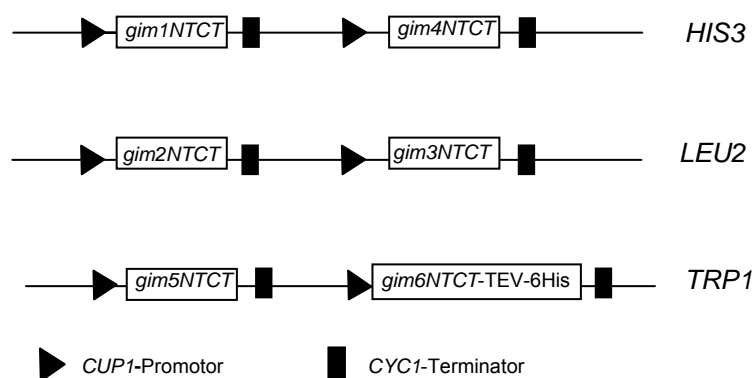
(A) Überprüfung der Funktionalität von *GIM6-TEV-6His* durch Untersuchung der Benomylsensitivität ohne und mit 10 µg/ml Benomyl. (B) Überprüfung des Paarungstyps nach der Kreuzung zur Herstellung eines diploiden GimC-Expressionsstammes. (C) Westernblot zur Expression der GimC-Gene im Kupfersystem mit (+) und ohne (-) Induktion mit 100 µM CuSO<sub>4</sub>. (D) SDS-PAGE des gereinigten Gim-Komplexes.

Alle sechs GimC-Untereinheiten konnten in diesem Stammhintergrund effizient überproduziert werden. Abb. 3.44C zeigt Westernblots zum Nachweis der GimC-Untereinheiten vor (-) und nach (+) 4 Std. Induktion mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Die unterschiedlich erscheinenden Basallevel der Expression der GimC-Untereinheiten beruhen auf der Qualität der Antigenerkennung durch die verschiedenen GimC-Antikörper. Abb. 3.44D schließlich zeigt den erfolgreich und zu hohem Grad gereinigten Komplex.

### 3.2.4.3 Konstruktion eines Überexpressionsstammes für GimC-Verkürzungsmutanten

Um die Expression und Reinigung von Gim-Komplexen mit einer oder mehreren verkürzten Untereinheiten zu ermöglichen, wurde ein Konzept erarbeitet, bei dem die verkürzten GimC-Untereinheiten, analog zum Wildtyp, im Kupfersystem überproduziert, und der Komplex mit Hilfe eines Epitop-tags aus Zellextrakten isoliert werden kann.

Um die verkürzten GimC-Untereinheiten in der Hefe überproduzieren zu können, wurden diese ebenfalls paarweise in  $2\mu\text{-pCUP1}$  Plasmide eingebracht (Abb. 3.45).

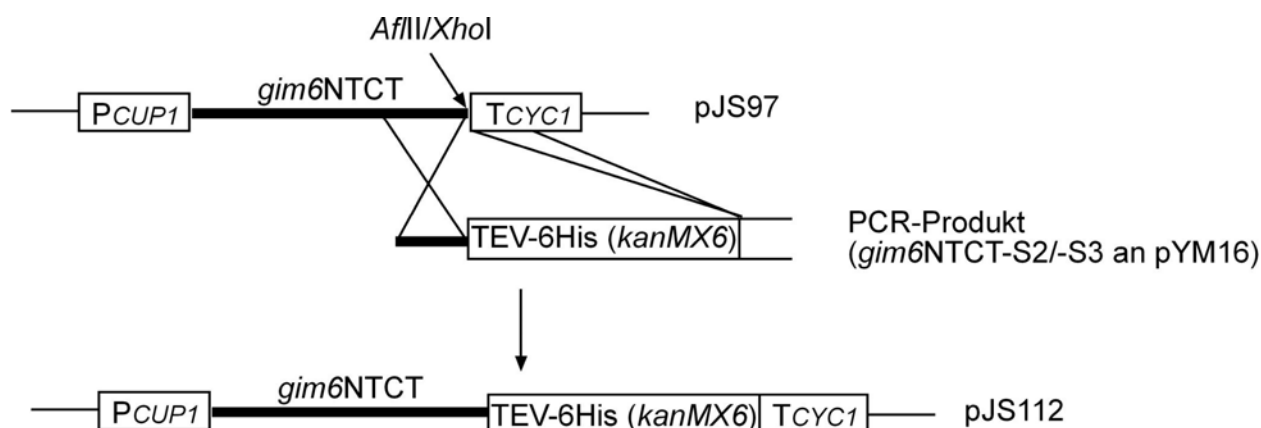


**Abb. 3. 45: Schematische Darstellung der Plasmidkonstrukte zur Expression von GimC-Mutanten**

Analog zu den für die Expression von Wildtyp-GimC erzeugten Plasmiden, wurden die für GimC-Verkürzungsmutanten codierenden Gene paarweise in  $2\mu\text{-pCUP1}$ -Plasmide kloniert, wobei jedes einzelne Gen unter die Kontrolle eines *CUP1*-Promotor/*CYC1*-Terminator-Paares gestellt wurde.

Auch hier trägt die Gim6p-Untereinheit den Epitop-tag, der über *gap repair* (2.2.1.13) an *gim6NTCT* angehängt wurde (Abb. 3.46). Dazu wurde der offene Leserahmen von *gim6NTCT* zunächst aus pJS6 (p415*ADH-gim6NTCT*) in p426*CUP1* umklontiert (pJS97). Die Epitop-Kassette wurde mittels spezifischer Primer (*gim6NTCT-S2/gim6NTCT-S3*) aus pYM16 (TEV-6His; *kanMX6*) amplifiziert. Im PCR-Produkt wird der Epitop-tag von jeweils ca. 40 bp flankiert, die zum 3'-Ende des *gim6NTCT*-Gens und zum 5'-Ende des *CYC1*-Promotors homolog sind. Für die *gap repair* wurde pJS97 durch Restriktion mit *AflIII* und *XhoI* linearisiert

(dabei wird ein 8 bp großes Fragment aus dem Vektor ausgeschnitten) und zusammen mit dem PCR-Produkt durch Transformation in KSY86 ( $\Delta gim6::His3MX6$ ) eingebracht (2.2.1.11.1).



**Abb. 3. 46: Schematische Darstellung der gap repair zur Erzeugung von pJS112**

Um einen TEV-6His-tag an *gim6NTCT* anzuhängen, wurde dieser mittels *gim6NTCT*-S2/-S3-Primern an pYM16 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde, zusammen mit dem *AflIII/XhoI* linearisierten Vektor pJS97, der *gim6NTCT* codiert, durch Transformation in KSY86 ( $\Delta gim6$ ) eingebracht, wo das Plasmid durch homologe Rekombination mit der Epitop-Kassette rezirkularisiert wurde.

Positive Transformanten wurden auf SC-URA-Platten identifiziert. Damit die Zellen auf dem Selektionsmedium überleben können, muss die Lücke im Plasmid durch homologe Rekombination mit der PCR-Kassette geschlossen und somit der Epitop-tag an das Gen fusioniert werden (pJS112). Die Funktionalität des Fusionsproteins wurde im Benomylistest überprüft (Daten nicht gezeigt).

Zur Herstellung der Expressionsplasmide, wurden die verkürzten *GimC*-Gene meist zunächst einzeln in pCUP1-Plasmide kloniert und anschließend mitsamt Promotor und Terminator zu den entsprechenden Kombinationen umkloniert. Bei der Klonierung der Verkürzungsmutanten wurde darauf geachtet, dass die Kombination der Gene und Auxotrophiemarker der der Expressionsplasmide für den Wildtyp-Komplex entspricht. Zusammen mit Plasmiden, die einzelne *GimC*-Untereinheiten unter Kontrolle des Kupferpromotors codieren, wurde so ein Plasmidsortiment geschaffen, das unter Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Auxotrophiemarker, die Expression verschiedenster Mischkomplexe die nur eine, aber auch bis zu sechs verkürzte Untereinheiten enthalten können, erlaubt. Die Auswahl eines geeigneten Hefestammes zur Überexpression richtete sich hierbei nach dem zu exprimierenden Mischkomplex. In der Regel war es ausreichend, Stämme zu verwenden, bei denen die Gene für veränderte Untereinheiten chromosomal deletiert waren, womit das Auftreten inhomogener Komplexe vermieden wurde.

### 3.2.5 Expression und Reinigung ausgewählter Komplexe

Um den Einfluss der  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p auf die Interaktion von GimC mit den Haupts substraten Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin *in vitro* zu testen, wurden Hefestämme generiert, die die Expression von Mischkomplexen erlauben, in denen Gim2p, Gim5p einzeln oder Gim2p und Gim5p zusammen in verkürzter Form vorliegen. Ursprünglich sollte auch ein Mischkomplex, in dem die Gim1p-Untereinheit verkürzt ist, zum Vergleich in die Studie miteinbezogen werden. Als Ausgangspunkt wurde daher ein Stamm gewählt, in dem die offenen Leserahmen der Gene *GIM2*, *GIM5* und *GIM1* chromosomal deletiert sind (JSY51). Dieser sollte ermöglichen, die verschiedenen zu testenden Mischkomplexe im selben Stammhintergrund zu exprimieren. Der GimC INTCT-Mischkomplex wurde schliesslich jedoch nicht mehr verwendet, da der gereinigte Komplex in Lösung nicht stabil war, zur Aggregation neigte und somit in *in vitro* Experimenten nicht eingesetzt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

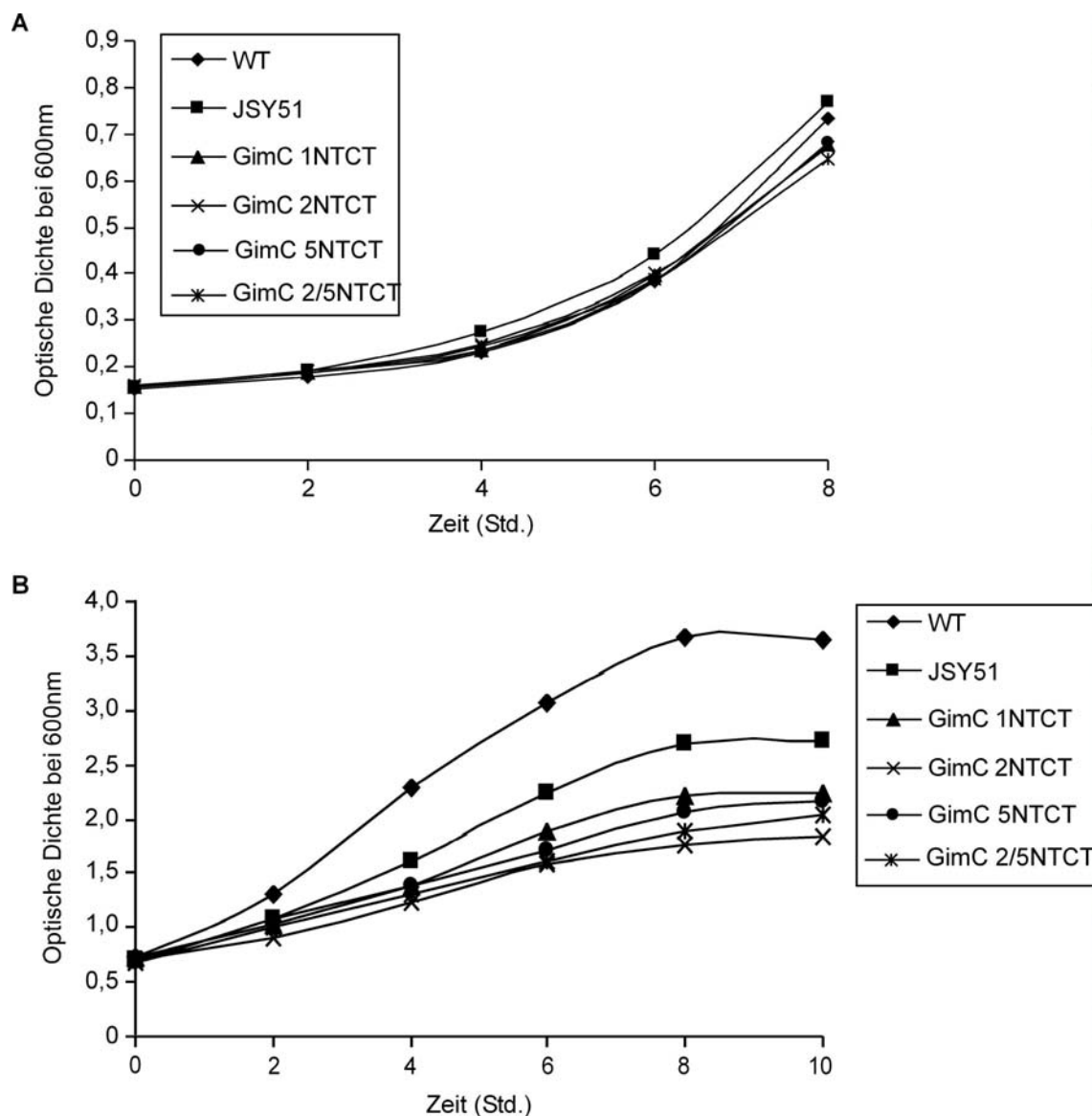
Zur Generierung der Mischkomplexe wurde JSY51 mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten Plasmiden transformiert.

**Tabelle 3. 4: Plasmidkombinationen zur Expression von GimC-Mischkomplexen**

Komplex	Stamm	Plasmide	Beschreibung
GimC INTCT	JSY70	pUZ9 pGS33 pUZ5 pJS124	p423 <i>CUP1-GIM4</i> p424 <i>CUP1-gimINTCT</i> p425 <i>CUP1-GIM2-CUP1-GIM3</i> p426 <i>CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>
GimC 2NTCT	JSY72	pUZ10 pUZ1 pJS96 pJS124	p423 <i>CUP1-GIM1-CUP1-GIM4</i> p424 <i>CUP1-GIM3</i> p425 <i>CUP1-gim2NTCT</i> p426 <i>CUP1-GIM5-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>
GimC 5NTCT	JSY73	pUZ10 pJS93 pUZ5 pUZ8	p423 <i>CUP1-GIM1-CUP1-GIM4</i> p424 <i>CUP1-gim5NTCT</i> p425 <i>CUP1-GIM2-CUP1-GIM3</i> p426 <i>CUP1-GIM6-TEV-6His</i>
GimC 2/5NTCT	JSY74	pUZ10 pJS93 pJS96 pJS126	p423 <i>CUP1-GIM1-CUP1-GIM4</i> p424 <i>CUP1-gim5NTCT</i> p425 <i>CUP1-gim2NTCT</i> p426 <i>CUP1-GIM3-CUP1-GIM6-TEV-6His</i>

Die auf diese Weise erzeugten Hefestämme, wurden zunächst bezüglich ihres Wachstums in Medium ohne und mit 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> mit dem Stamm zur Expression des Wildtyp-Komplexes (UZY10) und dem Ausgangsstamm verglichen, um eventuelle Wachstumsdefekte auszuschliessen und die optimale Induktionszeit zu bestimmen. Um die Stämme im selben Medium (SC-HIS-TRP-LEU-URA) vergleichen zu können, wurde UZY10 zuvor mit p426*CUP1* und JSY51 mit allen vier p*CUP1*-Plasmiden (p423-, p424-, p425- und p426*CUP1*) transformiert. Zur Messung der Wachstumskurve, wurden Übernachtskulturen der Stämme UZY10 (WT), JSY51, JSY70 (GimC INTCT), JSY72 (GimC 2NTCT), JSY73 (GimC 5NTCT) und JSY74

(GimC 2/5NTCT) in Selektionsmedium auf eine optische Dichte von 0,15-0,2 verdünnt, und bei 30°C inkubiert. Im Abstand von 2 Std. wurden Proben genommen, die OD<sub>600</sub> bestimmt und gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Bei Erreichen von ca. 0,6 OD<sub>600</sub> wurden die Kulturen gesplittet und einer Hälfte Kupfersulfat zu einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben. Diese Kulturen wurden weitere 10 Std. beobachtet (Abb. 3.47). Die Verdopplungszeit ( $t_D$ ) der Stämme wurde im linearen Bereich der Wachstumskurve bestimmt und ist in Tabelle 3.5 angegeben.



**Abb. 3. 47: Wachstumskurven der GimC-Expressionsstämme ohne und mit 100 µM CuSO<sub>4</sub>**

Das Wachstum der Stämme UZY10 (WT), JSY51, JSY70 (GimC 1NTCT), JSY72 (GimC 2NTCT), JSY73 (GimC 5NTCT) und JSY74 (GimC 2/5NTCT) wurde im Medium ohne (A) und mit 100 µM CuSO<sub>4</sub> (B) über einen Zeitraum von 8-10 Std. verfolgt. Im Abstand von 2 Std. wurden Proben genommen, die OD<sub>600</sub> bestimmt und gegen die Zeit graphisch aufgetragen.



