

***In vivo* und *in vitro* Charakterisierung von
Proteinkomplexen eukaryotischer
Ribosomenbiogenesefaktoren**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

- Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Juliane Merl

aus Schwandorf

Regensburg 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 03.11.2009

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
1. Gutachter:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
2. Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Dresselhaus
3. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2010

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Tschochner und Dr. Philipp Milkereit am Lehrstuhl für Biochemie III des Instituts für Mikrobiologie, Genetik und Biochemie der Universität Regensburg erstellt.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens; andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, den 03.11.2009

Juliane Merl

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Herbert Tschochner für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten.

Bei Dr. Philipp Milkereit und Dr. Joachim Griesenbeck bedanke ich mich für die vielen guten Anregungen, neuen Ideen und das große Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Kristin Hergert und Steffen Jakob für die tolle, lustige und effektive Zusammenarbeit der letzten Jahre.

Bei Christoph Neuhäuser bedanke ich mich für seine Hilfe bei meinen Anfängen mit den Insektenzellen in der Zellkultur.

Bei Jochen Gerber, Steffen Jakob, Maja Klug und insbesondere Thomas Hierlmeier bedanke ich mich für die Zeit und Mühe, die sie beim Korrekturlesen dieser Arbeit investiert haben.

Allen anderen Kollegen in der Arbeitsgruppe Tschochner danke ich für den kameradschaftlichen Umgang, die anregenden Diskussionen, die Hilfestellung bei den verschiedensten Problemen und nicht zuletzt das sehr angenehme Arbeitsklima.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mir in den letzten Jahren in jeder erdenklichen Form beigestanden haben. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe hätte ich es wohl nicht so weit geschafft.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zusammensetzung und Funktion von Ribosomen.....	1
1.2	Struktur prokaryotischer und eukaryotischer Ribosomen.....	2
1.3	Biosynthese eukaryotischer Ribosomen.....	3
1.3.1	Der Nukleolus als Ort der rDNA-Transkription und früher Ribosomenreifung	4
1.3.2	Transkription der rDNA durch die RNA-Polymerasen I und III	5
1.3.3	Funktionen von Ribosomenbiogenesefaktoren.....	8
1.3.3.1	Modifikationen der (prä-) rRNA	9
1.3.3.2	Prozessierung der (prä-) rRNA.....	10
1.3.3.3	Assemblierung der ribosomalen Proteine	14
1.3.3.4	Intranukleärer Transport und Export präribosomaler Partikel	15
1.3.4	Dynamik präribosomaler Partikel.....	17
1.3.4.1	Zusammensetzung des 90S Partikels	17
1.3.4.2	Synthese der kleinen ribosomalen Untereinheit	19
1.3.4.3	Synthese der großen ribosomalen Untereinheit	19
1.4	Quantitative Massenspektrometrie als sensitive Methode zum Vergleich der Proteinzusammensetzung präribosomaler Komplexe.....	20
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	21
2	Ergebnisse	25
2.1	Charakterisierung von epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren in An- und Abwesenheit von rRNA-Synthese durch RNA-Polymerase I.....	25
2.1.1	(prä-) rRNA- und Proteingehalt in Wildtyp und <i>rnm3-8</i> Hefezellen.....	25
2.1.2	Intrazelluläre Verteilung der epitopmarkierten Proteine	27
2.1.3	(prä-) rRNA Koaffinitätsreinigung durch die epitopmarkierten Faktoren.....	30
2.2	Semiquantitativer Vergleich der Proteinzusammensetzung von Affinitätsreinigungen von epitopmarkierten Ribosomenbiogenese-faktoren in An- und Abwesenheit von rRNA-Synthese.....	36
2.2.1	Ablauf der quantitativen massenspektrometrischen Analyse.....	36
2.2.2	Bestimmung von durch Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteinen im Vergleich zum unmarkierten Wildtypstamm.....	39
2.2.3	Bestimmung von prä-rRNA-abhängig bzw. prä-rRNA-unabhängig kogereinigten Proteinen	41
2.3	<i>In vitro</i> Expression von identifizierten Proteinmodulen in <i>Spodoptera frugiperda</i> Insektenzellen	47
2.3.1	Verwendung des Multibac-Systems zur baculoviralen Expression von Proteinkomplexen	47
2.3.2	Transfektionen und Infektionen von SF21 Zellen	50
2.3.3	Analyse der Noc1-2-3p / Rrp5p Proteinkomplexe.....	51
2.3.4	Analyse des Rio2p-Enp1p-Moduls	56
2.4	Assoziation von gereinigten Proteinmodulen an (Vorläufer-) rRNA <i>in vitro</i>	58

2.4.1	<i>In vitro</i> Transkription von verschiedenen (prä-) rRNA Fragmenten mithilfe der T7–RNA-Polymerase	58
2.4.2	Bindung von <i>in vitro</i> transkribierten (prä-) rRNA Fragmenten an gereinigte Proteinmodule	60
3	Diskussion und Ausblick	61
3.1	Existenz von Proteinmodulen von Ribosomenbiogenesefaktoren in Abwesenheit von rRNA–Synthese	61
3.1.1	Nop7p–Erb1p–Ytm1p-Komplex	62
3.1.2	Rix1p–Ipi1p–Ipi3p-Komplex	63
3.1.3	Noc1p–Noc2p-Komplex	63
3.1.4	Rio2p–Enp1p-Modul	65
3.2	Assoziation von Arx1p und weiteren Ribosomenbiogenesefaktoren an reife 60S Untereinheiten	66
3.3	Ausblick	69
4	Material und Methoden	71
4.1	Material	71
4.1.1	Verbrauchsmaterialien	71
4.1.2	Geräte	71
4.1.3	Kits	72
4.1.4	Chemikalien	72
4.1.5	Enzyme	72
4.1.6	Standards	73
4.1.7	Antikörper	73
4.1.8	Affinitätsmatrizen	73
4.1.9	Synthetische Oligonukleotide	73
4.1.10	Puffer und Medien	77
4.1.11	Software	81
4.2	Allgemeine Methoden	82
4.2.1	Arbeiten mit DNA	82
4.2.1.1	Polymerase–Kettenreaktion	82
4.2.1.2	Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel	83
4.2.1.3	Reinigung von DNA aus einer PCR – Reaktion	83
4.2.1.4	Reinigung von DNA – Fragmenten aus nativen Agarosegelen	83
4.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA–Lösungen	84
4.2.1.6	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	84
4.2.1.7	Phosphatase – Behandlung von DNA – Fragmenten	84
4.2.1.8	Ligation hydrolysierter DNA	85
4.2.1.9	Sequenzierung von DNA	85
4.2.2	Arbeiten mit RNA	85
4.2.2.1	Phenol–Chloroform–Extraktion von Gesamt–RNA	85
4.2.2.2	Ethanol–Natriumacetat–Fällung von Gesamt–RNA	85
4.2.2.3	Koaffinitätsreinigung von rRNA	86
4.2.2.4	Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel	86
4.2.2.5	RNA–Analyse mit der Northernblot–Technik (Kapillarblot)	86
4.2.2.6	Auftrennung von RNA im denaturierenden Polyacrylamidgel	87