**Tabelle 3. 5: Verdopplungszeiten der GimC-Expressionsstämme**

Stamm	Komplex	t <sub>D</sub> ohne CuSO <sub>4</sub> (Std.)	t <sub>D</sub> mit CuSO <sub>4</sub> (Std.)
UZY10	WT	2,8	4,8
JSY51	-	3,0	4,3
JSY70	GimC 1NTCT	2,7	4,4
JSY72	GimC 2NTCT	3,0	5,6
JSY73	GimC 5NTCT	3,0	6,3
JSY74	GimC 2/5NTCT	3,0	6,9

Alle Stämme wuchsen in Medium ohne CuSO<sub>4</sub> mit einer Verdopplungszeit von ca. 3 Stunden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Wachstum der Hefen durch die Transformation mit den Expressionsplasmiden beeinflusst wurde. Nach 8-10 Std. Induktion kommt es zum „Abknicken“ der Wachstumskurve. Dies bedeutet, dass die Kultur in die stationäre Phase eintritt. In dieser Phase, in der sich Zellen aufgrund des Nährstoffmangels im Medium nur noch sehr langsam teilen, beginnen sie alle nicht lebensnotwendigen Proteine, und damit auch den überexprimierten Gim-Komplex, abzubauen, um Energie für ihren Grundstoffwechsel zu generieren. Um maximale Ausbeuten zu erzielen und das Medium trotzdem voll auszunutzen, sollte die Kultur also nicht wesentlich über diesen Punkt hinaus inkubiert werden. Daher wurde für die Expression der Komplexe, eine Wachstumszeit von 10 Std. nach Induktion mit 100 µM CuSO<sub>4</sub> festgelegt. Die Zellen wurden jeweils in 50 Liter Kulturen angezogen. Die erhaltene Zellmasse pro Kultur lag zwischen 140 und 150 g. Die Zellen wurden nach der Ernte mit Glycerin versetzt, als Tröpfchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt (vgl. 2.2.3.13). Die Expression der Mischkomplexe unter diesen Bedingungen wurde vor der Reinigung im Westernblot überprüft (Daten nicht gezeigt).

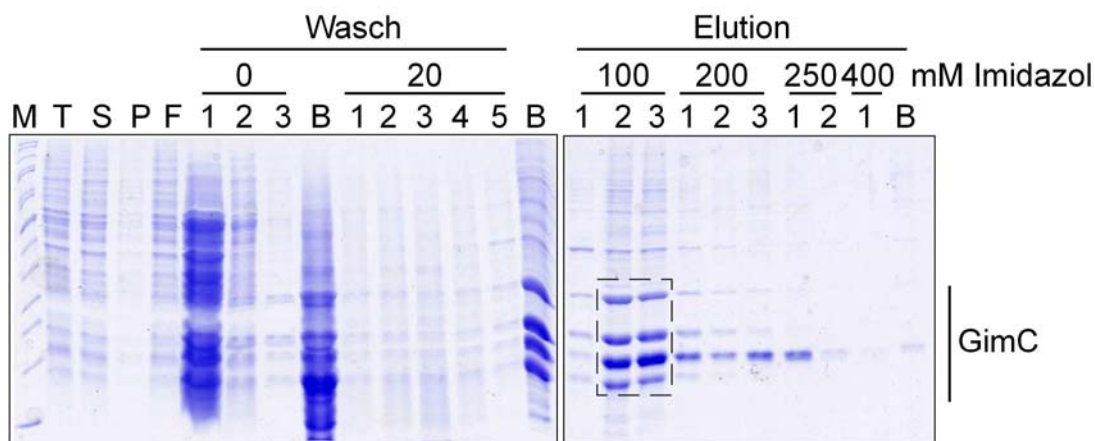
### 3.2.5.1 Reinigung des Wildtyp-Komplexes

Die Reinigung der verschiedenen Gim-Komplexe wurde, basierend auf dem etablierten Protokoll, optimiert und erfolgte im Wesentlichen für jeden Komplex nach der selben Strategie, die im Folgenden anhand der Reinigung des Wildtyp-Komplexes, der bei allen Experimenten als Kontrolle diente, erläutert wird.

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung dienten jeweils 50 g gefrorene Hefezellen. Nach Aufschluss der Zellen, wurde der löslichen Proteinfraction Ni-NTA-Sepharose zugegeben, um den Gim-Komplex mittels Affinitätschromatographie über das 6His-Epitop anzureichern. Nach Entfernen unspezifisch gebundener Proteine durch Waschen mit Puffer mit 20 mM Imidazol

wurde der Komplex schliesslich durch einen Imidazol-Stufengradienten (100, 150, 200, 400 mM Imidazol) von der Matrix eluiert.

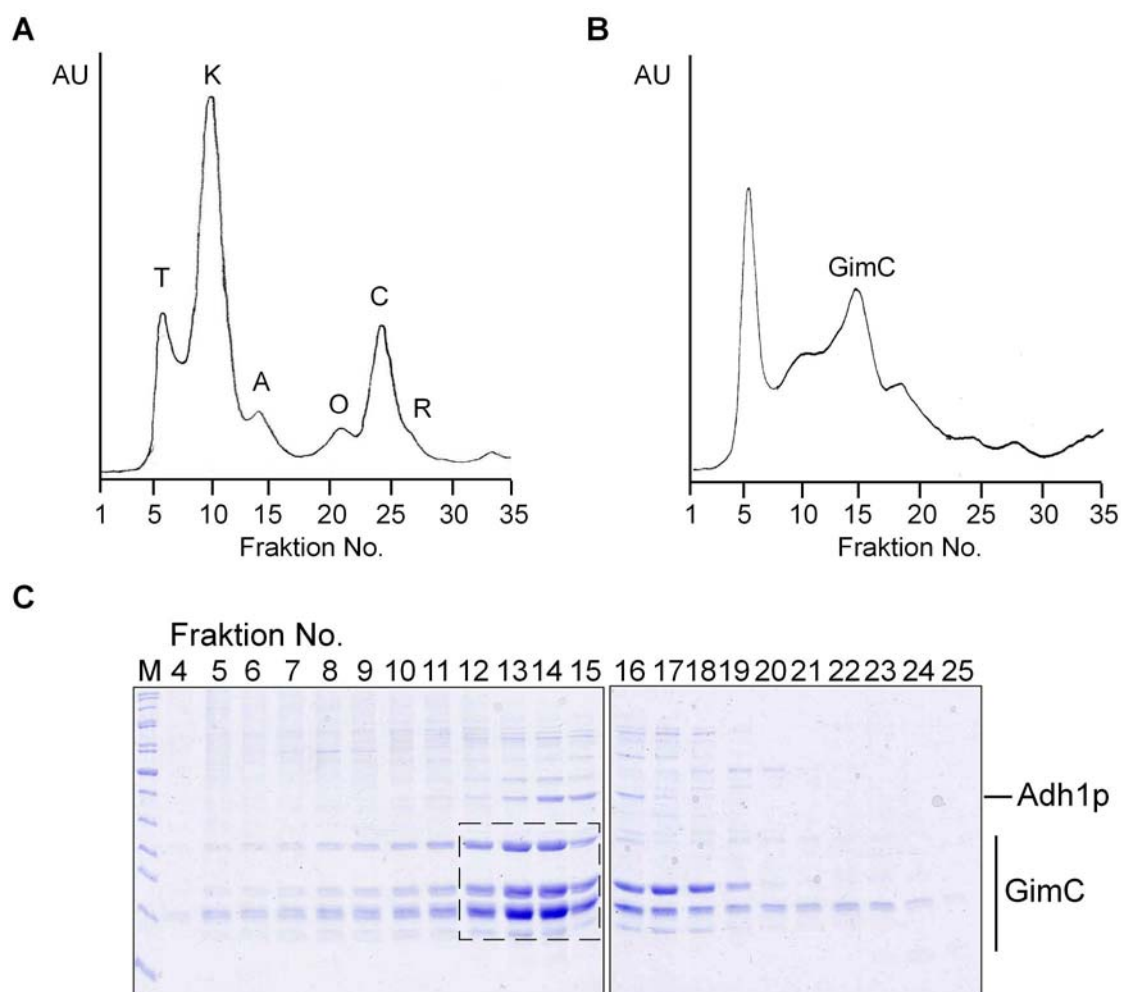
Nur in den Eluaten mit einer Imidazolkonzentration von 100 mM, konnten alle GimC-Untereinheiten per Coomassie-Färbung detektiert werden (Abb. 3.48).



**Abb. 3.48: Ni-NTA Affinitätschromatographie des Gim-Komplexes**

SDS-PAGE zur Überprüfung der Anreicherung von GimC aus Lysat des Stammes UZY10. Proben des Lysats (T), der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion, des ungebundenen Überstandes (F), sowie der Wasch- und Elutionschritte wurden zusammen mit Proben der Matrix (B) nach entscheidenden Reinigungsschritten, per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

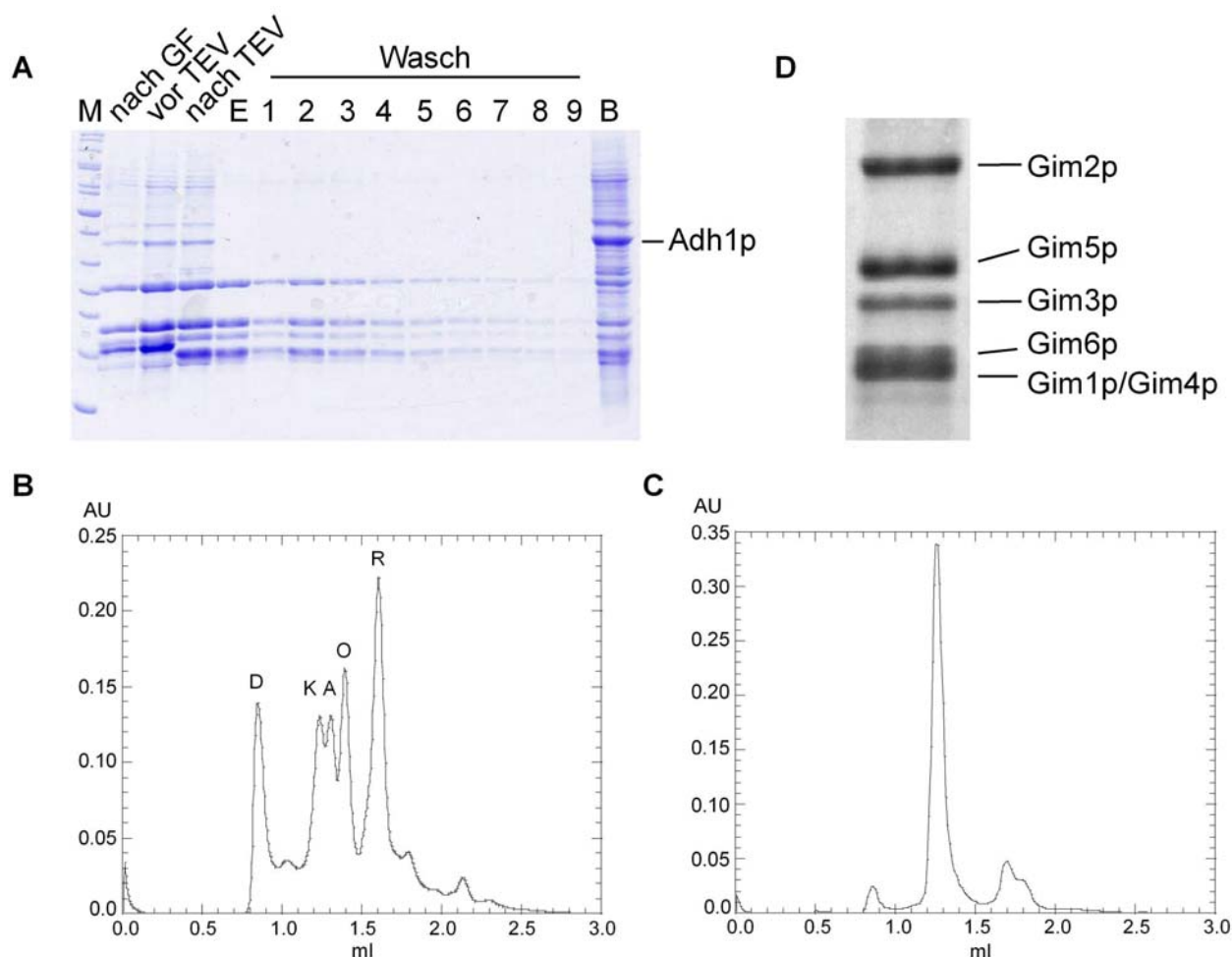
Diese Fraktionen wurden vereinigt und zur Abtrennung noch vorhandener Verunreinigungen einer Größenfraktionierung per Gelfiltration unterzogen. Die Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex200-Säule (Amersham Pharmacia). Diese trennt Proteine in einem Größenbereich von 10 bis 600 kDa und ist daher hervorragend dafür geeignet, den Gim-Komplex (Mr 96 kDa) von einzelnen Untereinheiten (Mr 11-25 kDa), aber auch von höhermolekularen Aggregaten abzutrennen. Abb. 3.49B zeigt das bei 280 nm aufgezeichnete Elutionsprofil der Gelfiltration. Der Gim-Komplex eluiert in einem Größenbereich, der, verglichen mit dem Profil eines Eichproteinmixes (Abb. 3.49A), der Größe der Aldolase, also ca. 158 kDa, statt den berechneten 96 kDa, entspricht. Da das Laufverhalten von Proteinen bei einer Gelfiltration nicht nur von der Masse, sondern auch von den sterischen Eigenschaften der Proteine abhängig ist, kann die hier beobachtete Retardierung des Gim-Komplexes auf seine ungewöhnliche, Quallen-, bzw. in diesem Zusammenhang treffender, fallschirmartige Form zurückgeführt werden. Die bei der Gelfiltration gesammelten Fraktionen wurden per SDS-PAGE (2.2.3.2) und Coomassie-Färbung (2.2.3.5.1) untersucht. In Übereinstimmung mit dem Elutionsprofil wurde intakter Gim-Komplex in den Fraktionen 12-15 detektiert (Abb. 3.49C). Obwohl auch in den Fraktionen 5-11 alle GimC-Untereinheiten detektiert werden können, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um hochmolekulare Aggregate im Bereich zwischen 669 kDa und 232 kDa (entsprechend dem Bereich zwischen Thyroglobulin, T, und Katalase, K, im Eichlauf). In den Fraktionen 16-25 dagegen sind nur noch einzelne GimC-Untereinheiten detektierbar.



**Abb. 3.49: Größenfraktionierung mittels Gelfiltration (Superdex200 16/60)**

(A) Auftrennung eines definierten Proteingemischs aus Thyroglobulin (T, 669 kDa), Katalase (K, 232 kDa), Aldolase (A, 158 kDa), Ovalbumin (O, 43 kDa), Chymotrypsinogen (C, 25 kDa) und RibonucleaseA (R, 13,7 kDa). (B) Elutionsprofil der GimC-Präparation (nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie) bei Gelfiltration mittels Superdex200 16/60. (C) SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen.

Daher wurden die Fraktionen 12-15 für die weitere Aufreinigung des Komplexes verwendet. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit TEV-Protease inkubiert, um den Epitop-tag zu entfernen. Das abgespaltene Epitop wurde, zusammen mit der TEV-Protease, die ebenfalls einen 6His-tag trägt, mit Hilfe einer zweiten Ni-NTA-Affinitätssäule aus der Präparation entfernt. Ein willkommener Nebeneffekt dieses Schrittes ist, dass noch vorhandene Verunreinigungen, wie z.B. die Alkoholdehydrogenase1 (Adh1p, 40 kDa) eine der Hauptverunreinigungen, die bei der Gelfiltration mit GimC co-fraktioniert (Abb. 3.49C), ebenfalls abgetrennt werden. Interessanterweise hat Adh1p eine hohe Affinität zu Ni-NTA und kann daher effizient an die Matrix gebunden werden. Die sogenannte Filtersäule, die zweite Ni-NTA-Säule, entspricht daher also einer Negativreinigung (Abb. 3.50A).



**Abb. 3.50: Entfernen des 6His-Epitops durch TEV-Spaltung und Filtersäule und Qualitätskontrolle per Gelfiltration (Superose12, SMART-System)**

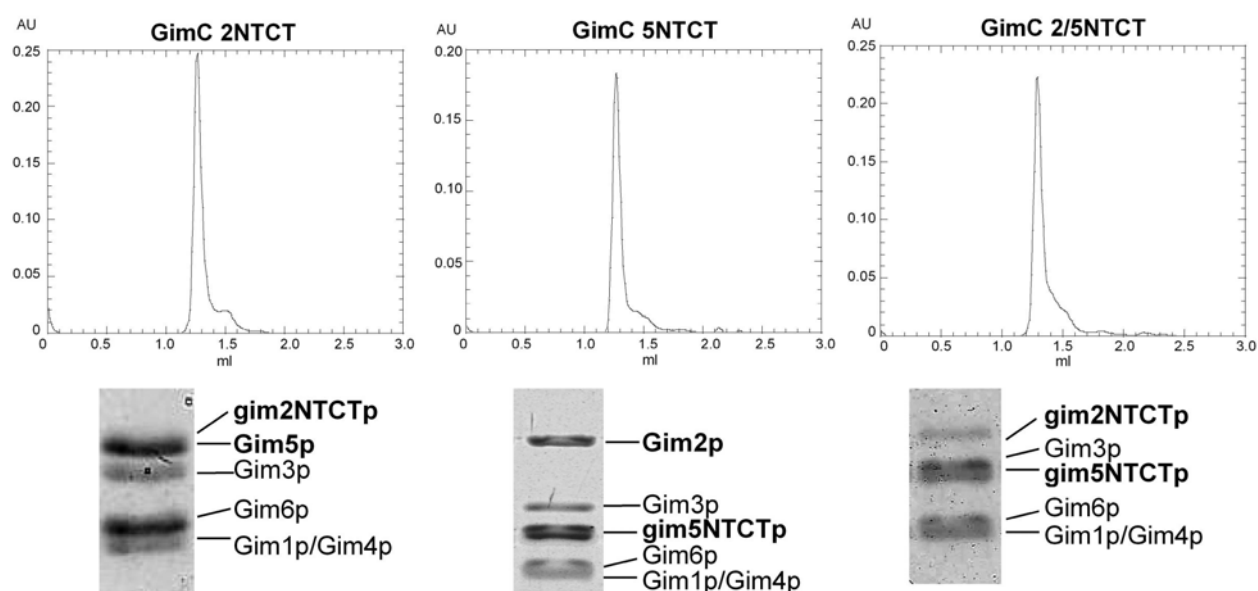
(A) Überprüfung der TEV-Spaltung und Filtersäule. Proben der Proteinlösungen nach Gelfiltration (GF), vor und nach TEV-Spaltung, sowie des Durchflusses (E), der Waschfraktionen und der Matrix (B) der Filtersäule wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. (B) Auftrennung eines definierten Proteingemischs aus Dextran Blue (D, >2000 kDa), Katalase (K, 232 kDa), Aldolase (A, 158 kDa), Ovalbumin (O, 43 kDa) und RibonucleaseA (R, 13,7 kDa). (C) Auftrennung von 5  $\mu$ g gereinigtem Gim-Komplex. (D) SDS-PAGE des gereinigten Komplexes.

Während das abgespaltene 6His-Epitop, die TEV-Protease und Adh1p an die Ni-Matrix gebunden werden (B), bleibt der gereinigte Gim-Komplex im Durchfluss (E) zurück. Unspezifisch adsorbierter Komplex wird durch Waschen von der Matrix entfernt und nach Kontrolle per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit dem Durchfluss vereinigt. Die Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 10 mg/ml gebracht und 5  $\mu$ g davon mittels Gelfiltration (Superose12, SMART-System) bezüglich der Homogenität der Proteinpräparation überprüft (Abb. 3.50C). Das Elutionsprofil zeigte eine einzelne Absorptionsspitze, die im Vergleich mit der Auftrennung eines Eichproteingemischs (Abb. 3.50B), im erwarteten Größenbereich von 158 kDa (Aldolase, A) lag. Der Gim-Komplex konnte also mit sehr hohem Reinheitsgrad isoliert werden. Um das Vorhandensein aller GimC-Untereinheiten zu überprüfen, wurden die der Absorptionsspitze entsprechenden Fraktionen vereinigt und auf hochauflösenden

Tricingelen (15%) aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Abb. 3.51D).

### 3.2.5.2 Reinigung der Mischkomplexe

Die GimC-Mischkomplexe GimC 2NTCT, GimC 5NTCT und GimC 2/5NTCT wurden auf gleiche Art und Weise aus Zellen der Stämme JSY72, JSY73 und JSY74 gereinigt. Abb. 3.52 zeigt die Elutionsprofile der Qualitätskontrolle mittels Gelfiltration, die bestätigen, dass auch die Reinigung der Mischkomplexe sehr erfolgreich war. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Proteinpräparationen zeigen eindrucksvoll die Veränderung des typischen GimC-Bandenmusters durch die Verkürzung der  $\alpha$ -Untereinheiten.



**Abb. 3. 51: Ergebnis der Reinigung der GimC-Mischkomplexe**

Qualitätskontrolle der gereinigten GimC-Mischkomplexe GimC 2NTCT, GimC 5NTCT und GimC 2/5NTCT durch Gelfiltration (Superose12, SMART-System) und SDS-PAGE.

Mit dem hier dargestellten Verfahren zur Expression und Reinigung des Gim-Komplexes wurde eine Methode etabliert und verfeinert, die es erlaubt, den Gim-Komplex und Verkürzungsmutanten davon effizient und mit sehr hohem Reinheitsgrad aus der Hefe zu isolieren. So konnten mit Hilfe dieses Protokolls zwischen 7 und 12 mg der Komplexe aus 50 g Zellmaterial gewonnen werden.

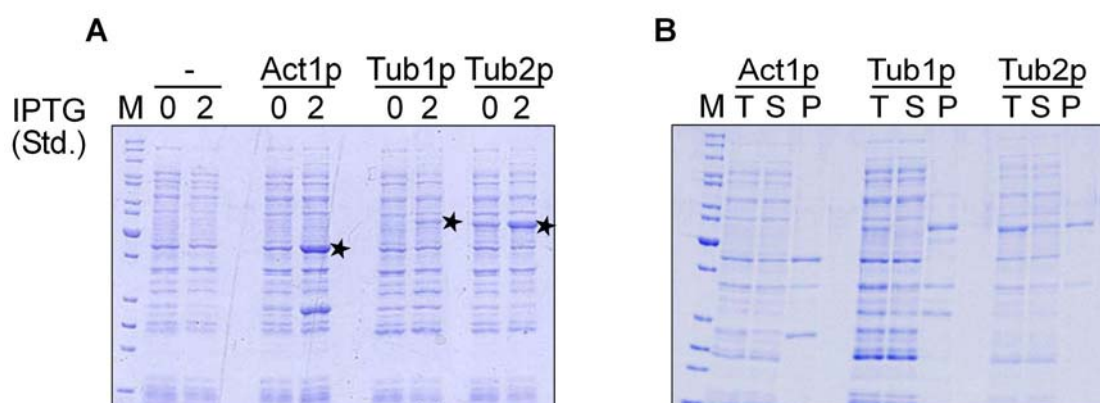
### 3.2.6 Expression und Reinigung von Hefe-Aktin und -Tubulin in *E. coli*

Um die Interaktion von GimC und dessen Verkürzungsmutanten mit denaturierten Substratproteinen *in vitro* untersuchen zu können, wurden auch die natürlichen Substrate von GimC, Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin gereinigt. Dazu wurden zunächst die offenen Leserahmen der Hefegene *ACT1* (Aktin), *TUB1* und *TUB2* ( $\alpha$ -, bzw.  $\beta$ -Tubulin) in pRSET6d-Vektoren kloniert (Tabelle 3.6). Diese erlauben zum einen die IPTG-abhängige Expression des Zielgens in *E. coli*, zum anderen aber auch die durch die T7-Polymerase vermittelte Transkription im zellfreien System (vgl. 3.2.7.2).

**Tabelle 3.6: Plasmide zur Expression und *in vitro*-Translation von GimC-Substraten**

Plasmid	Vektor	Beschreibung
pJS127	pRSET6d- <i>ACT1</i>	codiert Hefe-Aktin ohne Intron unter Kontrolle des T7-Promotor/Terminator-Systems
pJS128	pRSET6d- <i>TUB1</i>	codiert Hefe- $\alpha$ -Tubulin unter Kontrolle des T7-Promotor/Terminator-Systems
pJS129	pRSET6d- <i>TUB2</i>	codiert Hefe- $\beta$ -Tubulin unter Kontrolle des T7-Promotor/Terminator-Systems

Die drei Proteine konnten in *E. coli* effizient exprimiert werden (Abb. 3.52A). Die Expressionsbanden sind mit Sternen gekennzeichnet. Da *E. coli* als Prokaryot nicht über die zur Faltung von Aktin und Tubulin benötigten Chaperone verfügt (vgl. 1.1), wurden die drei Proteine in unlöslicher Form in den Zellen angereichert und bildeten stabile *inclusion bodies*, die durch Zentrifugation aus den Lysaten isoliert wurden (Abb. 3.52B).



**Abb. 3.52: Expression und Reinigung der GimC-Substratproteine in *E. coli***

(A) Heterologe Expression von Aktin (Act1p),  $\alpha$ - (Tub1p) und  $\beta$ -Tubulin (Tub2p) aus der Hefe in *E. coli*. Proben vor und nach 2 Std. Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die den leeren Vektor enthalten (pRSET6d) entsprechend behandelt. Sterne markieren die Expressionsbanden. (B) Löslichkeit der Substratproteine. Proben des Totalextrakts (T) und der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion nach Zentrifugation wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Dieser Befund illustriert auf beeindruckende Weise die absolute Abhängigkeit dieser Zytoskelett-Proteine von der eukaryotischen Faltungsmaschinerie.

Nach der Isolierung wurden die *inclusion bodies* in Puffer ohne Harnstoff resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Eine Renaturierung der Proteine war nicht nötig, da diese für die anschließenden *in vitro* Experimente in denaturierter Form benötigt wurden.

### 3.2.7 Funktionelle Tests *in vitro*

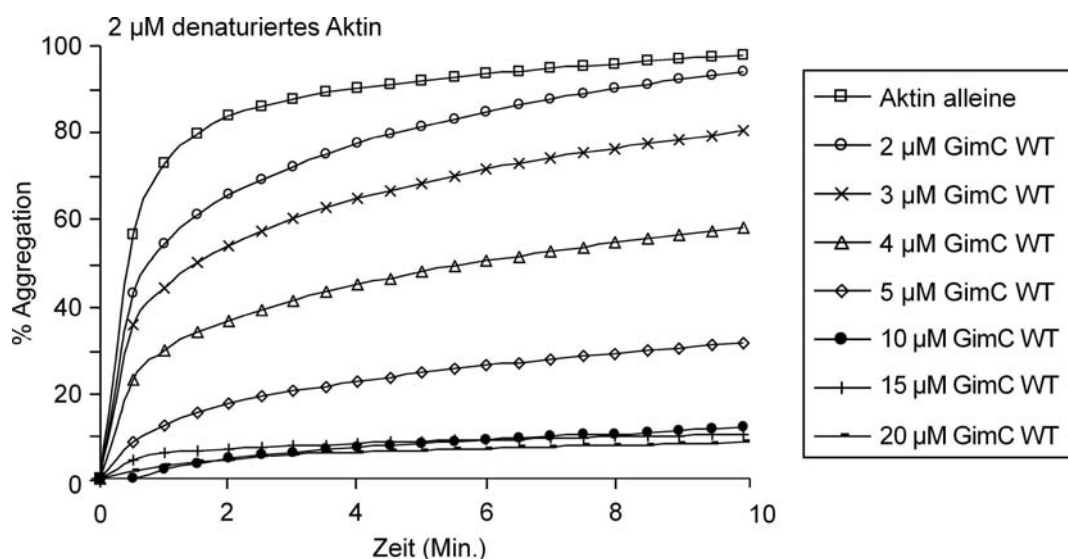
Um Unterschiede in der Funktionalität der GimC-Verkürzungsmutanten im Gegensatz zum Wildtyp-Komplex *in vitro* zu untersuchen, wurden die Komplexe bezüglich ihrer Fähigkeit verglichen, die Aggregation denaturierten Aktins in Lösung zu verhindern und die Löslichkeit von Aktin und  $\alpha$ -Tubulin bei der *de novo* Synthese in einem prokaryotischen Transkriptions-/Translations-System zu steigern.

#### 3.2.7.1 Verhinderung der Aggregation denaturierten Aktins in Lösung

Eine Grundeigenschaft molekularer Chaperone, ist die Fähigkeit, ungefaltete Proteinketten zu erkennen, in Lösung zu halten und deren Aggregation zu verhindern. *In vitro* kann dies photometrisch verfolgt werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass ein durch wässrige Lösungen geleiteter Lichtstrahl durch in der Lösung vorhandene Partikel, wie z.B. Proteinmoleküle, in einem bestimmten Winkel, der von der Größe des Partikels abhängig ist, abgelenkt wird. Aggregation dieser Moleküle in der Küvette, führt zu einer Zunahme der Partikelgröße und damit auch des Streuwinkels. In Folge dessen, fällt weniger Licht auf den hinter der Lösung befindlichen Detektor. Dies bewirkt eine Abnahme der Lichtintensität und damit eine Zunahme der gemessenen Absorption.

Um den Einfluss von GimC und seiner Verkürzungsmutanten auf die Aggregation denaturierten Aktins zu messen, wurde Aktin aus gereinigten *inclusion bodies* in Puffer mit 6M Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) resuspendiert und zur Solubilisierung 1 Std. bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration, wurde das denaturierte Aktin in einer Quatzküvette zu einer Endkonzentration von  $2\ \mu\text{M}$  in Puffer ohne GuHCl verdünnt. Durch die Verdünnung wird die Konzentration des Denaturierungsmittels so weit reduziert, dass die entfalteten Aktinketten durch GuHCl nicht mehr in Lösung gehalten werden können. Die daraus resultierende, schnelle Aggregation des Proteins wird durch Zunahme der Absorption bei 320 nm über einen Zeitraum von 10 Min. im Photometer verfolgt (2.2.3.20).

Um diejenige GimC Konzentration zu bestimmen, bei der die Aggregation denaturierten Aktins maximal verhindert wird, wurde der Puffer vor der Messung mit aufsteigenden Mengen des gereinigten Wildtyp-Komplexes versetzt und dann erst das denaturierte Aktin zugegeben. Der Sättigungswert, der ohne GimC-Zugabe gemessenen Kurve, wurde als 100% Aggregation festgesetzt, die übrigen Messwerte entsprechend angeglichen und gegen die Zeit graphisch aufgetragen (Abb. 3.53).



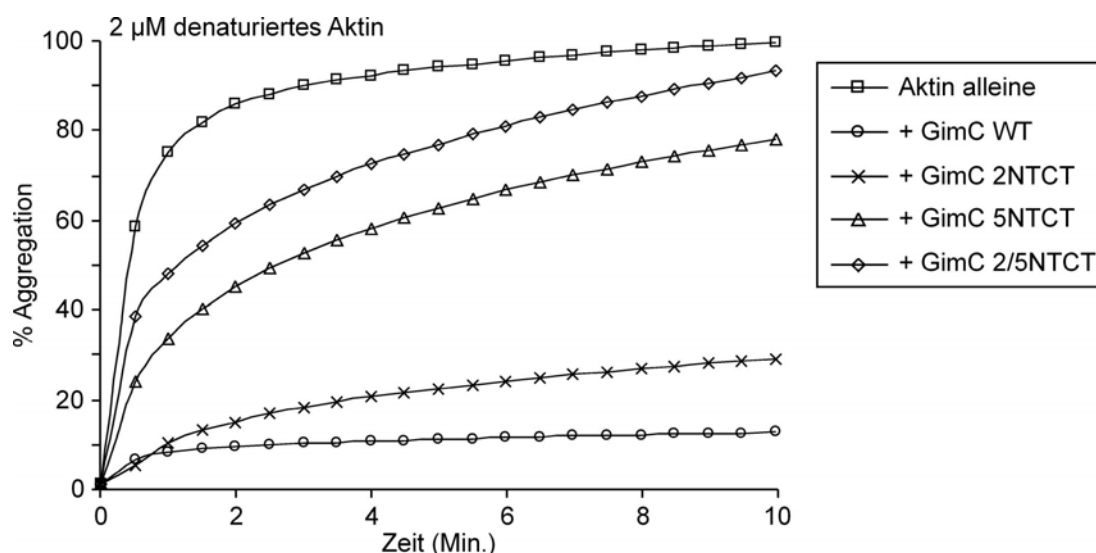
**Abb. 3.53: Verhinderung der Aggregation denaturierten Aktins durch Wildtyp-GimC**

Die Aggregation denaturierten Aktins wurde in Puffer ohne und mit 2-20 µM Wildtyp-GimC über einen Zeitraum von 10 Min bei 320 nm photometrisch verfolgt. Der Maximalwert der Messung ohne GimC-Zugabe, wurde auf 100% gesetzt, die anderen Werte entsprechend verrechnet und graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verhinderung der Aggregation denaturierten Aktins durch GimC ein konzentrationsabhängiger Prozess ist. Während die Zugabe äquimolarer Mengen (2 µM) GimC die Aggregation von nicht-nativem Aktin nur wenig beeinflusst, wird diese durch Erhöhung der Chaperon-Menge mehr und mehr reduziert. Bei Zugabe von 10 µM GimC, d.h. einem 5-fachen Überschuss gegenüber Aktin, wird die Aggregation verhindert. Durch eine weitere Erhöhung der GimC-Menge kann dieser Effekt nicht mehr gesteigert werden. Die Aggregation denaturierten Aktins wird also unter diesen experimentellen Bedingungen bei Zugabe von mindestens 10 µM GimC maximal verhindert.