4.2.2.7	RNA-Analyse mit der Northernblot-Technik (Nasstransfer).....	87
4.2.2.8	Markierung von Oligonukleotidsonden mit radioaktivem γ - ³² P-ATP	87
4.2.2.9	Auftrennung von RNA im nativen Polyacrylamidgel.....	88
4.2.2.10	<i>In vitro</i> -Transkription von RNA-Fragmenten.....	88
4.2.2.11	<i>In vitro</i> -Transkription von RNA-Fragmenten in Anwesenheit von radioaktivem α - ³² P-GTP	89
4.2.3	Arbeitstechniken mit <i>Escherichia coli</i>	89
4.2.3.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	89
4.2.3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	89
4.2.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation.....	89
4.2.3.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	90
4.2.3.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock	90
4.2.3.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	90
4.2.3.2.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Minimaßstab.....	90
4.2.3.2.2	Aufreinigung von Bacmid-DNA	90
4.2.4	Arbeitstechniken mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
4.2.4.1	Lithiumacetat-Transformation von Hefezellen.....	91
4.2.4.2	Denaturierende Proteinextraktion aus Hefezellen	92
4.2.4.3	Native Proteinextraktion aus Hefezellen.....	92
4.2.4.4	Genomische Epitopmarkierung von Proteinen	92
4.2.4.5	Immunfluoreszenzlokalisierungen	93
4.2.4.5.1	Vorbereiten der Objektträger	93
4.2.4.5.2	Fixierung der Hefezellen.....	93
4.2.4.5.3	Spheroplastieren der Hefezellen.....	93
4.2.4.5.4	Immunlokalisation von Proteinen in fixierten Hefezellen	94
4.2.5	Arbeitstechniken mit SF21 Insektenzellen.....	94
4.2.5.1	Anzucht von SF21 Insektenzellen	94
4.2.5.2	Herstellen von SF21 Dauerkulturen	95
4.2.5.3	Transfektion von SF21 Zellen und Gewinnung von Viruslösung V0	95
4.2.5.4	Low-MOI Infektion von SF21 Insektenzellen mit Viruslösung V0	96
4.2.5.5	Titration der Viruslösung V1	97
4.2.5.6	Infektion von SF21 Insektenzellen mit optimalem V1/Zell-Verhältnis	97
4.2.5.7	Aufschluss von SF21 Insektenzellen.....	97
4.2.6	Proteinbiochemische Methoden	97
4.2.6.1	Konzentrationsbestimmung in Zelllysaten nach Bradford	97
4.2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	98
4.2.6.3	Coomassie-Blau-Färbung.....	98
4.2.6.4	Silberfärbung.....	98
4.2.6.5	Westernblot-Proteintransfer.....	99
4.2.6.6	Ponceaufärbung von membrangebundenen Proteinen	99
4.2.6.7	Detektion von Proteinen im Westernblot	99
4.2.6.8	Polyribosomenpräparation aus Hefe	100
4.2.6.9	Dichtegradientenzentrifugation zur Auftrennung ribosomaler Partikel	100
4.2.6.10	TCA-Fällung von Proteinen	100
4.2.6.11	TAP-Aufreinigung von epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren	101
4.2.6.12	Methanol/Chloroform-Fällung von Proteinen	102

4.2.6.13	Trypsin–Verdau in Lösung	102
4.2.6.14	iTRAQ–Markierung von tryptischen Peptiden.....	102
4.2.6.15	Auftrennung von tryptischen Peptiden mit Nano–HPLC	103
4.2.6.16	MALDI–TOF/TOF–Analyse von aufgetrennten tryptischen Peptiden.....	103
4.2.6.17	Auswertung der MALDI–TOF/TOF–Daten mithilfe von Microsoft Excel ...	103
4.2.6.18	Immunpräzipitation von <i>in vitro</i> –exprimierten Proteinkomplexen mittels Flag–Epitop.....	104
4.2.6.19	Immunpräzipitation von <i>in vitro</i> –exprimierten Proteinkomplexen mittels 6xHis–Epitop.....	104
4.2.6.20	Untersuchung der Salzstabilität von Proteinkomplexen.....	105
4.2.6.21	Gelfiltrationsanalysen von Proteinkomplexen	105
4.2.6.22	<i>In vitro</i> Bindungsexperimente mit gereinigten Noc–Proteinkomplexen und Rrp5p–TAP aus Hefezellen.....	105
4.3	Verwendete Stämme.....	106
4.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> –Stämme.....	106
4.3.2	<i>Escherichia coli</i> –Stämme	106
4.3.3	SF21 Insektenzellen.....	107
4.4	Verwendete Vektoren.....	107
4.4.1	Template zur Epitopmarkierung in <i>S. cerevisiae</i>	107
4.4.2	Templates für <i>In vitro</i> – Transkriptionen	107
4.4.3	Plasmide zur Expression von Proteinkomplexen in SF21 Zellen	108
5	Literaturverzeichnis	111
5.1	Allgemeine Literatur	111
5.2	Publikationen im Rahmen dieser Arbeit.....	128
6	Abkürzungsverzeichnis	129
7	Zusammenfassung.....	133

1 Einleitung

1.1 Zusammensetzung und Funktion von Ribosomen

Bereits 1943 konnten bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von mit Bakteriophagen infizierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen Ribosomen als „granuläres Material“ beschrieben werden (Luria et al., 1943). 1955 schließlich wurden sie als „kleine Komponente des Zytoplasmas“ („A small particulate component of the cytoplasm“, (Palade, 1955)) mit hoher Dichte und einem großen Anteil an Ribonukleinsäuren bezeichnet, während sie erst 1958 den Namen „Ribosomen“ durch Richard B. Roberts erhielten.

Prokaryotische Ribosomen mit einem Sedimentationskoeffizienten von 70S in Dichtegradientenanalysen bestehen aus einer kleinen 30S Untereinheit mit etwa 21 verschiedenen Proteinen und einem 16S rRNA-Molekül (rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure) sowie der großen 50S Untereinheit mit etwa 32 Proteinen und zwei 23S bzw. 5S rRNA-Molekülen (Tissieres und Watson, 1958).

Im Gegensatz dazu sind eukaryotische 80S Ribosomen aus zwei Untereinheiten größerer Komplexität aufgebaut. Dabei handelt es sich einerseits um eine kleine 40S Untereinheit (SSU = small subunit) mit 33 verschiedenen Proteinen (rpS = ribosomal protein of the small subunit) sowie einem 18S rRNA-Molekül und andererseits um eine große 60S Untereinheit (LSU = large subunit) mit 46 Proteinen (rpL = ribosomal protein of the large subunit) sowie drei 5S, 5,8S und 25S rRNA-Molekülen (Planta und Mager, 1998).

Die 20 bis 30 nm großen Ribonukleoproteinpartikel erfüllen in der Zelle die zentrale Aufgabe der Translation der Boten-RNA (mRNA) in Peptide und Proteine (Wilson und Nierhaus, 2003; Ramakrishnan, 2002). Dieser Prozess ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert und wurde unter anderem im genetisch leicht manipulierbaren Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) bereits detailliert untersucht.

Dabei wurde lange Zeit angenommen, dass die in den Ribosomen enthaltene RNA nur als Gerüst für die katalytisch aktiven ribosomalen Proteine dient (Monro, 1967). Bereits in den 80er Jahren wurde jedoch auch eine mögliche katalytische Rolle der rRNA in Betracht gezogen (Garrett und Wooley, 1982). Mit der Aufklärung der ribosomalen Struktur konnte schließlich die Funktion der beiden Untereinheiten genauer bestimmt werden. Die kleine Untereinheit ist neben der Bindung der mRNA für die Codon-Anticodon-Erkennung mit den Peptidyl-Transfer-RNAs (tRNAs) verantwortlich. Die 25S rRNA der großen Untereinheit katalysiert die Ausbildung der Peptidbindung (Noller et al., 1992; Nissen et al., 2000; Cech, 2000; Moore und Steitz, 2002). Das Ribosom kann somit als Ribozym bezeichnet werden.

Die ribosomalen Proteine scheinen dabei hauptsächlich eine Rolle bei der Stabilität, der Strukturgebung und der Erkennung von mRNA und tRNA zu spielen (Brodersen und Nissen, 2005). Auch für den nukleären Export und die Reifung präribosomaler Partikel werden

zahlreiche ribosomale Proteine benötigt (Gadal et al., 2001; Ferreira-Cerca et al., 2005, 2007; Rosado et al., 2007).

1.2 Struktur prokaryotischer und eukaryotischer Ribosomen

Bereits 1976 war die Struktur der prokaryotischen ribosomalen Untereinheiten und der gesamten Ribosomen Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM) (Lake, 1976). Mittels Röntgenkristallanalyse konnte schließlich die Struktur des bakteriellen 70S Ribosoms mit einer Auflösung von bis zu 3 Å (Schuwirth et al., 2005; Selmer et al., 2006) und der archaeellen ribosomalen Untereinheiten mit einer Auflösung von bis zu 2,4 Å (Ban et al., 2000; Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001) aufgeklärt werden.