Um den Einfluss der GimC-Verkürzungsmutanten auf die Aggregation denaturierten Aktins zu untersuchen, wurden die Ansätze mit je 15 µM der verschiedenen gereinigten Komplexe versetzt, 2 µM denaturiertes Aktin zugegeben und erneut über einen Zeitraum von 10 Min. bei 320 nm gemessen (Abb. 3.54).





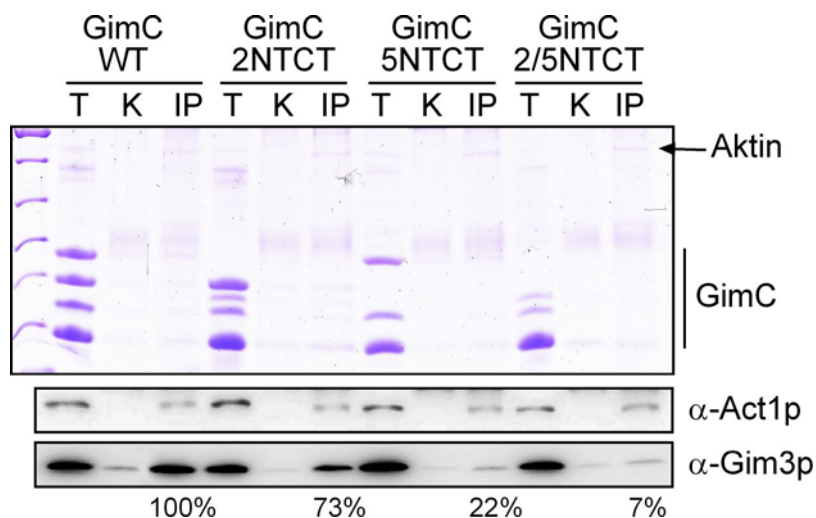
**Abb. 3.54: Effekt der GimC-Verkürzungsmutanten auf die Aggregation denaturierten Aktins**

Die Aggregation denaturierten Aktins ohne und mit je 15  $\mu\text{M}$  gereinigtem Wildtyp-GimC (GimC WT), oder dessen Verkürzungsmutanten (GimC 2NTCT, GimC 5NTCT, GimC 2/5NTCT), wurde über einen Zeitraum von 10 Min. bei 320 nm verfolgt und prozentual gegen die Zeit aufgetragen.

Die Messung zeigte, dass die Verkürzungsmutanten nicht in der Lage sind, die Aggregation denaturierten Aktins effektiv zu verhindern. Während diese Fähigkeit bei GimC 2NTCT nur wenig beeinträchtigt ist, hat die Verkürzung von Gim5p eine drastische Reduktion der GimC-Funktion zur Folge. Bei GimC 2/5NTCT schliesslich wird die Aggregation von Aktin zwar verlangsamt, der Betrag des aggregierten Aktins nach 10 Min. ist jedoch, mit dem der Probe ohne GimC-Zugabe vergleichbar. Dieser Befund läßt den Schluss zu, dass auch noch andere GimC-Untereinheiten, als Gim2p und Gim5p in der Lage sein müssen, mit Aktin zu interagieren. Diese Interaktion ist jedoch nicht ausreichend, oder zu transient, um Aktin dauerhaft in Lösung zu halten, sodass die Aggregation nicht-nativen Aktins zwar verlangsamt, aber nicht verhindert werden kann.

Um zu untersuchen, ob diesem Effekt eine Reduktion der Interaktion der Verkürzungsmutanten mit den denaturierten Aktinketten zu Grunde liegt, wurde den Ansätzen nach der Messung ein chemischer Crosslinker (DTSSP) zugesetzt und damit die bestehenden Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Lösung stabilisiert (2.2.3.21). DTSSP reagiert spezifisch mit primären Aminogruppen an den N-Termini von Proteinen, aber auch mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten. Mit Hilfe eines immobilisierten  $\alpha$ -Aktin-Antikörpers, der sowohl natives, als auch denaturiertes oder aggregiertes Aktin erkennt, wurde das gesamte im Ansatz vorhandene Aktin präzipitiert. Die Menge co-präzipitierten Gim-Komplexes wurde, nach Auflösen des Crosslinks durch Erhitzen der Proben in Puffer mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, per SDS-PAGE und im Westernblot mit Gim3p-spezifischen Antikörpern untersucht, da diese Untereinheit in allen

verwendeten Komplexen in unveränderter Form vorliegt. Als Kontrolle, wurde jeweils ein Ansatz, dem kein Aktin zugegeben wurde mit  $\alpha$ -Aktin-Sepharose inkubiert (Abb. 3.55).



**Abb. 3.55: Co-Präzipitation von Aktin und GimC**

Die Bindung von GimC und dessen Verkürzungsmutanten an denaturiertes Aktin wurde nach Stabilisierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen mit DTSSP und Präzipitation mit  $\alpha$ -Aktin-Antikörpern per SDS-PAGE und Fairbanks-Färbung und im Westernblot untersucht. Dabei wurden Proben des Totalproteins im Ansatz (T), einer Kontroll-Präzipitation ohne Aktin (K) und des Präzipitats (IP) analysiert. Die nach Inkubation der Membran mit Aktin- ( $\alpha$ -Act1p) und GimC- ( $\alpha$ -Gim3p) spezifischen Antikörpern erhaltenen Signale wurden mit Hilfe der AIDA-Software (Raytest) quantifiziert.

Das SDS-Gel und der Westernblot belegen, dass die eingesetzten Proteinmengen in allen Ansätzen gleich waren. Die im Westernblot mit  $\alpha$ -Gim3p-Antikörpern erhaltenen Signale wurden quantifiziert und mit den für Aktin erhaltenen Signalen normalisiert. Der Wert, für die Co-Präzipitation des Wildtyp-Komplexes wurde als 100% definiert.

Tatsächlich sind die GimC-Verkürzungsmutanten nicht in der Lage, effizient an Aktin zu binden. Dieser Befund bestätigt, dass die hydrophoben Bereiche an den Enden der einzelnen Untereinheiten für die Interaktion des Gim-Komplexes mit seinen Substraten verantwortlich sind. Dabei leisten die Untereinheiten jedoch unterschiedliche Beiträge. Während die Bindung von GimC an Aktin durch die Verkürzung der Gim2p-Untereinheit (GimC 2NTCT) um nur ca. 30% auf 73% reduziert wird, können nur noch 22% der Komplexe mit Aktin interagieren, wenn Gim5p verändert ist (GimC 5NTCT). Die Doppelmutante GimC 2/5NTCT schliesslich, ist fast nicht mehr in der Lage, an das Substrat zu binden. Nur noch 7% des in der Lösung befindlichen Komplexes werden, im Vergleich zum Wildtyp mit Aktin co-präzipitiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass zwar ein additiver Effekt zwischen Gim2p und Gim5p bei der Interaktion von GimC mit Aktin besteht, dass die Bindung jedoch hauptsächlich durch Gim5p vermittelt wird.

### 3.2.7.2 Einfluss von GimC auf die Löslichkeit *de novo* synthetisierter Substrate

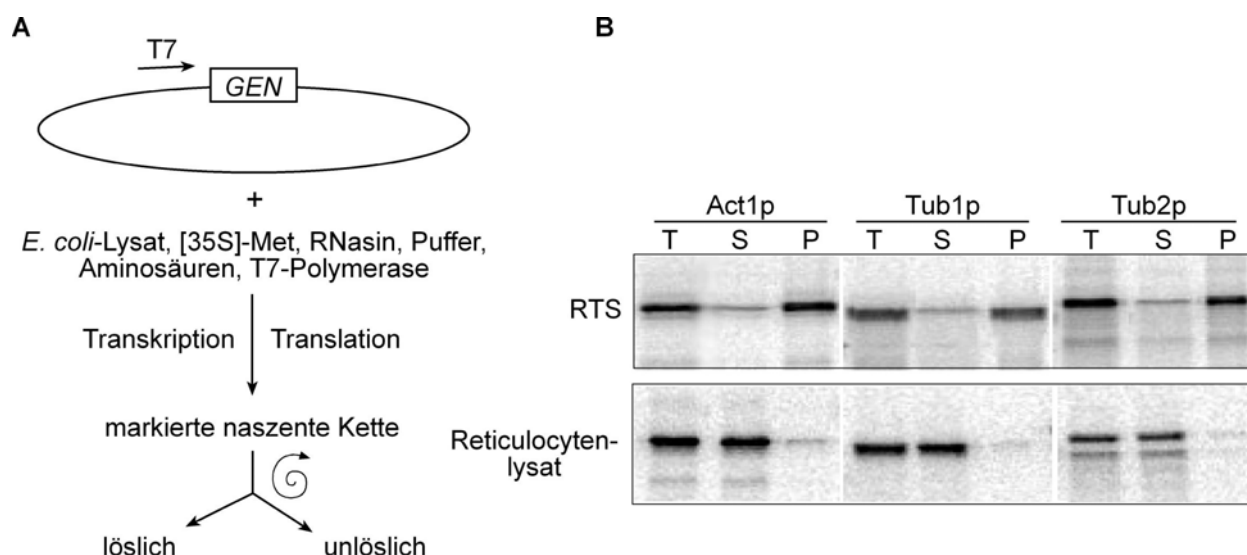
Um diesen Befund auf eine Weise zu validieren, die mehr der tatsächlichen Situation in den Zellen entspricht, wurde der Einfluss von GimC auf die Löslichkeit *de novo* synthetisierter Substrate untersucht. Dazu wurden Aktin und  $\alpha$ -Tubulin unter Zugabe von GimC, bzw. dessen Verkürzungsmutanten *in vitro* translatiert.

Normalerweise wird für die *in vitro* Translation eukaryotischer Proteine Reticulozytenlysat (aus Kaninchen) verwendet, da dieses erstens dazu in der Lage ist, für die Funktion wichtige posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, ect. einzuführen, und zweitens alle für die korrekte Faltung der Proteine nötigen Faktoren enthält.

Für die Analyse des Einflusses von GimC, bzw. eukaryotischer Chaperone auf die Löslichkeit von Aktin und Tubulin, war es jedoch nicht das Ziel Proteine in funktioneller, löslicher Form zu exprimieren, sondern unter Bedingungen, die die Aggregation der translatierten Proteine fördern. Da eukaryotische Proteine, wie Aktin und Tubulin bei der Expression *E. coli*-Zellen in unlöslicher Form hergestellt werden (vgl. 3.2.6), wurde zu diesem Zweck das RTS (Rapid Translation System) der Firma Roche verwendet. Dieses prokaryotische Transkriptions-/Translationssystem stellt, mit dem darin enthaltenen *E. coli*-Lysat, zwar alle für eine effiziente Transkription und Translation benötigten Komponenten, wie z.B. Ribosomen und t-RNAs zur Verfügung, enthält jedoch keine zelleigene DNA und vor allem keine (eukaryotischen) Chaperone, die die Löslichkeit beeinflussen.

Die Information für das zu translatierende Protein wird auf einem Plasmid, unter der Kontrolle des T7-Promotors eingebracht. In einer Mixtur aus *E. coli*-Lysat, RNasin zur Stabilisierung der mRNA, Aminosäuren und Puffer wird das Protein mittels T7-Polymerase transkribiert und in Anwesenheit von radioaktiv-markiertem Methionin ( $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ ) 3 Std. bei 30°C translatiert. Danach werden lösliche und unlösliche Fraktion des Ansatzes durch Zentrifugation voneinander getrennt (Abb. 3.56A und 2.2.3.22).

Die Verteilung des *de novo* synthetisierten Proteins wird per SDS-PAGE und Autoradiogramm untersucht (Abb. 3.56B). Im Gegensatz zur Expression im Reticulozytenlysat, wo Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgrund des Vorhandenseins zytosolischer Chaperone als lösliche Proteine (S) hergestellt werden, sind diese nach Translation im RTS vorwiegend in der unlöslichen Fraktion (P) zu finden.

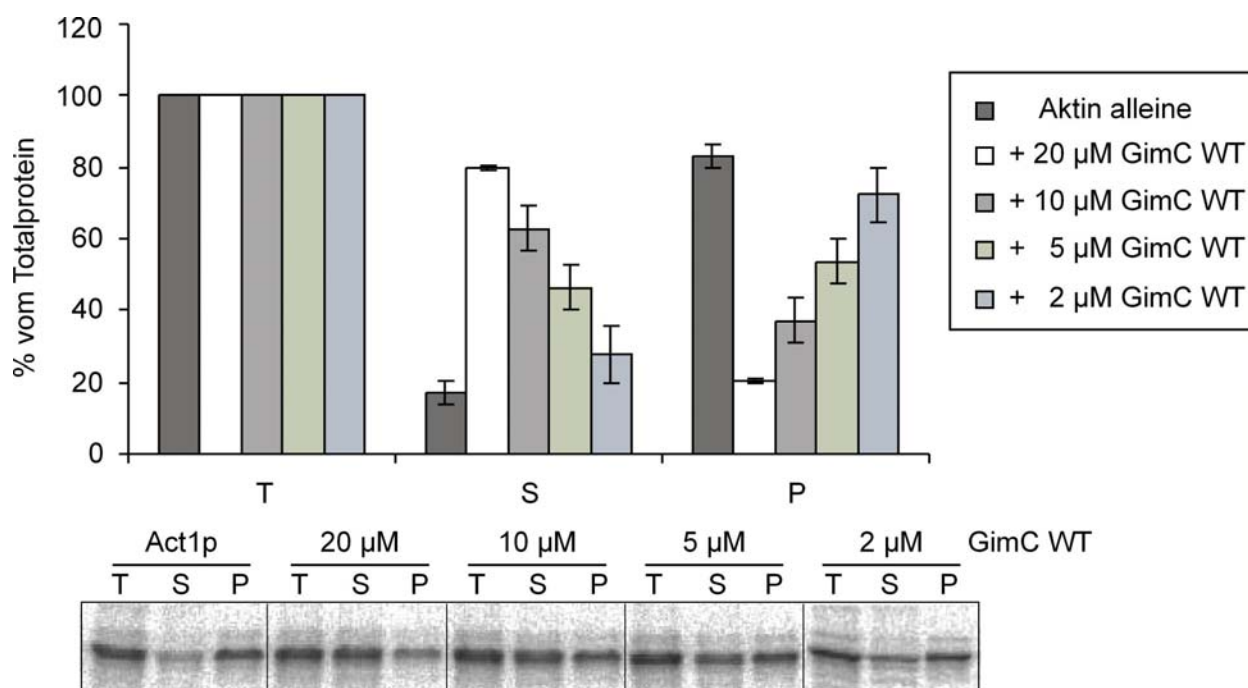


**Abb. 3.56: Vergleich der Translation eukaryotischer Proteine im RTS und Reticulozcytenlysat**

(A) Schematische Darstellung der *in vitro* Translation mittels RTS. (B) Translation von Aktin (Act1p)  $\alpha$ - (Tub1p) und  $\beta$ -Tubulin (Tub2p) im RTS und Reticulozcytenlysat. Proben des Totalproteins (T) und der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion nach Zentrifugation wurden per SDS-PAGE und Autoradiogramm analysiert.

Daher ermöglicht dieses System die Untersuchung des Einflusses zytosolischer Chaperone auf die Löslichkeit neu-synthetisierter eukaryotischer Proteine *in vitro* unter Bedingungen, die der tatsächlichen Situation bei der Translation in lebenden Zellen sehr ähnlich sind.

Um den Einfluss von GimC und dessen Verkürzungsmutanten auf die Löslichkeit von Aktin und  $\alpha$ -Tubulin im RTS untersuchen zu können, musste zunächst diejenige Konzentration von Wildtyp-GimC bestimmt werden, die die Aggregation dieser Substrate optimal verhindert (Abb. 3.57). Exemplarisch wurde hierzu Aktin translatiert, die Translationsansätze mit aufsteigenden Mengen GimC versetzt und die Reaktion durch Zugabe des Premixes, der u.a. die DNA und das radioaktiv-markierte Methionin enthält, gestartet. Nach drei Stunden bei 30°C im Wasserbad wurde die Translation durch Inkubation auf Eis gestoppt und die Ansätze zentrifugiert. Proben des Totalproteins (T) nach Translation, sowie der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion nach Zentrifugation wurden per SDS-PAGE und Autoradiogramm untersucht (2.2.3.22). Die für das Zielprotein erhaltenen Signale in den einzelnen Fraktionen wurden quantifiziert und die Werte in Prozent des Totalproteins graphisch aufgetragen (2.2.3.23).

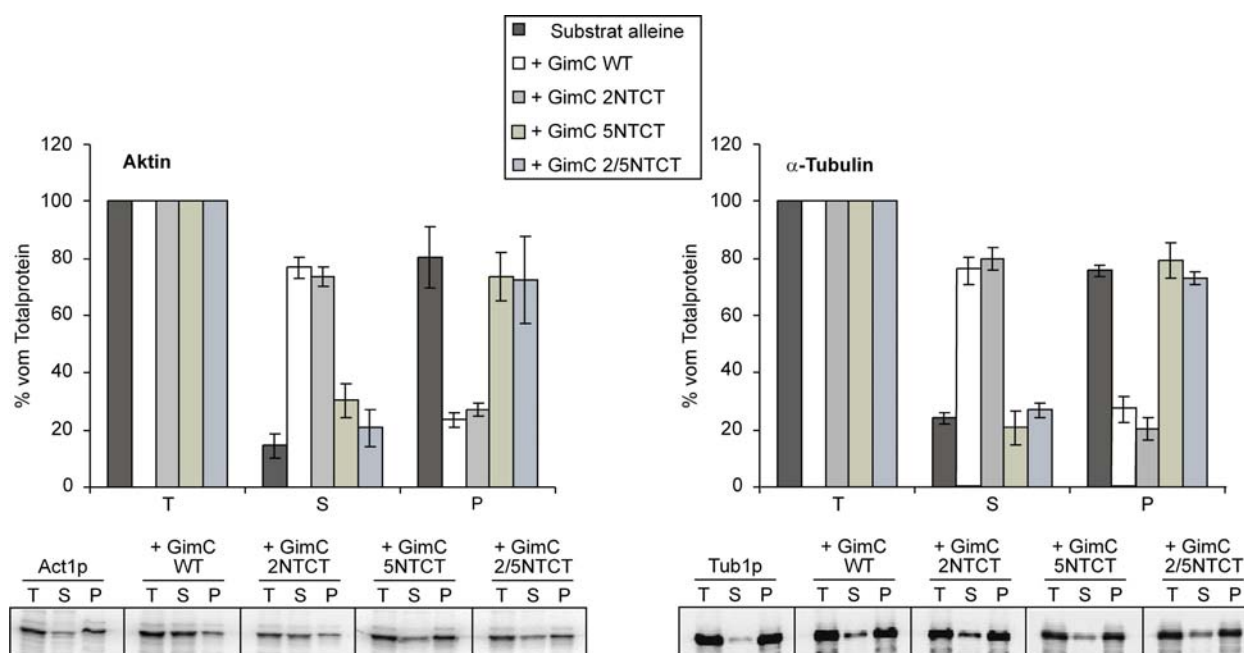


**Abb. 3. 57: Titration von GimC im RTS am Beispiel der Translation von Aktin**

Die Menge an Wildtyp GimC, die benötigt wird, um *de novo* translatiertes Aktin im RTS in Lösung zu halten wurde in einem Titrationsexperiment bestimmt. Die aus vier unabhängigen Experimenten erhaltenen Werte in Prozent vom Totalprotein graphisch aufgetragen. Die ermittelte Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Repräsentative Autoradiogramme zeigen die Verteilung des neu-synthetisierten Aktins in den untersuchten Fraktionen. (T) Totalprotein, (S) lösliche, (P) unlösliche Fraktion.

Ohne Zugabe von GimC sind ca. 80% des neu-synthetisierten Aktins unlöslich. Die Zugabe von 20 µM GimC zum Translationsansatz, ist jedoch ausreichend, um das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Aktin im Vergleich zur Kontrollreaktion komplett umzudrehen. Unter diesen Bedingungen finden sich nur noch ca. 20% des Aktins im Sediment, während der Rest von GimC in Lösung gehalten wird.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die Reaktionsansätze zur Messung des Einflusses der Verkürzungsmutanten auf die Löslichkeit von Aktin und  $\alpha$ -Tubulin im RTS mit je 20 µM der gereinigten Komplexe (GimC WT, GimC 2NTCT, GimC 5NTCT und GimC 2/5NTCT) versetzt. Abb. 3.58 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, sowie repräsentative Autoradiogramme für die *in vitro* Translation von Aktin (Abb. 3.58A) und  $\alpha$ -Tubulin (Abb. 3.58B) unter Zugabe von Wildtyp-GimC und dessen Verkürzungsmutanten.



**Abb. 3.58: Einfluss von GimC auf die Löslichkeit von Aktin und  $\alpha$ -Tubulin aus der Hefe**

Die aus vier unabhängigen Experimenten erhaltenen Werte der *in vitro* Translation von Aktin (A) und  $\alpha$ -Tubulin (B) im RTS ohne und mit 20  $\mu$ M Wildtyp-GimC, bzw. dessen Verkürzungsmutanten (GimC 2NTCT, GimC 5NTCT, GimC 2/5NTCT) wurden in Prozent vom Totalprotein graphisch aufgetragen. Die ermittelte Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken angegeben. Repräsentative Autoradiogramme zeigen die Verteilung des Zielproteins in den untersuchten Fraktionen. (T) Totalprotein, (S) lösliche, (P) unlösliche Fraktion.

Tatsächlich konnten die Ergebnisse aus den Aggregationstests (3.2.7.1) auf diese Weise bestätigt werden. Wie im Titrationsexperiment, wird Aktin im RTS ohne Zugabe von GimC in vorwiegend unlöslicher Form hergestellt, wogegen sich nach Zugabe von 20  $\mu$ M Wildtyp-GimC über 80% des *de novo* synthetisierten Aktins in der löslichen Fraktion befinden. In Übereinstimmung mit den vorherigen *in vitro* Experimenten, wird die Löslichkeit durch die GimC 2NTCT-Mutante nur wenig verringert. Die GimC 5NTCT-Mutante dagegen kann neu-synthetisiertes Aktin nur schwer in Lösung halten. Nur ca. 35% des Proteins können in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Die für die Doppelmutante GimC 2/5NTCT erhaltene Verteilung schliesslich, unterscheidet sich nicht wesentlich von den Werten der Kontrollreaktion ohne Chaperonzugabe.

Bei der *in vitro* Translation von  $\alpha$ -Tubulin sieht die Situation anders aus (Abb. 3.58B). Zwar kann auch hier die Verteilung dieses Proteins zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion durch die Zugabe von 20  $\mu$ M GimC zur Translationsreaktion komplett umgedreht werden, jedoch haben die Verkürzungsmutanten andere Auswirkungen auf die Löslichkeit neu-synthetisierten  $\alpha$ -Tubulins, als das für Aktin der Fall war. Die Verkürzung der Gim5p-Untereinheit alleine führt hier schon zum kompletten Funktionsverlust, genauso wie die Veränderung beider  $\alpha$ -Untereinheiten (GimC 2/5NTCT). Die Gim2p-Untereinheit dagegen, scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Interaktion von GimC mit *de novo* translatiertem  $\alpha$ -Tubulin zu

haben, da kein signifikanter Unterschied zwischen den Reaktionen mit GimC 2NTCT und Wildtyp-Komplex festzustellen ist. Daher kann man annehmen, dass hauptsächlich Gim5p für die Bindung von GimC an  $\alpha$ -Tubulin verantwortlich ist.

Diese Befunde unterstützen die Vorstellung, dass unterschiedliche GimC-Untereinheiten, in Abhängigkeit vom Substrat, unterschiedliche Beiträge zur Interaktion von GimC mit seinen Hauptsubstraten Aktin,  $\alpha$ - und wahrscheinlich auch  $\beta$ -Tubulin leisten.

## 4 Diskussion

Proteine sind wesentliche Bestandteile jeder Zelle, die vielseitige Aufgaben erfüllen. Essentiell für ihre Funktionalität ist das Einnehmen einer definierten sterischen Konformation. Die Information für die native Form eines Proteins ist bereits durch dessen Primärstruktur, das heißt durch die Abfolge der Aminosäuren der Polypeptidkette bestimmt. Daher ist es vielen Proteinen möglich, die für ihre Funktion richtige Konformation spontan einzunehmen. Proteinen, die dazu nicht in der Lage sind, steht eine Vielzahl molekularer Chaperone zur Seite, die diesen Prozess unterstützen. Im Zytosol der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, wie in jeder anderen Zelle, sind Chaperone in einem Netzwerk organisiert, das Proteine bereits co-translational am Ribosom empfängt und bis zum Erreichen ihres nativen Zustands, wenn nötig auch noch post-translational, gegen störende Einflüsse des mit Proteinen überfüllten Zytosols abschirmt (1.1.1). Diese Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte, die sich jeweils einem Teilaspekt dieses effizienten Chaperon-Netzwerks widmen. Im ersten Teil wurde die Lokalisation zytosolischer Chaperone am ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnel untersucht. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit GimC, einem Chaperon-Komplex, der als Teil einer spezialisierten Faltungsmaschinerie maßgeblich an der Generierung nativer Zytoskelett-Proteine beteiligt ist.

### 4.1 Untersuchung der Bindung zytosolischer Chaperone im Umfeld des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkung zytosolischer Chaperone mit translatierenden Ribosomen. Es sollte gezeigt werden, welche Chaperone in nächster Nähe des Polypeptid-Austrittstunnels mit Ribosomen interagieren. Um Ribosomen auf einfache Weise aus Zellextrakten isolieren zu können, sollte ein System entwickelt werden, das es erlaubt, ganze Ribosomen mit Hilfe eines Epitop-tags an nur einer ribosomalen Untereinheit zu präzipitieren. Es zeigte es sich, dass die Epitop-Markierung der ribosomalen Untereinheit Rpl25p, die in unmittelbarer Nähe der Öffnung des Polypeptid-Austrittstunnels liegt, einen Wachstumsdefekt und Sensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika bei den veränderten Hefen hervorrief, während dies bei Markierung einer anderen Untereinheit, Rpl4ap, die sich abseits funktioneller Bereiche des Ribosoms befindet, nicht der Fall war. Co-Präzipitationsexperimente mit gereinigtem Rpl25p und Zellextrakten führten zur Identifizierung dieser Untereinheit als Bindestelle für zytosolische Faktoren, wie NAC und SRP. Die spezifische Bindung von NAC



konnte mit gereinigten Komponenten bestätigt und der N-Terminus der  $\beta$ -NAC-Untereinheit Egd1p als Interaktionsdomäne mit Rpl25p identifiziert werden. Anhand der starken Homologie von Rpl25p und seinem prokaryotischen Pendant Rl23p aus *E. coli* wurde spekuliert, dass ein in *E. coli* für die Bindung von Trigger Faktor verantwortliches und auch, in leicht abgewandelter Form, in Rpl25p vorkommendes Motiv aus 3 Aminosäuren als Bindestelle für NAC dienen könnte. Die gezielte Veränderung dieses Motivs hatte jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die Interaktion von NAC mit Rpl25p. Ein Befund, der darauf schließen lässt, dass Rpl25p zwar auch in Eukaryoten als Bindeplattform für zytosolische Faktoren am Ribosom dient, die tatsächliche Bindestelle jedoch im Vergleich zu *E. coli* eine Weiterentwicklung erfahren haben muss, die wahrscheinlich mit der höheren Organisation von Eukaryoten zusammenhängt.

#### 4.1.1 Die Epitop-Markierung von Rpl25p führt zu einer Reduktion der Assoziation von Ssb1/2p mit Ribosomen

Die Präparation translatierender Ribosomen mittels Dichtegradientenzentrifugation ist eine weit verbreitete Methodik (Nelson et al., 1992), die die Isolierung von Polysomen, mitsamt der naszenten Kette (sog. *Ribosome Nascent chain Complexes*, RNCs) und assoziierter Faktoren erlaubt. Die vorherige Behandlung der Zellysate mit RNaseA erlaubt die Beurteilung, ob co-fractionierende Proteine mit Ribosomen assoziiert sind (vgl. Abb. 3.6 für RNaseA), während die Behandlung mit Puromycin, das die Freisetzung naszenter Ketten vom Ribosom bewirkt die Unterscheidung erlaubt, ob co-migrierende Proteine direkt oder über die naszenten Ketten mit Ribosomen assoziiert sind. Da die Isolierung von Polysomen mittels Dichtegradientenzentrifugation sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv ist, wurde eine Methode etabliert, die eine schnelle und einfache Isolierung von Ribosomen aus Zellextrakten ermöglicht. Basierend auf einer Veröffentlichung von Inada et al. (2000), die eine Methode vorstellen, um Ribosomen über einen C-terminalen Epitop-tag an der ribosomalen Untereinheit Rpl25p aus Zellextrakten isolieren, wurde Rpl25p mit einem C-terminalen 3HA-tag versehen. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Stamm ein aberantes Wachstumsverhalten aufwies, das nicht beobachtet werden konnte, wenn dieselbe Untereinheit mit einem längeren Epitop (6HA) versehen wurde. Darüberhinaus zeigte der *RPL25*-3HA-Stamm eine starke Sensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika. Da dieser Phänotyp stark an Ssb1/2p-defiziente Zellen erinnert (Kim and Craig, 2005; Pfund et al., 1998), wurde die Assoziation von Ssb1/2p mit den Ribosomen im Westernblot untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Fusion von Rpl25p mit dem 3HA-, nicht jedoch mit einem 6HA-Epitop eine Reduktion der Ssb1/2p-Bindung von ca. 50% bewirkt. Dies legte die Vermutung

nahe, dass Rpl25p selbst, oder andere Untereinheiten in unmittelbarer Nähe des ribosomalen Polypeptid-Austrittstunnels als Bindestellen für zytosolische Faktoren, wie z.B. Ssb1/2p dienen könnten, die durch den Epitop-tag verdeckt werden. In Folge dessen, wurde für die Epitop-Markierung zur Anreicherung von Ribosomen aus Zellextrakten, eine weit vom Polypeptid-Austrittstunnel und anderen für die Ribosomenfunktion wichtigen Bereichen entfernte Untereinheit, Rpl4ap, ausgewählt. Tatsächlich hatte deren Fusion mit einem Epitop-tag weder einen Wachstumsdefekt, noch eine Änderung der Antibiotikaresistenz des resultierenden Stammes, bzw. der Assoziation von Ssb1/2p mit den Ribosomen zur Folge.

#### 4.1.2 Rpl25p dient als Bindestelle für zytosolische Faktoren am Ribosom

Die Möglichkeit, dass Rpl25p eine Bindestelle für zytosolische Chaperone am Ribosom sein könnte, wurde zunächst im *Two-Hybrid*-System untersucht und das Ergebnis dieses Tests durch die Untersuchung der Bindung derselben Proteine an gereinigtes MBP-Rpl25p im Zellextrakt validiert. Durch diese Experimente konnte erstmalig gezeigt werden, dass Rpl25p auch in der Hefe als Bindestelle für zytosolische Faktoren am Ribosom dient. Die Bindung eines ausgewählten Faktors, des nasente Ketten-assoziierten Komplexes NAC wurde anschließend *in vitro* näher charakterisiert.

##### 4.1.2.1 *Two-Hybrid*

Für den *Two-Hybrid*-Versuch wurden gezielt Chaperone, wie Ssb1/2p, NAC und RAC ausgewählt, die laut Literatur mit Ribosomen assoziiert vorliegen (siehe Einleitung). Srp54p, eine Untereinheit des *Signal Recognition Particles*, die die Ribosomenbindung des Komplexes vermittelt, diente in diesem Fall als Positivkontrolle. Verschiedene Studien hatten gezeigt, dass Homologe von Rpl25p (L23a in Ribosomen aus Weizenkeim und Kaninchen-Reticulozytenlysate, Rl23p in *E. coli*) als Bindestellen für Srp54p, bzw. das prokaryotische SRP-Homolog Ffh, fungieren (Gu et al., 2003; Pool et al., 2002).

Obwohl die Interaktion von SRP mit Rpl25p im Hefesystem noch nicht gezeigt war, war es aufgrund der funktionellen Konservierung der beteiligten Proteine sehr wahrscheinlich, dass der SRP auch hier über diese Untereinheit an Ribosomen bindet.

Tatsächlich ergab das *Two-Hybrid*-Experiment, dass der SRP, bzw. Srp54p auch in der Hefe in der Lage ist, an Rpl25p zu binden. Ssb1/2p und Btt1p, eine Untereinheit von NAC, wurden als weitere Interaktoren von Rpl25p identifiziert.

Obwohl Ssb1/2p und RAC als funktionelle Protein-Triade am Ribosom zusammenarbeiten (Gautschi et al., 2002) konnte für keine der RAC-Untereinheiten, Ssz1p und Zuo1p, eine direkte Interaktion mit Rpl25p festgestellt werden. Im Fall von Ssz1p ist die Erklärung einfach, da Ssz1p selbst nicht in der Lage ist, an Ribosomen zu binden, sondern über Zuo1p ans Ribosom rekrutiert wird (Gautschi et al., 2001). Die Interaktion von Zuo1p mit Ribosomen ist allem Anschein nach eher durch die Interaktion mit der ribosomalen RNA, als mit dessen Proteinkomponenten bedingt (Yan et al., 1998). Daher ist es verständlich, dass auch hier keine Interaktion beobachtet werden konnte.