Für eukaryotische Ribosomen konnten mittels Kryo-EM und Homologie-untersuchungen lediglich Strukturen mit einer Auflösung von bis zu 9 Å (Halic et al., 2006; Chandramouli et al., 2008; Spahn et al., 2001) gewonnen werden. Durch Vergleich der erhaltenen 80S Struktur mit der prokaryotischen Ribosomenstruktur konnte die Lage homologer Proteine und konservierter rRNA-Abschnitte bestimmt werden. Für Eukaryoten spezifische Anteile konnten aufgrund der zu geringen Auflösung jedoch bisher nicht vollständig positioniert werden (Abbildung 1). Die kleine Untereinheit (gelb) kann strukturell in eine Kopf- („head“) und eine „Body“-Domäne eingeteilt werden, die über den „Platform“-Abschnitt verbunden sind. Sie besitzt außerdem zahlreiche zusätzliche Strukturen wie z.B. „Beak“- und „Spur“-Vorwölbungen (Brodersen et al., 2002). Beim Vergleich der vorhergesagten Sekundärstruktur der prokaryotischen 16S rRNA (Glotz und Brimacombe, 1980; Noller und Woese, 1981) mit der beobachteten Ribosomenstruktur kann der „Body“-Domäne die 5' Faltungseinheit der rRNA zugeordnet werden. Die zentrale Faltungseinheit der rRNA findet man hauptsächlich in der „Platform“-Region, während der Großteil der 3' Faltungseinheit die Kopfdomäne der kleinen ribosomalen Untereinheit ausmacht (Brodersen et al., 2002). Die große Untereinheit (blau) dagegen zeigt eine kompaktere Struktur mit Vorwölbungen wie der „Central Protuberance“ und der „L1-Protuberance“. Dabei können die Abschnitte der enthaltenen 23S bzw. 25S rRNA, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur in sechs Domänen aufgeteilt werden kann, jedoch nicht analog zur kleinen Untereinheit zugeordnet werden, da die Domänen der rRNA viele dreidimensionalen Wechselwirkungen untereinander zeigen (Ban et al., 2000).

Das in Abbildung 1 zusätzlich dargestellte „Signal Recognition Particle“ (rot) wird für die Translokation von translatierten Proteinen ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums benötigt (Halic und Beckmann, 2005), besitzt aber keine Relevanz für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

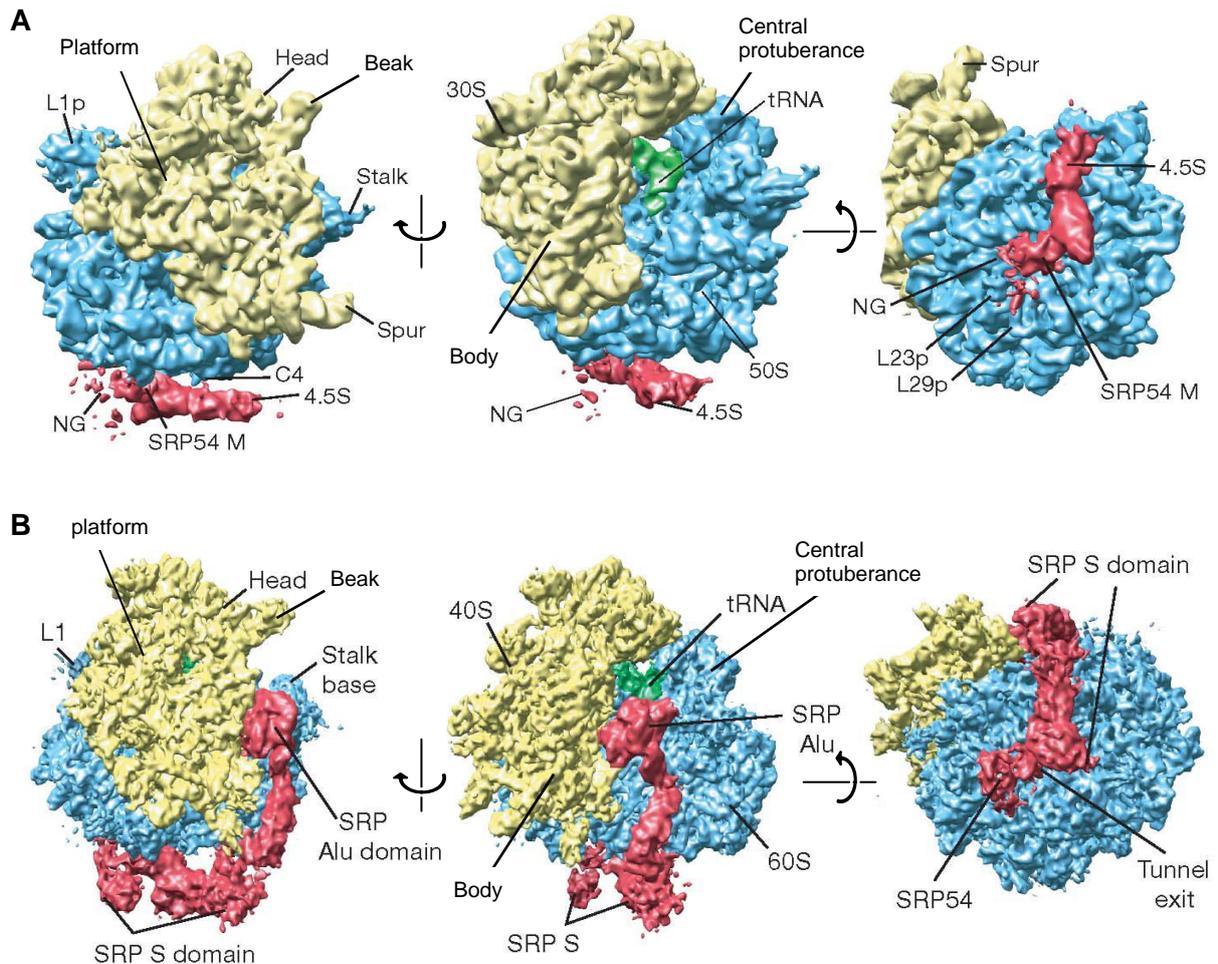


Abbildung 1: Vergleich der durch Kryo-Elektronenmikroskopie erhaltenen prokaryotischen 70S Ribosomenstruktur zur eukaryotischen 80S Ribosomenstruktur in Anwesenheit von gebundenem Signal Recognition Particle (SRP).

Gezeigt sind raumfüllende Modelle von (A) prokaryotischen 70S Ribosomen in einer Auflösung von 9,4 Å und (B) eukaryotischen 80S Ribosomen in einer Auflösung von 8,7 Å. Dargestellt ist die kleine (gelb) und große ribosomale Untereinheit (blau) mit gebundener tRNA, entstehender Peptidkette (grün) und gebundenem Signal Recognition Particle (SRP, rot). Für verschiedene Abschnitte der ribosomalen Untereinheiten und des SRPs sind deren gebräuchlichen Namen angegeben.

(modifiziert nach (Halic et al., 2006))

1.3 Biosynthese eukaryotischer Ribosomen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese eukaryotischer Ribosomen im genetisch leicht manipulierbaren und bereits detailliert untersuchten Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Wachsende Hefezellen investieren bis zu 80% ihrer gesamten Stoffwechsellistung in den komplexen Prozess der Neusynthese von Ribosomen (Moss und Stefanovsky, 2002). Dazu sind neben den drei RNA-Polymerasen zur Synthese der rRNA-Moleküle und der mRNAs der ribosomalen Proteine zahlreiche Ribosomenbiogenesefaktoren und nichtkodierende kleine nukleoläre RNAs (small nucleolar RNAs = snoRNAs) zur Koordination der zahlreichen Reifungsschritte nötig.

Durch Transkription der polycistronischen rDNA (ribosomale Desoxyribonucleinsäure) durch die RNA-Polymerase I (Pol I) im Nukleolus entsteht eine Vorläufer-rRNA (prä-rRNA), die die 18S, 5,8S und 25S rRNAs enthält und durch ribosomale Proteine gebunden wird. Die RNA-Polymerase III (Pol III) transkribiert den Vorläufer der 5S rRNA (Wolffe, 1991) (siehe 1.3.2).