Unklar dagegen ist, warum in diesem Versuch zwar Btt1p, nicht aber Egd1p als Interaktor von Rpl25p identifiziert werden konnte, da laut Literatur beide  $\beta$ -NAC-Untereinheiten in der Lage sein sollten, ans Ribosom zu binden (Beatrix et al., 2000). Es scheint unwahrscheinlich, dass sie sich dabei verschiedener Bindestellen bedienen.

Da die direkte Interaktion zwischen Rpl25p und Egd1p später in Bindeexperimenten sowohl im Zellextrakt als auch mit gereinigten Proteinen nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei diesem Befund wohl eher um ein Artefakt des *Two-Hybrid*-Systems. Zwar wurde die Expression der Fusionsproteine im Westernblot überprüft (Daten nicht gezeigt), die Plasmid-Konstrukte jedoch nicht sequenziert. Damit lässt sich nicht eindeutig ausschliessen, dass die Konstrukte Mutationen enthalten, die letztendlich zu einer Beeinträchtigung oder sterischen Hinderung der Bindung von Egd1p an Rpl25p in diesem doch artifiziellen System führen.

#### 4.1.2.2 Bindestudien mit gereinigtem MBP-Rpl25p

Um die Wechselwirkung von Rpl25p mit den im *Two-Hybrid* getesteten Interaktoren gezielt und außerhalb des Kontexts ganzer Ribosomen untersuchen zu können, wurde Rpl25p zunächst als MBP-Fusion nach heterologer Expression in *E. coli* gereinigt. Der MBP-tag diente dazu, die Löslichkeit von Rpl25p zu steigern, das sowohl als 6His- als auch als GST-Fusion größtenteils in unlöslicher Form exprimiert wurde. Um die Interaktion eines Proteins mit Chaperonen untersuchen zu können, ist es jedoch von äußerster Wichtigkeit, dass der Interaktor in gefalteter Form vorliegt. Damit wird verhindert, dass das Ergebnis durch die Erkennung des Zielproteins als ungefaltetes Substrat der Chaperone verfälscht wird. Daher wurde die Konformation des gereinigten Proteins per CD-Spektroskopie untersucht. Obwohl für Rpl25p selbst keine Strukturdaten vorliegen, konnte das Vorkommen von unstrukturierten Bereichen durch Vergleich mit einem Referenzspektrum für gereinigtes MBP, dessen Struktur bekannt ist und das hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Anteile enthält (Spurlino et al., 1991), ausgeschlossen werden.

Das Fusionsprotein, und gereinigtes MBP als Kontrolle, wurden an eine feste Matrix gebunden, um mit Rpl25p interagierende Proteine aus Zellextrakten zu isolieren. Mit der Detektion von Ssb1/2p, Btt1p und des SRP, nicht aber der RAC-Untereinheiten Ssz1p und Zuo1p konnte das Ergebnis des *Two-Hybrid*-Versuchs bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass NAC unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich als Komplex vorliegt (Reimann et al., 1999), wurden auch die NAC-Untereinheiten Egd1p und Egd2p mit Rpl25p co-präzipitiert. Durch *in vitro* Experimente mit gereinigten Komponenten konnte gezeigt werden, dass beide  $\beta$ -NAC-, jedoch nicht die  $\alpha$ -NAC-Untereinheit Egd2p, direkt an Rpl25p binden. Unter Ausnutzung eines Fragments von Egd1p konnte der N-Terminus von Egd1p als Interaktionsbereich mit Rpl25p eingegrenzt werden. Während Volllänge Egd1p spezifisch an Rpl25p bindet, ist ein Protein, dem die ersten 31 As fehlen, dazu nicht mehr in der Lage, wobei dessen Fähigkeit zur Komplexbildung mit Egd2p jedoch nicht beeinträchtigt ist. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die  $\beta$ -NAC-Untereinheit für die Ribosomen-Bindung verantwortlich ist (Reimann et al., 1999), konnte Rpl25p damit eindeutig als ribosomale Bindestelle für NAC bestimmt werden.

Ergänzend muss man hier anmerken, dass Sequenzvergleiche des Fragments von Egd1p mit entsprechenden Regionen von  $\beta$ -NAC-Untereinheiten aus anderen Organismen, in einer kürzlich veröffentlichten Studie (Wegrzyn et al., 2006) zur Identifizierung eines konservierten Motivs, der sog. NAC-Signatur führten, das die Interaktion von NAC mit Ribosomen zu vermitteln scheint.

Sequenzvergleiche der N-Termini von Egd1p und Btt1p lassen den Schluss zu, dass die Ribosomenbindung auch im Fall von Btt1p durch den N-Terminus des Proteins vermittelt wird. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Btt1p den Verlust von Egd1p funktionell kompensieren kann und zu diesem Zweck vermehrt produziert wird, bleibt die genaue Funktion und die Notwendigkeit dieser alternativen  $\beta$ -Untereinheit in der Hefe jedoch weiter unklar.

#### 4.1.3 Charakterisierung der Bindestelle von NAC

Als nächstes sollte die Frage nach der NAC-Bindestelle an Rpl25p geklärt werden. Als erster Anhaltspunkt dienten dazu Veröffentlichungen aus dem *E. coli*-System, in denen gezeigt wurde, dass die Rpl25p entsprechende Untereinheit Rl23p als Bindestelle für Trigger Faktor dient, von dem angenommen wird, dass er in Prokaryoten das funktionelle Äquivalent von NAC darstellt (siehe Einleitung). Auch Ffh, das bakterielle SRP-Homolog bindet an Rl23p und scheint mit Trigger Faktor um die gleiche Bindestelle zu konkurrieren (Raine et al., 2004; Ullers et al.,

2003). Diese Bindestelle konnte auf ein konserviertes Motiv aus 3 Aminosäuren (VSE) eingegrenzt werden, in dem der Glutaminsäurerest (E18) für die Bindung entscheidend zu sein scheint (Kramer et al., 2002). Sequenzvergleiche zwischen Rpl25p und Rl23p zeigten, dass die beiden Proteine konserviert sind. Das VSE-Motiv, ist in leicht abgewandelter Form (TSE), auch in Rpl25p vorhanden. Rpl25p unterscheidet sich jedoch vor allem durch einen 50 Aminosäuren langen N-terminalen Anhang von seinem bakteriellen Homolog, der v.a. Eukaryoten-spezifische funktionelle Elemente, wie Kernlokalisationssequenzen, enthält.

Um die Hypothese zu testen, dass das konservierte TSE-Motiv, bzw. der darin enthaltene Glutaminsäurerest in der Hefe als Bindestelle für NAC fungieren könnte, wurde zunächst versucht Rpl25p funktionell durch Rl23p aus *E. coli* zu ersetzen. Es zeigte sich jedoch, dass trotz der starken Konservierung von Rpl25p aus der Hefe und Rl23p aus *E. coli*, weder Volllänge Rl23p, noch ein chimäres Protein, das, neben der codierenden Sequenz von Rl23p, den N-terminalen Anhang von Rpl25p enthielt, dazu in der Lage waren. Da nicht auszuschließen ist, dass noch andere, weniger augenscheinliche, aber funktionell fatale Unterschiede zwischen den beiden Proteinen die Komplementation von Rpl25p durch Rl23p verhindern, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde das TSE-Motiv in Rpl25p gezielt durch Alaninreste ersetzt. Bereits bei der Charakterisierung des veränderten Hefestammes, wurde offensichtlich, dass die Veränderung des TSE-Motivs die Wechselwirkung von Rpl25p mit zytosolischen Faktoren nicht wesentlich beeinflusst, da im Vergleich zum zuvor untersuchten *RPL25-3HA*-Stamm keine Translations-assoziierten Defekte, wie vermindertes Zellwachstum und erhöhte Sensitivität gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika beobachtet werden konnten. Die Co-Präzipitation von Ssb1/2p und NAC (Egd1p) mit gereinigtem, immobilisiertem MBP-Rpl25AAAp im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Protein zeigte schließlich, dass das TSE-Motiv nicht alleine für die Bindung dieser Faktoren an Rpl25p ausschlaggebend zu sein scheint. Es zeigte sich keine drastische Reduktion der Proteinmenge im Präzipitat im Fall von MBP-Rpl25AAAp, wie man das bei einer ausschließlichen Bindung über das TSE-Motiv erwartet hätte. Es wurde jedoch nicht weiter untersucht, welcher Bereich von Rpl25p für die Bindung von NAC ausschlaggebend ist.

Die vorliegende Arbeit liefert ein weiteres Indiz dafür, dass die L23-Familie ribosomaler Untereinheiten sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten als Bindestelle für Faktoren dient, die im Zuge der Translation für Proteinfaltung (Trigger Faktor und NAC) und die Verteilung dieser Proteine in entsprechende Zielkompartimente (Ffh und SRP) benötigt werden. Der Versuch, die ribosomale Bindestelle von NAC an Rpl25p aufgrund von Sequenz- und funktionellen Homologien mit der entsprechenden ribosomalen Untereinheit aus *E. coli* aufzuklären, hat

gezeigt, dass die größere Komplexität der beteiligten Komponenten im eukaryotischen System gegenüber Eubakterien, zu einer Anpassung dieser Interaktionsplattform geführt hat. Das Vorhandensein des 50 As langen N-terminalen Anhangs an Rpl25p, der dafür sorgt, dass Rpl25p in den Zellkern transportiert wird, dem Ort der Ribosomenassemblierung in Eukaryoten (Fromont-Racine et al., 2003; Schaap et al., 1991) ist z.B. Ausdruck dieser Weiterentwicklung und Anpassung. Es ist also nahe liegend, dass sich auch die direkten Interaktionsstellen auf Rpl25p, genauso wie die Interaktoren selbst, den Anforderungen der höheren Organisation der Eukaryoten, wie z.B. der ausgeprägten Kompartimentierung angepasst haben. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, konnte kürzlich, mittels Crosslink-Experimenten, nachgewiesen werden, dass Hefe-NAC *in vitro* in der Lage ist, über Rl23p an Ribosomen aus *E. coli* zu binden (Wegrzyn et al., 2006). Anders als in der Hefe, führte das Ersetzen des Bereichs um den konservierten E18-Rest durch Alaninreste, in diesem System jedoch zu einer starken Reduktion der Bindung, bzw. des Crosslinks von NAC an das bakterielle Ribosom. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass NAC zwar mit diesem Motiv interagieren kann, diese drei Aminosäuren jedoch in Hefe nicht alleine für die effiziente Bindung des Komplexes an das eukaryotische Ribosom ausschlaggebend sind.

#### 4.1.4 Ausblick

Diese Arbeit hat ein weiteres Indiz für die funktionelle Konservierung der Kopplung von Translation, Faltung und Protein *sorting* am Ribosom geliefert. Sie hat jedoch auch neue Fragen aufgeworfen.

So konnte die ribosomale Untereinheit Rpl25p als Bindestelle für NAC, und darüber hinaus der N-Terminus der  $\beta$ -NAC Untereinheiten als Interaktionsdomäne mit dem Ribosom identifiziert werden, die Frage nach der Bindestelle von NAC auf Rpl25p blieb jedoch vorerst unbeantwortet. Um diese zu definieren, könnte man z.B. *RPL25* durch Zufallsmutagenese verändern und nach solchen Mutanten suchen, die nicht mehr in der Lage sind, mit NAC zu interagieren. Diese könnten etwa durch das Ausbleiben der *Two-Hybrid*-Interaktion mit Btt1p identifiziert werden. Auf ähnliche Weise könnte man auch versuchen, die Interaktionsstellen von NAC mit Rpl25p innerhalb des 30 As-Fragments der  $\beta$ -NAC-Untereinheiten zu detektieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Interaktion von Rpl25p und NAC, und die Beobachtung, dass auch der SRP spezifisch mit Rpl25p interagiert, wurden kürzlich, zusammen mit den Ergebnissen weiterführender Experimente, veröffentlicht (Grallath et al., 2006). Dabei wurde sowohl die Frage nach der Interaktion zwischen SRP und NAC, als auch der

physiologischen Funktion von NAC in der Hefe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass SRP und NAC nicht nur beide spezifisch mit Rpl25p, sondern auch direkt miteinander interagieren und dass dieser Kontakt über die  $\alpha$ -NAC-Untereinheit Egd2p vermittelt wird. In Übereinstimmung mit dem Vorschlag, dass NAC eine Rolle bei der Translokation neu-synthetisierter Proteine ins ER spielt, konnte beobachtet werden, dass die *unfolded protein response*, in NAC-defizienten Zellen induziert ist. Ein Indiz dafür, dass ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren.

Zusammen, mit der im Rahmen der Aufklärung der Kristallstruktur des archaeellen NAC (Spreter et al., 2005) identifizierten UBA-Domäne von  $\alpha$ -NAC, ergibt sich auf der Grundlage dieser Ergebnisse (Grallath et al., 2006) ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von NAC bei der Qualitätskontrolle und dem Abbau fehlgefalteter Proteine, der momentan intensiv untersucht wird. Eine weitere interessante Frage, die durch diese Arbeit aufgeworfen wurde ist, ob NAC und SRP gleichzeitig an Rpl25p binden, oder ob beide Faktoren um die Bindung an die Ribosomen konkurrieren, wie dies in *E. coli* für Trigger Faktor und Ffh der Fall zu sein scheint.

## 4.2 Charakterisierung des Gim-Komplexes durch Analyse von Verkürzungsmutanten

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Beitrag, den einzelne Untereinheiten des Gim-Komplexes zur Interaktion mit ungefalteten Substraten leisten, untersucht werden. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob es substratspezifische Unterschiede bei der Interaktion einzelner GimC-Untereinheiten mit ungefalteten Polypeptidketten gibt.

Die Verwendung des Hefesystems zur Untersuchung der Wechselwirkung einzelner GimC-Untereinheiten mit ungefalteten Substraten bietet, gegenüber den bisher durchgeführten Studien mit dem archaeellen Homolog Prefoldin (Leroux et al., 1999; Lundin et al., 2004; Okochi et al., 2002), eine Reihe bedeutender Vorteile. Der größte Vorteil ergab sich durch die Identifizierung der Zytoskelett-Proteine Aktin, und der Tubuline, als natürliche Substrate von GimC in der Hefe und anderen Eukaryoten (Geissler et al., 1998; Hansen et al., 1999). In Archaeen sind dagegen keine endogenen Substrate von Prefoldin bekannt. Daher wurde bisher zur Untersuchung der Funktion von Prefoldin auf Modellsubstrate, wie Luciferase (aus dem Glühwürmchen) und Rhodanese (aus dem Rind) zurückgegriffen. Auch *in vivo* Experimente sind aus diesem Grund, und wegen der limitierten Methodik zur Manipulation des archaeellen Genoms in diesem System nicht möglich. Im Gegensatz dazu, gibt es in der Hefe, neben den zahlreichen Methoden zur schnellen und einfachen genetischen Manipulation, eine Vielzahl gut etablierter Vektorsysteme,

die die Expression von Genen unter der Kontrolle konstitutiver, aber auch induzierbarer oder reprimierbarer, Promotoren erlaubt. Die Verwendung des LoxP-Cre-Systems zur gezielten Gendisruption ermöglicht zudem, dass Selektionsmarker, durch die offene Leserahmen ersetzt wurden, nachträglich wieder aus dem Genom entfernt werden können, sodass diese Selektionsmarker für weitere Disruptionen oder auch für die Insertion von Plasmiden wieder zur Verfügung stehen. Da für Archaeen bisher kaum Expressionssysteme etabliert wurden, werden archaeelle Prefoldin-Untereinheiten einzeln in *E. coli* exprimiert und später, da die Untereinheiten nach Expression im heterologen System unlöslich sind, *in vitro* zu Komplexen renaturiert. Dabei stellt sich unweigerlich die Frage, inwiefern der Aufbau und die Funktionalität der so erhaltenen Komplexe von diesen artifiziellen Bedingungen beeinflusst sind. Ein klarer Vorteil, den das Hefesystem in Hinblick auf diesen Aspekt bietet, ist dass es sich bei GimC um einen endogenen Proteinkomplex handelt. Dadurch können alle sechs Untereinheiten gleichzeitig, in löslicher Form, in den Zellen exprimiert und korrekt assembliert werden. Die Verwendung von Epitop-tags ermöglicht zudem die gezielte Anreicherung und Reinigung von Proteinen und Proteinkomplexen, wie GimC, aus der Hefe.

Die Verwendung der Hefe als Modellsystem und Quelle einzelner Komponenten für anschließende *in vitro* Studien, ermöglicht also die Untersuchung des Beitrags einzelner GimC-Untereinheiten zur Substratinteraktion, unter Bedingungen, die so gut wie möglich die physiologische Situation widerspiegeln.