Im Laufe der Ribosomenreifung werden diese prä-rRNAs vielfältig chemisch modifiziert (1.3.3.1), durch zahlreiche Endo- und Exonukleasen prozessiert (1.3.3.2) und schließlich in die endgültigen, katalytisch aktiven Konformationen in den Untereinheiten des reifen Ribosoms gefaltet. Während der Reifungsprozesse finden durch transiente Interaktionen von über 150 Biogenesefaktoren viele Änderungen in der Proteinzusammensetzung präribosomaler Partikel statt (Schäfer et al., 2003; Saveanu et al., 2003; Pérez-Fernández et al., 2007; Nissan et al., 2002; Milkereit, Kühn, et al., 2003; Bernstein et al., 2004; Harnpicharnchai et al., 2001). Nach dem Export der Präribosomen ins Zytoplasma und abschließenden Reifungsschritten entstehen schließlich die beiden translationskompetenten Untereinheiten reifer Ribosomen.

Die folgenden Kapitel befassen sich genauer mit den verschiedenen Abschnitten der Ribosomensynthese, insbesondere im in dieser Arbeit untersuchten Modellorganismus *S. cerevisiae*.

1.3.1 Der Nukleolus als Ort der rDNA-Transkription und früher Ribosomenreifung

Die Synthese der rRNA und die Reifung der Ribosomen findet überwiegend in einer definierten Substruktur des Zellkerns, dem Nukleolus statt (Ritossa und Spiegelman, 1965; Penman et al., 1966). Dieser nicht durch eine Membran abgetrennte Teil des Nukleus erscheint in Hefezellen als sichelförmige elektronendichte Struktur und macht ca. 30 – 50% des Zellkerns aus (Warner, 1990). Der Nukleolus kann anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen in drei Bereiche eingeteilt werden (Abbildung 2): das fibrilläre Zentrum (fibrillar centre = FC) mit transkriptionsinaktiver rDNA, die dichte fibrilläre Komponente (dense fibrillar component = DFC) als Bereich der rDNA–Transkription und früher prä–rRNA–Reifung und die granuläre Komponente (granular component = GC) als Ort der Assemblierung der präribosomalen Partikel (Léger-Silvestre et al., 1999; Raska et al., 2006). In der dichten fibrillären Komponente findet man nicht nur aktiv transkribierende Pol I (Léger-Silvestre et al., 1999), sondern auch Proteine und snoRNAs, die an frühen Schritten der Ribosomenreifung beteiligt sind (Beven et al., 1996). In der granulären Komponente findet man weitere Prozessierungsfaktoren und ribosomale Proteine, die hier an präribosomale Partikel assemblieren (Raska et al., 2006). Im Laufe der Ribosomenreifung werden

schließlich die entstandenen Präribosomen über das Nukleoplasma ins Zytoplasma transportiert.

Der Nukleolus scheint jedoch nicht nur bei der rRNA-Synthese und der Ribosomenreifung eine Rolle zu spielen. Auch Prozesse wie mRNA-Export, tRNA-Prozessierung, Biosynthese des SRP und der RNA-Komponente der Telomerase sowie die Prozessierung der spliceosomalen U6-RNA laufen möglicherweise zum Teil im Nukleolus ab (Pederson, 1998; Pederson und Tsai, 2009)

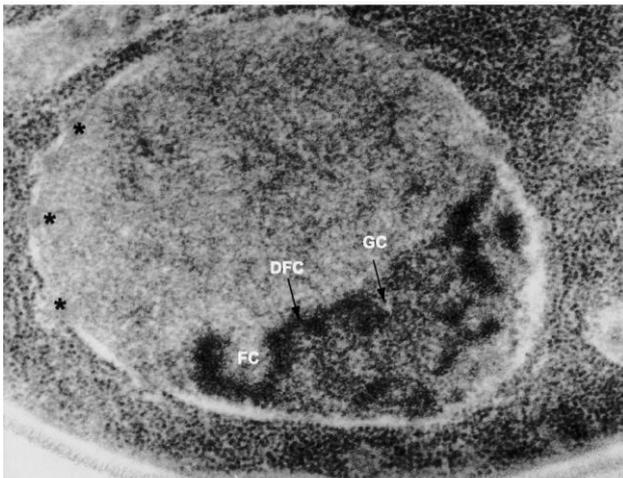


Abbildung 2: Morphologie des Zellkerns von *Saccharomyces cerevisiae*

Gezeigt ist der Nukleus einer Hefezelle umgeben von der Kernmembran mit Kernporen (★). Die drei Kompartimente des Nukleolus sind entsprechend beschriftet: Fibrilläre Zentren (FC) in der Nähe der Kernmembran, umgeben von der dichten fibrillären Komponente (DFC) und die granuläre Komponente (GC), die den Rest des Nukleolus ausmacht.
aus (Léger-Silvestre et al., 1999)

1.3.2 Transkription der rDNA durch die RNA-Polymerasen I und III

In humanen Zellen liegen die etwa 400 Wiederholungen der rDNA-Gene in mehreren „Clustern“ auf fünf verschiedenen Chromosomenpaaren vor. Diese rDNA-Cluster werden als Nukleolus-Organisations-Regionen (NORs) bezeichnet, da sie nach der Zellteilung den Ort der Ausbildung nukleolärer Strukturen bestimmen (Raska et al., 2004).

Im Gegensatz dazu existieren im Modellorganismus *S. cerevisiae* die Gene für die rRNA-Moleküle als ein einzelner dynamischer Gencluster mit 100 bis 200 aufeinanderfolgenden Kopien auf dem Chromosom XII im Nukleolus (Johnston et al., 1997; Long und Dawid, 1980). Diese 9,1 kB großen Wiederholungen (Abbildung 3) werden von den beiden RNA-Polymerasen I und III transkribiert.

Die Pol III synthetisiert den Vorläufer der 5S rRNA der großen 60S Untereinheit (Geiduschek und Kassavetis, 2001; Huet et al., 1996). Die 5S rDNA-Sequenz befindet sich im von der Pol I nicht transkribierten Bereich (NTS 1 und 2) des rDNA-Lokus.

Die restlichen drei rRNA-Moleküle werden von der Pol I als ein gemeinsames Vorläufertranskript abgelesen, das als 35S prä-rRNA-Molekül detektiert werden kann (Moss, 2004). Die Sequenzen der reifen rRNA-Moleküle sind dabei durch zwei intern transkribierte Sequenzen (ITS1 und 2) getrennt und von zwei extern transkribierten Sequenzen (5' ETS und 3' ETS) begrenzt (Kressler et al., 1999).

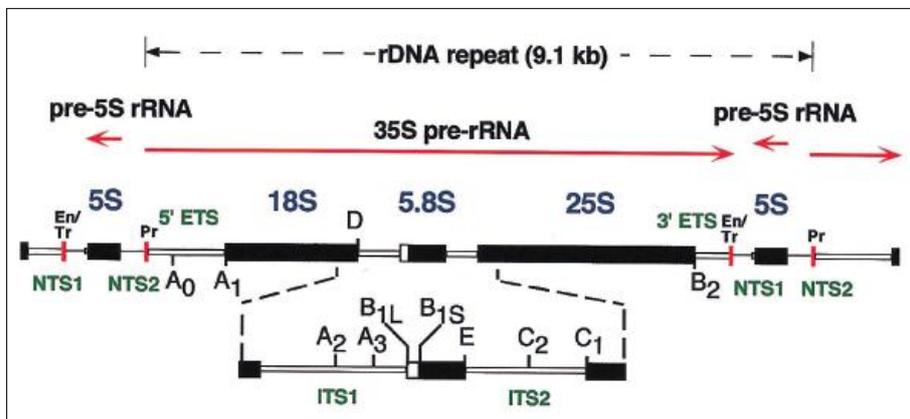


Abbildung 3: Struktur einer rDNA-Wiederholung in *Saccharomyces cerevisiae*

Jede Wiederholung enthält die Gene für die von der RNA-Polymerase I transkribierte 35S prä-rRNA, die die 18S, 5.8S und 25S rRNAs enthält (Pr Promotor, Tr Terminator; En Enhancer-Element), und die von der RNA-Polymerase III transkribierte 5S prä-rRNA. Dabei sind die Sequenzen der reifen rRNAs (schwarze Kästchen) durch intern transkribierte Spacer (ITS1 und 2) getrennt und von 5' und 3' extern transkribierten Spacern (ETS) begrenzt. Das 5S Gen befindet sich zwischen zwei nicht transkribierten Bereichen (NTS1 und 2). Gezeigt sind weiterhin einige Prozessierungsstellen der Vorläufer-rRNAs (A₀, A₁, A₂, A₃, usw.).

aus (Kressler et al., 1999).

In exponentiell wachsenden Hefezellen werden nur etwa 50% der rDNA Wiederholungen aktiv transkribiert. Diese Wiederholungen weisen im Vergleich zu inaktiven rDNA-Abschnitten eine weniger dichte Verpackung der DNA in Chromatin auf (Dammann et al., 1993).

Die Transkription des rDNA-Lokus durch die Pol I beginnt mit der Transkriptionsinitiation am Promotor des Gens. Dabei muss die Transkriptionsmaschinerie durch basale Transkriptionsfaktoren an den Promotor rekrutiert werden, der zwei wesentliche Sequenzelemente, das „Upstream Element“ (UE) und das „Core Element“ (CE), enthält (Moss, 2004). In der Hefe *S. cerevisiae* bindet zur Initiation der Transkription zunächst der nicht essentielle heteromultimere Komplex „Upstream Activating Factor“ (UAF) an das UE

(Abbildung 4). Das TATA-Bindeprotein (TBP), das auch bei der Initiation der Transkription durch Pol II und Pol III eine Rolle spielt, bindet spezifisch an den UAF (Steffan et al., 1998) und sorgt für die Rekrutierung des „Core Factors“ (CF) (Lin et al., 1996; Steffan et al., 1996) an das CE (Keys et al., 1994; Lalo et al., 1996; Lin et al., 1996).

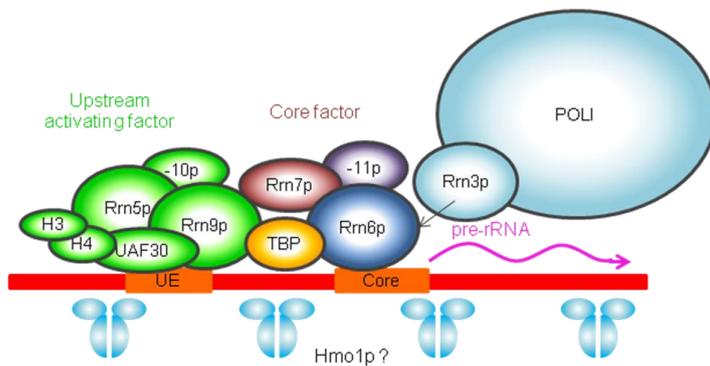


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Transkriptionsinitiationskomplexes der RNA-Polymerase I in *S. cerevisiae*

Gezeigt ist ein Modell des Präinitiationskomplexes der Pol I in *S. cerevisiae* mit den Transkriptionsfaktoren und jeweiligen Promotorbindestellen (nach (Moss, 2004)).

Nach Bindung dieser basalen Transkriptionsfaktoren an deren Promotorelemente kann die Pol I im Komplex mit deren essentiellen Transkriptionsfaktor Rrn3p zur Transkriptionsstartstelle rekrutiert werden (Yamamoto et al., 1996; Milkereit und Tschochner, 1998). Dabei interagiert Rrn3p mit dem Protein RPA43, einer der 14 Untereinheiten der Pol I, und der Rrn6p Untereinheit des CF (Peyroche et al., 2000). Bei der Interaktion der Pol I mit Rrn3p scheint unter anderem der Phosphorylierungszustand der beiden Proteine eine wichtige Rolle zu spielen (Fath et al., 2001; Gerber et al., 2008; Cavanaugh et al., 2002). Nach Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Rrn3p sinkt die Assoziationsrate der Pol I mit dem rDNA-Promoter und dadurch auch die Syntheserate der 35S prä-rRNA deutlich ab (Claypool et al., 2004). Neben diesen basalen Transkriptionsfaktoren scheinen auch Proteine wie das HMG (high mobility group)-Box Protein Hmo1p einen aktivierenden Einfluss auf die rRNA-Synthese zu haben (Gadal et al., 2002).

Nach dem Start der Transkription dissoziiert der Transkriptionsfaktor Rrn3p von der elongierenden Pol I ab (Bier et al., 2004; Milkereit et al., 1998). Nach vollständiger Elongation und Synthese des polycistronischen rRNA-Vorläufers wird die Transkription an zwei möglichen Terminationsstellen gestoppt, wobei verschiedene Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen (Reeder et al., 1999; El Hage et al., 2008).

1.3.3 Funktionen von Ribosomenbiogenesefaktoren

Ein Einblick in die Komplexität präribosomaler Partikel und die Vielzahl der an der Synthese eukaryotischer Ribosomen beteiligten Proteine konnte durch die Affinitätsreinigung präribosomaler Partikel aus Gesamtzellextrakten von Hefezellen und deren massenspektrometrische Analyse gewonnen werden (Schäfer et al., 2003; Saveanu et al., 2003; Pérez-Fernández et al., 2007; Nissan et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Dragon et al., 2002; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006; Grandi et al., 2002).

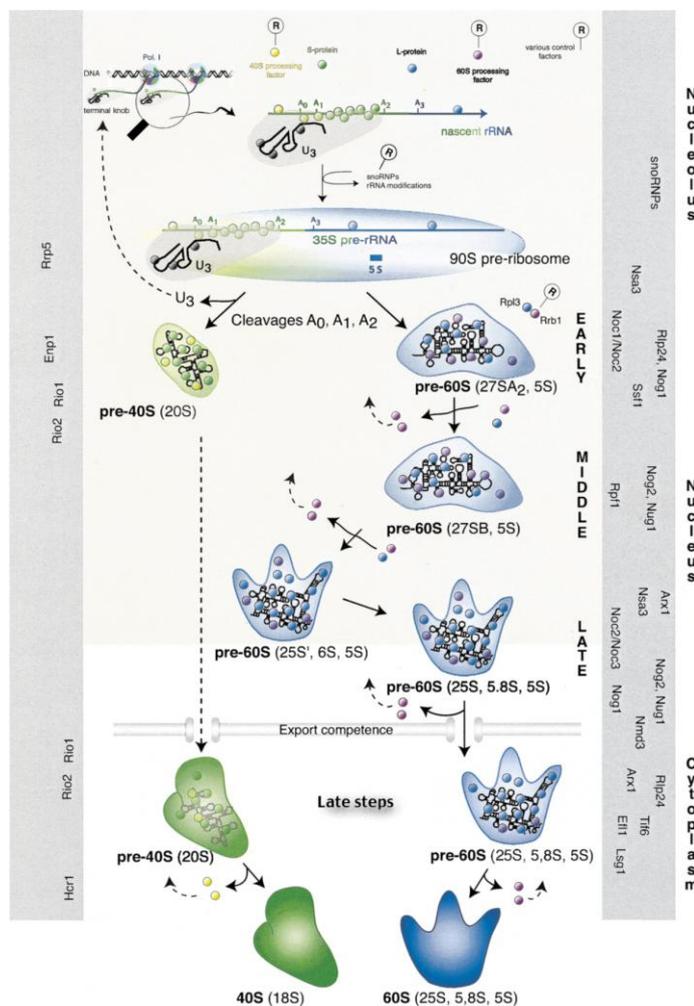


Abbildung 5: Vereinfachtes Modell der Synthese beider ribosomaler Untereinheiten

Bereits kotranskriptional lagern sich viele Faktoren und Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit an die neusynthetisierte RNA-Kette an. Nach der U3 sno-RNP anhängigen Prozessierung der 35S prä-rRNA (vgl. 1.3.3.2) spaltet sich das frühe 90S Präribosom in die beiden Vorläuferpartikel der 40S und 60S Untereinheiten. Der Vorläufer der 40S Untereinheit wird nach Export ins Zytoplasma letzten Reifungsschritten unterworfen. Im Gegensatz zur SSU lagern sich der Großteil der Faktoren und Proteine der LSU erst nach der beschriebenen Spaltung an den Vorläufer der 60S Untereinheit an. Eine Vielzahl an Prozessierungsschritten und Änderungen in der Proteinzusammensetzung am entstandenen prä-60S Partikel findet noch im Zellkern und nach Export ins Zytoplasma statt. An den jeweiligen Synthesewegen beteiligte Biogenesefaktoren sind exemplarisch rechts und links entsprechend den Zeitpunkten ihres Auftretens in präribosomalen Partikeln aufgelistet. Aus (Fromont-Racine et al., 2003)