Zu diesem Zweck wurde ein Protokoll zur effizienten Reinigung von GimC und beliebiger Verkürzungsmutanten aus der Hefe entwickelt, und die offenen Leserahmen der Substratproteine Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin in Vektoren kloniert, die sowohl deren heterologe Expression in *E. coli*, als auch deren Verwendung in *in vitro* Translationssystemen ermöglicht. Unter Ausnutzung dieser Materialien wurden Testsysteme entwickelt, die es ermöglichen, den Einfluss einzelner GimC-Untereinheiten auf die Substratinteraktion zu validieren.

#### 4.2.1 Charakterisierung der Verkürzungsmutanten *in vivo*

Um die Wechselwirkung von GimC mit den Substraten Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zu untersuchen, wurden die Untereinheiten zunächst einzeln jeweils am C- und N-Terminus verkürzt. Dabei wurden hydrophobe Bereiche entfernt, die vermutlich für die Substratinteraktion verantwortlich sind, da Chaperon-Substrat-Interaktionen in der Regel von hydrophoben Oberflächen der Chaperone vermittelt werden.



Der Vorteil dieser Mutanten, denen jeweils nur die Enden der *coiled coils* fehlen, besteht darin, dass die  $\beta$ -Faltblatt-Bereiche der Untereinheiten, die für die Assemblierung von GimC wichtig sind, nicht verändert werden. Im Gegensatz zur Deletion ganzer Untereinheiten, die in vielen Fällen die Bildung von Teilkomplexen zur Folge hat (vgl. 1.2.4), bieten diese Verkürzungsmutanten daher die Möglichkeit, Effekte, die durch die Veränderung einer oder mehrerer Untereinheiten entstehen, isoliert und gezielt betrachten zu können.

Die *in vivo* Charakterisierung dieser Mutanten ergab, dass die Verkürzungsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber LatrunculinA und Benomyl aufwiesen, Chemikalien, die das Aktin- und Tubulin-System beeinträchtigen, indem sie Polymerisations-kompetente Monomere (bzw. Dimere im Fall von Tubulin) binden. Da Wildtyp-Zellen die Sequestrierung dieser Komponenten durch eine erhöhte Neusynthese von Aktin und Tubulin kompensieren, deutet die Sensitivität der Mutanten gegenüber diesen Chemikalien darauf hin, dass die Bereiche, um die die Untereinheiten verkürzt wurden, tatsächlich für die Funktionalität von GimC bei der Neusynthese, bzw. Faltung, von Aktin und Tubulin wichtig sind. Für die Tests wurde jeweils nur eine Untereinheit des Komplexes verändert und unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors in Zellen des entsprechenden Deletionsstammes eingebracht. Die Plasmid-codierte, veränderte Version wird daher in der Zelle, als Produkt der einzigen Genkopie, zusammen mit den fünf endogenen Untereinheiten zu Komplexen assembliert. Diese Untersuchungen dienen jedoch hauptsächlich einer initialen Einschätzung, welchen Effekt die Verkürzungsmutanten auf die Neusynthese, bzw. Faltung der Zytoskelett-Komponenten haben. Dieser Effekt wird indirekt, an der Viabilität der Zellen, beurteilt.

Eine exaktere Methode, den Einfluss von GimC auf die Generierung nativen Aktins zu bestimmen, bietet die Messung der Aktinfaltungskinetik *in vivo*. Diese ermöglicht es nicht nur Unterschiede zwischen einzelnen Mutanten zu detektieren, sondern erlaubt auch die direkte Visualisierung und Validierung des Effekts der Mutationen auf die *de novo* Synthese von Aktin. Anders als bei der indirekten Untersuchung mittels des LatrunculinA-vermittelten Wachstumsdefekts, wird hier gezielt die Generierung und Faltung neu-synthetisierten Aktins betrachtet. Mit Hilfe dieser Methode, konnte gezeigt werden, dass das Fehlen beider zentraler  $\alpha$ -Untereinheiten, Gim2p und Gim5p gleichzeitig, denselben Effekt auf die *de novo* Synthese von Aktin hat, wie das Fehlen des gesamten Komplexes. Sowohl die Geschwindigkeit als auch die Effizienz der Reaktion sind drastisch reduziert. Die Analyse von Mutanten, bei denen nur eine dieser Untereinheiten fehlt, oder als Verkürzungsmutante vorliegt, zeigte, dass das Fehlen einer ganzen  $\alpha$ -Untereinheit schwerwiegendere Auswirkungen auf die *de novo* Synthese von Aktin hat, als die Verkürzung der  $\alpha$ -helikalen Bereiche der entsprechenden Untereinheit. Es konnte ausserdem

gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten unterschiedliche Beiträge zur Interaktion mit diesem Substrat leisten. Dabei führten Veränderungen der Gim5p-Untereinheit generell zu einem stärkeren Effekt, als die Veränderung von Gim2p.

#### 4.2.2 Expression und Reinigung verschiedener Gim-Komplexe

Um die Unterschiede bei der Substratinteraktion einzelner GimC-Untereinheiten gezielt *in vitro* untersuchen zu können, wurde eine Strategie entwickelt, die es ermöglicht GimC und eine große Vielfalt verschiedener Verkürzungsmutanten als Komplex aus der Hefe zu isolieren.

In Anlehnung an eine bereits etablierte Methode zur Reinigung des endogenen Gim-Komplexes aus der Hefe, wurde eine GimC-Untereinheit mit einem, mittels TEV-Protease abspaltbaren, 6His-Epitop versehen, das die schnelle und effiziente Isolierung des Komplexes mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus Zellysaten erlaubt. Diese Veränderung trug maßgeblich zur Steigerung der Ausbeute der Reinigung bei. Da das ProteinA-Epitop bei der Affinitätschromatographie irreversibel an eine IgG-Sepharosematrix gebunden wurde, musste der Komplex bisher mittels TEV-Spaltung von der Matrix freigesetzt werden. Diese Spaltung war in den meisten Fällen, wahrscheinlich durch die schlechte Zugänglichkeit der Erkennungssequenz für die TEV-Protease an der vollbesetzten Matrix, meist unvollständig, was zu enormen Verlusten führte. Das 6His-Epitop dagegen, kann, zusammen mit der daran fusionierten Untereinheit und dem gebundenen Komplex, unter nativen Pufferbedingungen nahezu vollständig mit Imidazol von der Ni-NTA-Matrix eluiert werden. Das Epitop kann, bei Bedarf, nachträglich entfernt werden, wobei die Effizienz der TEV-Spaltung durch die freie Zugänglichkeit der Erkennungsstellen in Lösung viel größer ist. Da auch die verwendete TEV-Protease mit einem 6His-Epitop fusioniert ist, können sowohl das abgespaltene 6His-Epitop, als auch die TEV-Protease durch Bindung an eine weitere Ni-NTA-Matrix aus der Lösung entfernt werden.

Um die detaillierte Untersuchung des Beitrags der GimC-Untereinheiten zur Substratinteraktion zu ermöglichen, wurde ein Expressionskonzept entwickelt, das es erlaubt, die sechs verschiedenen GimC-Untereinheiten sowohl in unveränderter, als auch in veränderter Form, unter Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Auxotrophiemarker in beliebiger Weise miteinander zu kombinieren. So können theoretisch Komplexe generiert werden, in denen nur eine, aber auch zwei, drei, vier, fünf, oder alle sechs Untereinheiten gleichzeitig verändert sind. Durch die Expression unter Kontrolle des *CUPI*-Promotors konnte die Ausbeute an GimC im Vergleich zu einer ähnlichen, konventionellen Reinigungsstrategie ohne Überproduktion

durchschnittlich um das 1500-fache gesteigert werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Effizienz und das Gelingen der Reinigung vom Komplex abhängig sind. So konnte ein Komplex mit sechs verkürzten Untereinheiten bisher nicht in ausreichenden Mengen gereinigt werden. Alle Untereinheiten wurden effizient exprimiert, konnten nach Aufschluss der Zellen über das 6His-Epitop als Komplex an die Ni-NTA-Säule gebunden und mit Imidazol wieder eluiert werden. Die einzelnen Untereinheiten waren jedoch bereits zu diesem Zeitpunkt und dann auch in den folgenden Stadien der Reinigung nur noch per Westernblot eindeutig nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die genaue Ursache dafür konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Auch die Analyse des GimC 1NTCT-Komplexes wurde nicht weiter verfolgt, da sich schon während der Reinigung, und später auch der Aufbewahrung, höhermolekulare Aggregate gebildet haben, die für *in vitro* Experimente nicht geeignet sind (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für die Aggregation von GimC 1NTCT könnte sein, dass durch die Verkürzung der Gim1p-Untereinheit Oberflächen anderer Untereinheiten exponiert werden, die die Aggregation des Komplexes begünstigen.

Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo* Charakterisierung einzelner Verkürzungsmutanten, die angedeutet haben, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p unterschiedliche Beiträge zur Interaktion mit Aktin und Tubulin leisten, wurden diese Untereinheiten für weitere Analysen ausgewählt. Für die Etablierung von *in vitro* Testsystemen mit GimC und verschiedenen Mischkomplexen, wurden daher Komplexe exprimiert und gereinigt, bei denen entweder eine dieser Untereinheiten, oder beide gleichzeitig verändert waren.

### 4.2.3 Funktionelle Tests *in vitro*

In Anlehnung an eine Methode, die zur Untersuchung der Chaperonfunktion von GroEL verwendet wurde (Weber and Hayer-Hartl, 2000), sollten turbidimetrische Tests etabliert werden, die es erlauben zu messen, inwiefern GimC, bzw. dessen Verkürzungsmutanten in der Lage sind, die Aggregation ungefalteter Modellsubstrate zu verhindern. Da für diesen Zweck endogene Substrate aus der Hefe verwendet werden sollten und diese für die Experimente ohnehin in entfalteter Form benötigt wurden, wurden Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin der Hefe nach heterologer Expression in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* gewonnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, konnte ein Testsystem etabliert werden, das es erlaubt, die Aggregation denaturierten Aktins in An- oder Abwesenheit von GimC spektrometrisch zu verfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass GimC die Aggregation denaturierten Aktins in Abhängigkeit von der Konzentration verhindert. Dabei war ein 5-facher molarer Überschuss von GimC über Aktin

ausreichend, um die Aggregation des denaturierten Aktins vollständig zu unterdrücken. Aufgrund der, aus der Kristallstruktur des archaellen Prefoldin, abgeleiteten Dimensionen des Komplexes mit einer lateralen Ausdehnung von ca. 90 Å (Siegert et al, 2000) und des Anteils der hydrophoben Aminosäuren des Aktinmoleküls, die relativ gleichmäßig auf der Polypeptidkette verteilt sind, lässt sich abschätzen, dass theoretisch ca. 6,7 Gim-Komplexe benötigt werden, um diesen hydrophoben Bereich abzuschirmen. Aktin hat 375 As, davon sind 141 (also 37,6%) hydrophob. Eine Peptidbindung hat eine Länge von ca. 4,3 Å (Stryer, 1996). Würde man alle hydrophoben As von Aktin aneinanderreihen ergäbe sich ein Bereich von 606 Å, der von GimC abgeschirmt werden müsste. Natürlich liegen diese As in der Praxis nicht nebeneinander, andererseits liegt denaturiertes Aktin in Lösung jedoch auch nicht als ausgestreckte Kette, sondern eher in Form eines flexiblen Zufallsknäuels vor. Damit ist es also gut möglich, dass hydrophobe Bereiche an verschiedenen Stellen der Kette gleichzeitig vom selben GimC-Molekül gebunden werden können, womit es plausibel erscheint, dass ein fünf-facher molarer Überschuss an GimC ausreichen sollte, um die Aggregation denaturierten Aktins in Lösung effizient zu verhindern.

Die Verkürzungsmutanten dagegen, waren nicht in der Lage, die Aggregation unter diesen Bedingungen genauso effizient zu verhindern, wie der Wildtyp-Komplex. Es konnte gezeigt werden, dass dies durch eine reduzierte Bindung der Mutanten an die Aktinketten bedingt ist. Dabei hat die Verkürzung der distalen Enden von Gim2p einen relativ geringen Effekt, während die Verkürzung von Gim5p zu einer drastischen Reduktion der Bindung führt. Werden beide Untereinheiten verkürzt, werden nur noch knapp 10% der Aktinketten gebunden. Dies deutet auf einen additiven Effekt von Gim2p und Gim5p bei der Interaktion mit denaturiertem Aktin hin, wobei Gim5p den hauptsächlichsten Beitrag leistet.

Initiale Experimente mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin haben gezeigt, dass auch denaturiertes  $\alpha$ -Tubulin in Lösung effizient aggregiert und dass GimC in der Lage ist, dessen Aggregation zu verhindern. Die Bestimmung derjenigen Konzentration von Wildtyp-GimC, die diese Aggregation effizient unterdrückt, ist jedoch noch nicht abgeschlossen, womit eine Analyse des Effekts der Verkürzungsmutanten noch nicht möglich war.

Mit Hilfe eines prokaryotischen Translationssystems sollte untersucht werden, inwiefern die veränderten Gim-Komplexe in der Lage sind, *de novo* synthetisiertes Aktin in Lösung zu halten. Dafür wurde ein in unserem Labor für die Validierung von TRiC-Substraten entwickeltes Protokoll entsprechend angepasst. Dazu musste vor allem die optimale GimC-Konzentration im Translationsansatz ermittelt werden. Mit Hilfe dieses experimentellen Konzepts konnten die Ergebnisse der turbidimetrischen Tests für Aktin bestätigt werden. Während Wildtyp-GimC

*de novo* synthetisiertes Aktin effizient in Lösung hält, sind die Verkürzungsmutanten diese Fähigkeit betreffend mehr oder weniger eingeschränkt, wobei sich erneut ein additiver Effekt zwischen Gim2p und Gim5p zeigt. In diesem System wurde erstmals auch der Einfluss von GimC und dessen Mutanten auf die Löslichkeit *de novo* synthetisierten  $\alpha$ -Tubulins getestet. Es zeigte sich, dass in diesem Fall die Gim5p-Untereinheit alleine die Interaktion mit dem Substrat zu vermitteln scheint.

Damit wurde gezeigt, dass es tatsächlich substratspezifische Unterschiede bei der Interaktion der GimC-Untereinheiten mit den Hauptsubstraten Aktin und  $\alpha$ -Tubulin gibt.

#### 4.2.4 Ausblick

Mit dem hier vorgestellten Konzept, das es erlaubt, Wildtyp-GimC und verschiedenste Mischkomplexe in der Hefe massiv anzureichern und effizient zu reinigen, wurde der Grundstein für eine Vielzahl von Experimenten gelegt, für die substantielle Mengen des eukaryotischen Chaperons benötigt werden. Die einfache Herstellung grosser Mengen GimC mit hohem Reinheitsgrad ist z.B. ein wesentlicher Schritt für die Aufklärung der Kristallstruktur, ermöglicht aber auch die Analyse der Komplexzusammensetzung mittels Massenspektroskopie.

Die am Beispiel der  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p etablierten *in vitro* Experimente, erlauben die Untersuchung der Wechselwirkung von GimC und dessen Verkürzungsmutanten mit endogenen Substraten und ermöglichen die intensive Charakterisierung des Beitrags einzelner Untereinheiten zur Interaktion mit diesen Substraten. In Zukunft können jedoch auch Proteine, die als potentielle GimC-Substrate identifiziert werden, mit Hilfe dieser Experimente validiert werden. Die Analyse der Interaktion von GimC mit den derzeit bekannten Substraten ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Einerseits wurden bisher nur exemplarisch die  $\alpha$ -Untereinheiten Gim2p und Gim5p untersucht, andererseits wurden auch die experimentellen Möglichkeiten, die Substrate betreffend, noch nicht voll ausgeschöpft. So wurde der turbidimetrische Ansatz zur Messung der Verhinderung der Aggregation denaturierter Substrate durch GimC und dessen Mutanten zunächst nur für Aktin etabliert. Die optimalen Bedingungen, um dieses Experiment auch mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin durchzuführen, wurden noch nicht ausreichend definiert. Auch die Reaktionsbedingungen für die *in vitro* Translation, die es erlauben, den Einfluss von GimC-Mutanten auf die Löslichkeit *de novo* synthetisierten  $\beta$ -Tubulins zu untersuchen, wurden noch nicht gefunden.

In Kombination mit einer Strategie, die in unserer Gruppe zur Reinigung des Chaperonins TRiC aus der Hefe entwickelt wurde, stehen nunmehr die wesentlichen Komponenten, die zur

effizienten Generierung nativen Aktins benötigt werden, in gereinigter Form für *in vitro* Experimente zur Verfügung. Diese könnten Antwort auf viele ungeklärte Fragen geben. Zum einen können, wie hier gezeigt, GimC-Mutanten, bezüglich der Interaktion mit Substraten, aber auch der Interaktion mit dem Chaperonin untersucht werden. Zum anderen ermöglicht dieses System die Untersuchung der Wechselwirkung veränderter Substrate mit Wildtyp-GimC, mit dem Ziel, die Interaktionsstellen an den Substraten zu definieren. Darüber hinaus können, durch *in vitro* Translation im prokaryotischen System, unter Zugabe von GimC und TRiC, z.B. Aktin-Mutanten, die in der Hefe lethal wären, in löslicher Form produziert werden und stünden so zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung.