Nach Reinigungen über das TAP-Epitop (TAP = tandem affinity purification) (Puig et al., 2001; Rigaut et al., 1999) konnten insgesamt mehr als 150 Ribosomenbiogenesefaktoren identifiziert werden. Dabei handelt es sich u.a. um ATP-abhängige RNA-Helikasen, ATPasen, GTPasen und Kinasen, die einen Einfluß auf die Modifikation (1.3.3.1), Prozessierung (1.3.3.2), Assemblierung (1.3.3.3) und den Transport präribosomaler Partikel (1.3.3.4) zu haben scheinen. Diese Proteine konnten anhand ihrer intrazellulären Lokalisation, ihrer kogereinigten Proteine und rRNA-Spezies sowie der Beeinflussung definierter Prozessierungs- oder Transportschritte nach ihrer Depletion in den zeitlichen Ablauf der Ribosomenreifung eingeordnet werden (Abbildung 5) (Hage und Tollervey, 2004; Fromont-Racine et al., 2003). Für den Großteil dieser Faktoren ist jedoch die eigentliche Funktion noch unklar.

Grundsätzlich stellt sich dabei die Frage, in welcher Form diese Vielzahl an Proteinen an präribosomale Partikel binden und von ihnen abdissoziieren. Bereits mehrfach wurde eine modulare Organisation der Biogenesefaktoren und ihre Assoziation an Präribosomen als vorgeformte Proteinkomplexe vorgeschlagen (Pérez-Fernández et al., 2007; Miles et al., 2005; Lebreton et al., 2008; Krogan et al., 2004; Milkereit et al., 2001; Schäfer et al., 2006). Die Existenz derartiger Subkomplexe *in vivo* unabhängig von der Existenz und Neusynthese präribosomaler Partikel konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

1.3.3.1 Modifikationen der (prä-) rRNA

Bereits während der Transkription durch die Pol I werden die neusynthetisierten prä-rRNAs drei verschiedenen kovalenten Modifikationen unterzogen. Dabei handelt es sich in der Bäckerhefe um etwa 10 Basenmethylierungen, die Methylierung von etwa 50 2'-Hydroxylgruppen der Ribose (2'-O-Methylierung) und die Isomerisierung von etwa 50 Uridin-Resten zu Pseudouridin Ψ (Lafontaine und Tollervey, 1998).

Die Methylierungen der Basenreste werden durch verschiedene Methyltransferasen katalysiert, über die bisher nur wenig bekannt ist. Im Gegensatz zu dem Großteil der rRNA-Modifikationen werden die Methylierungen von zwei spezifischen Adenosinresten am 3' Ende der 18S rRNA-Sequenz durch das konservierte essentielle Protein Dim1p erst im Zytoplasma durchgeführt (Lafontaine et al., 1994). Diese Modifikationen scheinen für das Wachstum der Hefezellen nicht essentiell zu sein. Sie spielen jedoch vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Translationsaktivität (Lafontaine et al., 1998).

Bei der Ribose-Methylierung und der Bildung von Pseudouridin sind zwei Klassen von snoRNAs, die mit dem jeweiligen Zielabschnitt der prä-rRNA kurze Heteroduplex-Strukturen ausbilden können, nötig (Tollervey and Kiss, 1997; Reichow et al., 2007). Die C/D Box snoRNPs (kleine, nukleoläre Ribonukleoproteinpartikel) bestehen aus einer snoRNA mit einer Haarnadelstruktur und konservierten sogenannten C und D Box Motiven

und den Kernproteinen Nop1p, Nop56p, Nop58p und Snu13p. Die Methyltransferase Nop1p katalysiert die 2'-O-Methylierung der Ribose der rRNA nach Erkennung der Zielsequenz durch die snoRNA (Kiss-László et al., 1996, 1998). Die H/ACA Box snoRNPs, die die Isomerisierung definierter Uridin-Reste zu Pseudouridin katalysieren (Ni et al., 1997), enthalten eine snoRNA mit zwei Haarnadelstrukturen und den konservierten H und ACA Box Motiven. Zusätzlich zur Ψ -Synthase Cbf5p binden die H/ACA snoRNAs auch die essentiellen Kernproteine Gar1p, Nhp2p und Nop10p (Reichow et al., 2007).

Sowohl archaeele C/D Box snoRNPs als auch H/ACA Box snoRNPs konnten bereits erfolgreich *in vitro* rekonstituiert (Omer et al., 2002; Baker et al., 2005; Charpentier et al., 2005) und strukturell untersucht werden (Li and Ye, 2006; Duan et al., 2009; Bleichert et al., 2009). Diese Analysen ermöglichen einen genaueren Einblick in die Funktion der snoRNPs und deren Interaktion mit präribosomalen Partikeln.

Die Funktion dieser beiden Arten an kovalenten Modifikationen ist bisher noch unklar. Hefezellen zeigen in Abwesenheit der modifizierenden Enzyme Nop1p und Cbf5p reduziertes Wachstum (Tollervey et al., 1993; Zebarjadian et al., 1999), wobei einzelne Modifizierungsstellen in funktionell wichtigen Bereichen der Ribosomen nicht essentiell zu sein scheinen (Decatur und Fournier, 2002; Ofengand, 2002). Die Gesamtheit der Modifikationen scheint jedoch einen Einfluss auf Konformation, Stabilität und Aktivität der Ribosomen zu haben (Decatur und Fournier, 2003; King et al., 2003; Liang et al., 2009).

Neben der beschriebenen Funktion bei der Modifikation definierter rRNA Abschnitte scheinen C/D Box und H/ACA Box snoRNPs auch bei anderen Prozessen wie der Synthese von Telomer-DNA und der im Folgenden beschriebenen rRNA-Prozessierung eine Rolle zu spielen (Kiss, 2002; Morrissey und Tollervey, 1993; Beltrame und Tollervey, 1995).

1.3.3.2 Prozessierung der (prä-) rRNA

Bei der Transkription des rDNA-Lokus durch die Pol I entsteht ein polycistronisches Vorläufertranskript, das in zahlreichen endo- und exonukleolytischen Reifungsschritten in den 5' und 3' ETS Regionen sowie in den beiden ITS1 und ITS2 Regionen zu den reifen rRNA-Molekülen prozessiert wird.

Die dafür verantwortlichen Enzyme konnten in vielen Fällen noch nicht genauer charakterisiert werden. Nach Depletion einzelner Biogenesefaktoren konnte die Akkumulation verschiedener prä-rRNA Spezies beobachtet werden, was auf definierte Defekte im Prozessierungsablauf der rRNAs hinweist. Dies deutet auf eine Funktion des jeweiligen Proteins bei dem entsprechenden Schnittereignis hin, bedeutet aber nicht immer, dass dieser Faktor direkt als katalytisch aktive Endo- oder Exonuklease fungiert. Auch eine

indirekte Rolle, etwa bei der erforderlichen Faltung der rRNA oder bei der Rekrutierung des ausführenden Enzyms, wäre denkbar.

Das kurzlebige und nicht detektierbare Primärtranskript der RNA-Polymerase I wird durch die Endonuklease Rnt1p an der Stelle B₀ in der 3' ETS (Abbildung 7) zur größten nachweisbaren 35S prä-rRNA prozessiert (Kufel et al., 1999).

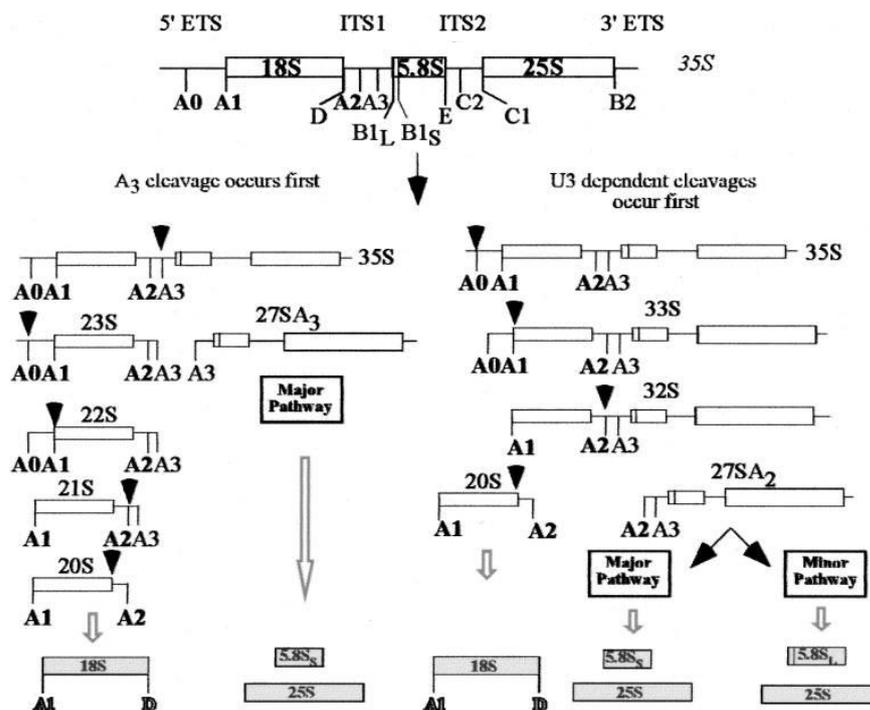


Abbildung 6: Die Prozessierung der prä-rRNA in *S. cerevisiae* mit Fokus auf die Synthese der rRNA der SSU.

Das 35S Vorläufertranskript wird im Hauptprozessierungsweg (rechts) U3-sno-RNP abhängig an den Prozessierungsstellen A₀, A₁, und A₂ geschnitten, wobei über kurzlebige 33S/32S prä-rRNA Zwischenstufen die 20S und die 27SA₂ prä-rRNAs entstehen. Ein geringer Anteil der 35S rRNA wird erst an der Prozessierungsstelle A₃ geschnitten (links), wodurch die 23S und die 27SA₃ prä-rRNAs entstehen. Die Prozessierung der 23S prä-rRNA an den Prozessierungsstellen A₀, A₁, und A₂ führt auch hier zur Entstehung der 20S Vorläufer-rRNA. Nach Export der 20S rRNA ins Zytoplasma findet der letzte Reifungsschritt an der Schnittstelle D statt, wodurch die reife 18S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit entsteht. Die 27SA₃ oder 27SA₂ prä-rRNAs der LSU werden ebenfalls zu den reifen 5,8S und 25S rRNAs prozessiert (vgl. Abbildung 7).

Modifiziert nach (Gallagher et al., 2004).

Lange wurde angenommen, dass die darauf folgenden Schnittereignisse zur Trennung der Vorläuferpartikel beider Untereinheiten erst nach vollständiger Transkription und Modifikation der rRNA ablaufen können (Venema and Tollervey, 1999). Kürzlich wurde aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen und der Durchführung von Chromatinimmunpräzipitationen vorgeschlagen, dass ein Großteil dieser frühen

Prozessierungsschritte kotranskriptional stattfindet (Osheim et al., 2004; Gallagher et al., 2004). Dabei handelt es sich um die Prozessierung an den Stellen A_0 , A_1 und A_2 durch bisher nicht charakterisierte Enzyme. Jedoch spielen bei diesen Prozessen viele Proteine (Kressler et al., 1999) und auch die U3 snoRNA eine essentielle Rolle (Dragon et al., 2002; Hughes and Ares, 1991). Diese C/D Box snoRNA liegt in Hefezellen in einem großen Ribonukleoproteinkomplex mit etwa 40 Proteinen vor, der als SSU-Prozessom (small subunit processome) bezeichnet wird (Dragon et al., 2002; Bernstein et al., 2004). Dieser snoRNP Komplex bindet durch Heteroduplex-Bildung zwischen der U3 snoRNA und der 5' ETS der 35S prä-rRNA kotranskriptional an die neu synthetisierte RNA und bildet die in EM Untersuchungen auftretenden „terminal balls“ am Ende der naszierenden RNA-Kette (Dragon et al., 2002; Mougey et al., 1993; Wery et al., 2009).

Dieser auch als 90S Präribosom bezeichnete frühe RNP Komplex wird durch die drei aufeinanderfolgenden und stark voneinander abhängigen Prozessierungsschritte A_0 , A_1 und A_2 in die Vorläuferpartikel der beiden Untereinheiten getrennt (Abbildung 6).

Der Prozessierungsschritt A_0 erfolgt in der 5' ETS Region, A_1 am 5' Ende der reifen 18S rRNA und A_2 in der ITS1 Region in einer Entfernung von 214 Nukleotiden zum 3' Ende der 18S rRNA Sequenz (van Nues et al., 1994). Die dadurch entstandenen prä-rRNAs der kleinen Untereinheit (20S) und der großen Untereinheit ($27SA_2$) werden auf getrennten Wegen weiter prozessiert.

Die entstandene 20S prä-rRNA wird nach Export ins Zytoplasma (Udem und Warner, 1973) endonukleolytisch an der Stelle D am 3' Ende der 18S Sequenz geschnitten, wobei die reife 18S rRNA der SSU entsteht (Stevens et al., 1991). Neben Nob1p, einer mutmaßlichen Endonuklease, die mehrfach als ausführendes Enzym vorgeschlagen wurde, spielen zahlreiche späte Biogenesefaktoren, wie z.B. Rio2p, Tsr1p und Ltv1p, eine Rolle bei diesem Prozessierungsschritt (Fatica et al., 2003; Vanrobays et al., 2003, 2004; Seiser et al., 2006; Geerlings et al., 2003; Gelperin et al., 2001; Pertschy et al., 2009).

Alternativ zur primären Prozessierung an den Schnittstellen A_0 , A_1 und A_2 scheint ein Teil der 35S prä-rRNA zunächst an der Stelle A_3 geschnitten zu werden (Abbildung 6), was zur Entstehung einer 23S prä-rRNA im Vorläuferpartikel der SSU und einer $27SA_3$ prä-rRNA im Vorläuferpartikel der LSU führt (Venema et al., 1999; Wehner et al., 2002). Nach Prozessierung der 23S prä-rRNA an den Schnittstellen A_0 , A_1 und A_2 entsteht auch hier die 20S rRNA, die analog zum Hauptweg exportiert und zur reifen 18S rRNA prozessiert wird.

Der deutlich komplexere Prozessierungsablauf der rRNAs der LSU ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Viele der an den jeweiligen Schnittereignissen beteiligten Endo- und Exonukleasen konnten dabei bereits genauer charakterisiert werden.