Die *in vitro* Translation von Aktin oder den Tubulinen unter Zugabe von GimC erlaubt jedoch noch eine Vielzahl weiterer Experimente, die andere Komponenten des Aktin- und Tubulin-Faltungswegs betreffen. So können z.B. Punktmutanten des Chaperonis TRiC in diesem System untersucht werden. Dabei gewährleistet die Zugabe von GimC, dass die Rahmenbedingungen für die Faltung des Modellsubstrats so ideal wie möglich sind, damit im Experiment nur der tatsächliche Effekt der TRiC-Mutation zum Tragen kommt. Auch die Funktion der verschiedenen Tubulinfaltungs-Kofaktoren kann mit Hilfe dieses Systems untersucht werden. Hier wird die Effizienz der Neusynthese des Substrats ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin) durch die Zugabe von GimC und TRiC während der Translation gewährleistet. Die Zugabe einzelner oder Kombinationen mehrerer Tubulinfaltungs-Kofaktoren zur Reaktion ermöglicht dann die Untersuchung deren Funktion bei der Generierung polymerisationskompetenten  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulins.

## 5 Literaturverzeichnis

- Archer, J. E., Vega, L. R., and Solomon, F. (1995). Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo. *Cell* 82, 425-434.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905-920.
- Beatrix, B., Sakai, H., and Wiedmann, M. (2000). The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* 275, 37838-37845.
- Beckmann, R., Spahn, C. M., Frank, J., and Blobel, G. (2001). The active 80S ribosome-Sec61 complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 543-554.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bloss, T. A., Witze, E. S., and Rothman, J. H. (2003). Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 1066-1071.
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T., and Craig, E. A. (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38, 1-17.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Buskiewicz, I., Deuerling, E., Gu, S. Q., Jockel, J., Rodnina, M. V., Bukau, B., and Wintermeyer, W. (2004). Trigger factor binds to ribosome-signal-recognition particle (SRP) complexes and is excluded by binding of the SRP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7902-7906.
- Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M., and Crooke, S. T. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3332-3336.
- Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* 12, 87-100.
- Chan, R. K., and Otte, C. A. (1982). Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol* 2, 11-20.
- Craig, E., Ziegelhoffer, T., Nelson, J., Laloraya, S., and Halladay, J. (1995). Complex multigene family of functionally distinct Hsp70s of yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 441-449.

- Craig, E. A., and Jacobsen, K. (1985). Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol Cell Biol* 5, 3517-3524.
- Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1994). Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *J Biol Chem* 269, 9798-9804.
- Deng, J. M., and Behringer, R. R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* 4, 264-269.
- Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., and Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 93, 125-138.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-569.
- Ellis, R. J., and Hartl, F. U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* 9, 102-110.
- Ellis, R. J., and Hemmingsen, S. M. (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14, 339-342.
- Ellis, R. J., van der Vies, S. M., and Hemmingsen, S. M. (1989). The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* 55, 145-153.
- Ewalt, K. L., Hendrick, J. P., Houry, W. A., and Hartl, F. U. (1997). In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90, 491-500.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Farr, G. W., Scharl, E. C., Schumacher, R. J., Sondak, S., and Horwich, A. L. (1997). Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell* 89, 927-937.
- Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci* 6, 743-760.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Figueiredo, L., Klunker, D., Ang, D., Naylor, D. J., Kerner, M. J., Georgopoulos, C., Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2004). Functional characterization of an archaeal GroEL/GroES chaperonin system: significance of substrate encapsulation. *J Biol Chem* 279, 1090-1099.
- Frankel, S., Condeelis, J., and Leinwand, L. (1990). Expression of actin in *Escherichia coli*. Aggregation, solubilization, and functional analysis. *J Biol Chem* 265, 17980-17987.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.



- Funfschilling, U., and Rospert, S. (1999). Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell* *10*, 3289-3299.
- Galla, H.-J. (1988). *Spektroskopische Methoden in der Biochemie* (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. H., and Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* *69*, 1043-1050.
- Gautschi, M., Lilie, H., Funfschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rucknagel, P., and Rospert, S. (2001). RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3762-3767.
- Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., and Rospert, S. (2002). A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4209-4214.
- Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *Embo J* *17*, 952-966.
- Grallath, S., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Bracher, A., Hartl, F. U., and Siegers, K. (2006). L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep* *7*, 78-84.
- Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* *8*, 4108-4116.
- Gu, S. Q., Peske, F., Wieden, H. J., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2003). The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the Escherichia coli ribosome. *Rna* *9*, 566-573.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* *24*, 2519-2524.
- Gyuris, J., and Duda, E. G. (1986). High-efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* cells by bacterial minicell protoplast fusion. *Mol Cell Biol* *6*, 3295-3297.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J., and Beckmann, R. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* *427*, 808-814.
- Hansen, W. J., Cowan, N. J., and Welch, W. J. (1999). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol* *145*, 265-277.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* *381*, 571-579.
- Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* *295*, 1852-1858.
- Hoyt, M. A., Macke, J. P., Roberts, B. T., and Geiser, J. R. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics* *146*, 849-857.

- Hu, G. Z., and Ronne, H. (1994). Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res* 22, 2740-2743.
- Huang, P., Gautschi, M., Walter, W., Rospert, S., and Craig, E. A. (2005). The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat Struct Mol Biol* 12, 497-504.
- Hundley, H., Eisenman, H., Walter, W., Evans, T., Hotokezaka, Y., Wiedmann, M., and Craig, E. (2002). The in vivo function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4203-4208.
- Hundley, H. A., Walter, W., Bairstow, S., and Craig, E. A. (2005). Human Mpp11 J protein: ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous. *Science* 308, 1032-1034.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S. Z., Jr., Yates, J. R., 3rd, Schieltz, D., and Sachs, A. B. (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *Rna* 8, 948-958.
- James, P., Pfund, C., and Craig, E. A. (1997). Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* 275, 387-389.
- Johnston, M., and Davis, R. W. (1984). Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4, 1440-1448.
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., and Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70, 755-775.
- Kim, S. Y., and Craig, E. A. (2005). Broad sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* lacking ribosome-associated chaperone ssb or zuo1 to cations, including aminoglycosides. *Eukaryot Cell* 4, 82-89.
- Klumpp, M., Baumeister, W., and Essen, L. O. (1997). Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. *Cell* 91, 263-270.
- Klunker, D., Haas, B., Hirtreiter, A., Figueiredo, L., Naylor, D. J., Pfeifer, G., Muller, V., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2003). Coexistence of group I and group II chaperonins in the archaeon *Methanosarcina mazei*. *J Biol Chem* 278, 33256-33267.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwulbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., and Bukau, B. (2002). L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* 419, 171-174.
- Kubota, H., Hynes, G., and Willison, K. (1995). The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* 230, 3-16.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G., and Wiedmann, M. (1995). Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5411-5415.
- Lee, C., Levin, A., and Branton, D. (1987). Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 166, 308-312.
- Leroux, M. R., Fandrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A. N., Brown, J. R., Schiebel, E., Dobson, C. M., and Hartl, F. U. (1999). MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *Embo J* 18, 6730-6743.
- Lewis, S. A., Tian, G., Vainberg, I. E., and Cowan, N. J. (1996). Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* 132, 1-4.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.
- Liou, A. K., and Willison, K. R. (1997). Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. *Embo J* 16, 4311-4316.
- Lithgow, T., Horst, M., Rospert, S., Matouschek, A., Haucke, V., and Schatz, G. (1995). Import and folding of proteins by mitochondria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 609-617.
- London, J., Skrzynia, C., and Goldberg, M. E. (1974). Renaturation of *Escherichia coli* tryptophanase after exposure to 8 M urea. Evidence for the existence of nucleation centers. *Eur J Biochem* 47, 409-415.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lopez, N., Halladay, J., Walter, W., and Craig, E. A. (1999). SSB, encoding a ribosome-associated chaperone, is coordinately regulated with ribosomal protein genes. *J Bacteriol* 181, 3136-3143.
- Lundin, V. F., Stirling, P. C., Gomez-Reino, J., Mwenifumbo, J. C., Obst, J. M., Valpuesta, J. M., and Leroux, M. R. (2004). Molecular clamp mechanism of substrate binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4367-4372.
- Lutcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur J Biochem* 228, 531-550.
- Macario, A. J., and Conway De Macario, E. (2001). The molecular chaperone system and other anti-stress mechanisms in archaea. *Front Biosci* 6, D262-283.
- Manney, T. R., and Woods, V. (1976). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the alpha mating-type factor. *Genetics* 82, 639-644.
- Markesich, D. C., Gajewski, K. M., Nazimiec, M. E., and Beckingham, K. (2000). bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery\*. *Development* 127, 559-572.

- Mascorro-Gallardo, J. O., Covarrubias, A. A., and Gaxiola, R. (1996). Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172, 169-170.
- Melville, M. W., McClellan, A. J., Meyer, A. S., Darveau, A., and Frydman, J. (2003). The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. *Mol Cell Biol* 23, 3141-3151.
- Mortimer, R. K., and Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113, 35-43.
- Morton, W. M., Ayscough, K. R., and McLaughlin, P. J. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol* 2, 376-378.
- Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., and Craig, E. A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 71, 97-105.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Okochi, M., Yoshida, T., Maruyama, T., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., and Yohda, M. (2002). Pyrococcus prefoldin stabilizes protein-folding intermediates and transfers them to chaperonins for correct folding. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 769-774.
- Otto, H., Conz, C., Maier, P., Wolfle, T., Suzuki, C. K., Jenö, P., Rucknagel, P., Stahl, J., and Rospert, S. (2005). The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10064-10069.
- Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-496.
- Parthun, M. R., Mangus, D. A., and Jaehning, J. A. (1992). The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding. *Mol Cell Biol* 12, 5683-5689.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B. A., Lopez-Buesa, P., Walter, W. A., Wiedmann, M., and Craig, E. A. (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J* 17, 3981-3989.
- Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* 297, 1345-1348.
- Poritz, M. A., Bernstein, H. D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H., and Walter, P. (1990). An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* 250, 1111-1117.
- Raine, A., Ivanova, N., Wikberg, J. E., and Ehrenberg, M. (2004). Simultaneous binding of trigger factor and signal recognition particle to the *E. coli* ribosome. *Biochimie* 86, 495-500.
- Rakwalska, M., and Rospert, S. (2004). The ribosome-bound chaperones RAC and Ssb1/2p are required for accurate translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24, 9186-9197.

- Raue, H. A., Otaka, E., and Suzuki, K. (1989). Structural comparison of 26S rRNA-binding ribosomal protein L25 from two different yeast strains and the equivalent proteins from three eubacteria and two chloroplasts. *J Mol Evol* 28, 418-426.
- Recht, M. I., Douthwaite, S., and Puglisi, J. D. (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *Embo J* 18, 3133-3138.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S., and Wiedmann, B. (1999). Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* 15, 397-407.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schaap, P. J., van't Riet, J., Woldringh, C. L., and Raue, H. A. (1991). Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 221, 225-237.
- Schagger, H., Aquila, H., and Von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173, 201-205.
- Schoepfer, R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* 124, 83-85.
- Shi, X., Parthun, M. R., and Jaehning, J. A. (1995). The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* 165, 199-202.
- Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Guha, S., and Hartl, F. U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *Embo J* 22, 5230-5240.
- Siegers, K., and Schiebel, E. (2000). Purification of GimC from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 140, 185-193.
- Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F. U. (1999). Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *Embo J* 18, 75-84.
- Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2000). Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell* 103, 621-632.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107, 373-386.
- Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13, 127-144.

- Spreter, T., Pech, M., and Beatrix, B. (2005). The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain. *J Biol Chem* 280, 15849-15854.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y., and Quioco, F. A. (1991). The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* 266, 5202-5219.
- Stilo, R., Liguoro, D., di Jeso, B., Leonardi, A., and Vito, P. (2003). The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1034-1041.
- Stroud, R. M., and Walter, P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* 9, 754-759.
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademie Verlag.
- Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C., and Cowan, N. J. (1996). Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell* 86, 287-296.
- Ullers, R. S., Houben, E. N., Raine, A., ten Hagen-Jongman, C. M., Ehrenberg, M., Brunner, J., Oudega, B., Harms, N., and Luirink, J. (2003). Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the Escherichia coli ribosome. *J Cell Biol* 161, 679-684.
- Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* 93, 863-873.
- van Beekvelt, C. A., de Graaff-Vincent, M., Faber, A. W., van't Riet, J., Venema, J., and Raue, H. A. (2001). All three functional domains of the large ribosomal subunit protein L25 are required for both early and late pre-rRNA processing steps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 29, 5001-5008.
- Villardell, J., and Warner, J. R. (1997). Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* influences both the splicing of its own transcript and the processing of rRNA. *Mol Cell Biol* 17, 1959-1965.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Walter, P., and Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10, 87-119.
- Wang, S., Sakai, H., and Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol* 130, 519-528.
- Weber, F., and Hayer-Hartl, M. (2000). Prevention of rhodanese aggregation by the chaperonin GroEL. *Methods Mol Biol* 140, 111-115.

- Wegrzyn, R. D., and Deuerling, E. (2005). Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol Life Sci* 62, 2727-2738.
- Wegrzyn, R. D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., and Deuerling, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem* 281, 2847-2857.
- Wiedmann, B., and Prehn, S. (1999). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Lett* 458, 51-54.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
- Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S., and Craig, E. A. (1998). Zuotin, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone. *Embo J* 17, 4809-4817.
- Yotov, W. V., Moreau, A., and St-Arnaud, R. (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 18, 1303-1311.
- Zimmerman, S. B., and Trach, S. O. (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 222, 599-620.
- Zwieb, C., and Eichler, J. (2002). Getting on target: the archaeal signal recognition particle. *Archaea* 1, 27-34.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Juliane Schwarz  
Geburtsdatum: 24.12.73  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### AUSBILDUNG

1980-1984 Grundschule München  
1984-1993 Willi-Graf-Gymnasium, München  
1993 Abitur  
1993-2000 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
1996 Vordiplom  
1999 Diplomprüfungen in den Fächern

- Genetik
- Biochemie
- Mikrobiologie
- Zoologie (molekularbiologische Richtung)

1999-2000 Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie und Genetik der LMU, München bei Prof. Dr. Regine Kahmann  
(unter Betreuung von Dr. Christian Koch)  
Thema: „Untersuchung des Transkriptionsfaktors MBF während des Zellzyklus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*: Lokalisierung und Charakterisierung der Chromatinassoziation der Komponenten Mbp1 und Swi6“

2000-2006 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München bei Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl  
(in der selbstständigen Arbeitsgruppe von Dr. Katja Siegers)  
Thema: „Proteinfaltung im Zytosol der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“



## **Danksagung**

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl für seine wissenschaftliche Beschirmung danken.

Zu größtem Dank bin ich Dr. Katja Siegers verpflichtet, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in ihrem Labor anzufertigen. Auch, wenn es nicht immer einfach war, stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Von ihr habe ich mehr gelernt, als ich jemals erwartet hätte.

Prof. Dr. Stefan Jentsch danke ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu vertreten.

Es war schön, in einem Institut zu arbeiten, in dem man so viele verschiedene Menschen trifft. Allen, die während dieser fünf Jahre meinen Weg gekreuzt haben, möchte ich für die Bereicherung meines Lebens danken. Vor allem meinen Kolleginnen Ulrike Böttcher, Bettina Bölter, Silke Grallath und Ute Zeidler kann ich gar nicht genug für die Freundschaft und Unterstützung danken, die sie mir entgegengebracht haben.

An dieser Stelle möchte ich auch Andrea Obermayr-Rauter, Bernd Grampp, Peter Hitzler und dem gesamten technischen Personal danken, ohne deren nicht Enden wollenden Einsatz es diese Abteilung gar nicht gäbe.

Allen meinen Freunden, die mich schon während des Studiums und der Diplomarbeit ertragen haben, danke ich dafür, dass sie nochmal fünf Jahre mit mir durchgehalten haben. Trotz diverser Bahnhöfe und böhmischer Dörfer hatten sie immer ein offenes Ohr für mich, und haben es geschickt verstanden, mich im richtigen Moment davon zu überzeugen, dass mir die Arbeit nicht davonläuft.

Mein größter Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mir in allen Lebenslagen den Rücken gestärkt und mich mit aller Kraft, und in jeder Beziehung, bedingungslos unterstützt haben. Ohne sie wäre ich nicht hier und vor allem nicht das, was ich heute bin. Sie haben mir mehr gegeben, als ich in Worte fassen kann.