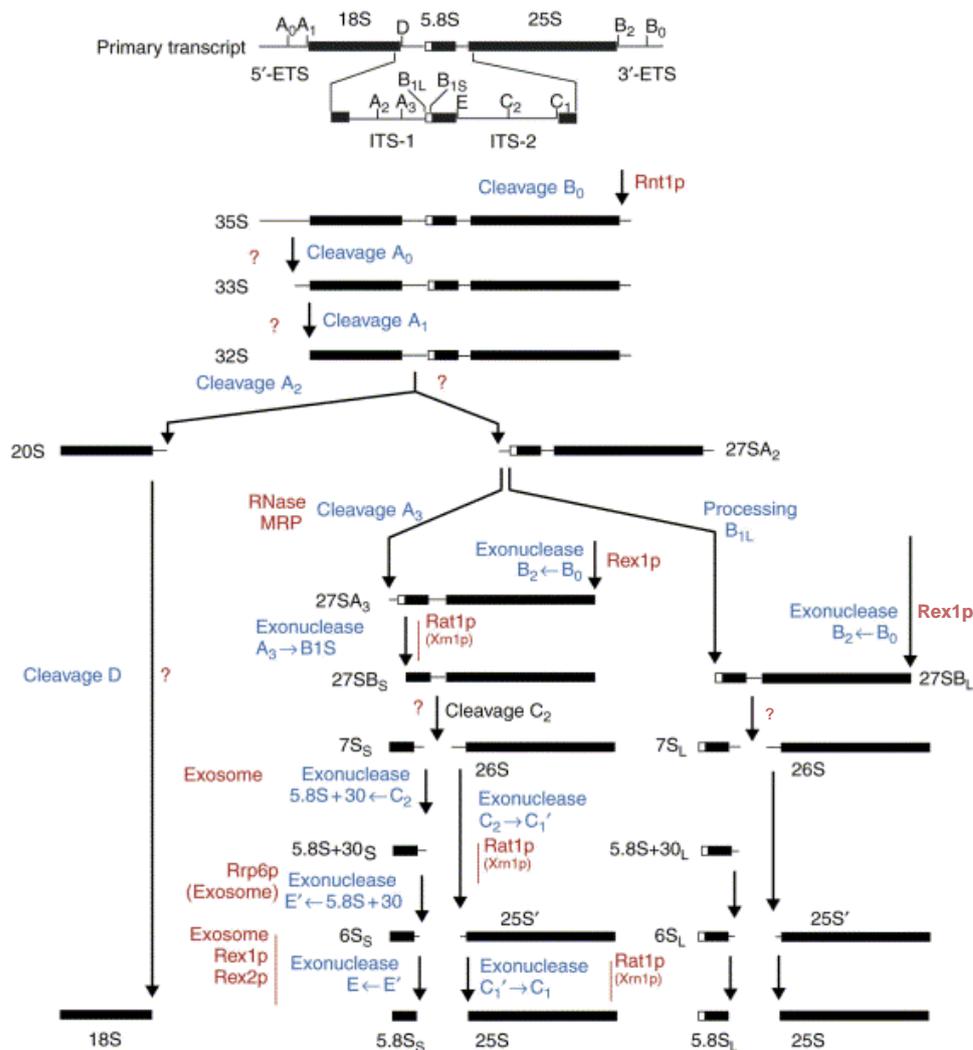


Abbildung 7: Die Prozessierung der prä-rRNA in *S. cerevisiae* mit Fokus auf die Synthese der rRNAs der LSU.

Durch Prozessierung des Transkripts der Pol I an der Schnittstelle B_0 durch die Endonuklease Rnt1p entsteht die 35S prä-rRNA, die U3-sno-RNP abhängig an den Prozessierungsstellen A_0 , A_1 , und A_2 geschnitten wird. Dadurch entstehen die 20S und die 27SA₂ prä-rRNA der prä-40S und prä-60S Untereinheiten. Nach Export der 20S rRNA ins Zytoplasma und Prozessierung an der Stelle D liegt die reife 18S rRNA in der kleinen ribosomalen Untereinheit vor.

Die 27SA₂ prä-rRNA wird über zwei alternative Wege zu jeweils zwei verschiedenen Formen der 27SB prä-rRNA, 7S prä-rRNA und der reifen 5,8S rRNA prozessiert. Im Hauptweg (mitte) entstehen kurze Formen der rRNAs, die am 5' Ende sieben Nukleotide kürzer sind als die entsprechenden langen Formen des Nebenwegs (rechts). Im Hauptweg wird die 27SA₂ prä-rRNA durch den RNP-Komplex RNase MRP an der Stelle A_3 geschnitten, woraufhin der Rat1p/Xrn1p Exonuklease-Komplex die prä-rRNA bis zur Schnittstelle B_{1S} abbaut. Alternativ kann 27SA₂ an der Schnittstelle B_{1L} durch ein unbekanntes Enzym prozessiert werden. In beiden Wegen wird die 27SA₂ prä-rRNA am 3' Ende bis zur Prozessierungsstelle B_2 durch die Exonuklease Rex1p abgebaut. Die beiden 27SB_S und 27SB_L Spezies werden durch eine unbekannte Endonuklease an der Stelle C_2 geschnitten, wodurch die beiden getrennten Vorläufer der 5,8S und der 25S rRNA entstehen. Die 7S prä-rRNA wird in verschiedenen Schritten durch Enzyme des Exosoms zur reifen 5,8S rRNA prozessiert, während der Vorläufer der 25S rRNA am 5' Ende durch die Exonukleasen Rat1p und Xrn1p bis zur Stelle C_1 abgebaut werden muss.

Modifiziert nach (Fatica and Tollervy, 2002).

Wie bereits erwähnt entstehen durch Prozessierung der 35S rRNA an den Stellen $A_{0/1/2}$ oder an der Stelle A_3 die $27SA_2$ oder $27SA_3$ Vorläufer-rRNAs der LSU (Abbildung 7). Der Großteil (85%) der $27SA_2$ prä-rRNA wird an der Prozessierungsstelle A_3 durch den RNP-Komplex MRP (mitochondrial rNA processing) geschnitten (Chu et al., 1994). Die entstandene $27SA_3$ rRNA wird exonukleolytisch am 5' Ende durch die Exonukleasen Rat1p und Xrn1p bis zur Stelle B_{1S} (Henry et al., 1994) und am 3' Ende durch die Exonuklease Rex1p bis zur Stelle B_2 (Kempers-Veenstra et al., 1986) verdaut. Dabei entsteht die $27SB_S$ prä-rRNA. Im alternativen Prozessierungsweg (15%) wird die $27SA_2$ prä-rRNA durch eine unbekannte Endonuklease an der Stelle B_{1L} geschnitten (Venema et al., 1999) und am 3' Ende ebenfalls exonukleolytisch durch Rex1p verdaut, wodurch die $27SB_L$ prä-rRNA entsteht. Dabei handelt es sich um eine am 5' Ende um sieben Nukleotide längere Form der $27SB_S$ prä-rRNA.

Die beiden $27SB_L$ und $27SB_S$ prä-rRNA-Spezies werden auf dem gleichen Weg weiter prozessiert. Dabei werden die beiden Vorläufer $7S_L$ und $7S_S$ der 5,8S rRNA und der Vorläufer der 25S rRNA durch Prozessierung an der Stelle C_2 in der ITS2 hervorgebracht (Venema et al., 1999). Die dafür verantwortliche Endonuklease ist bisher nicht bekannt. Der Vorläufer der 25S rRNA wird durch exonukleolytischen Verdau am 5' Ende durch die Exonukleasen Rat1p und Xrn1p zur reifen rRNA (Geerlings et al., 2000).

Die Reifung der $7S_{LS}$ prä-rRNA an deren 3' Ende erfolgt durch mehrere aufeinanderfolgende exonukleolytische Prozessierungsschritte, wobei erst die Zwischenstufen $5,8S+30_{LS}$ und $6S_{LS}$ und schließlich die reife $5,8S_{LS}$ rRNA entsteht. Daran sind neben dem Exosom, einem Komplex aus mehreren Exoribonukleasen, die Enzyme Rex1p, Rex2p und Ngl2p beteiligt (Mitchell et al., 1996, 1997, 2003; Briggs et al., 1998; van Hoof et al., 2000; Faber et al., 2002).

Auch die durch die RNA-Polymerase III transkribierte 5S prä-rRNA muss am 3' Ende exonukleolytisch um 7 – 13 Nukleotide zur reifen 5S rRNA verkürzt werden (van Hoof et al., 2000).

1.3.3.3 Assemblierung der ribosomalen Proteine

Wie bereits erwähnt scheinen ribosomale Proteine bei der Translation hauptsächlich eine Rolle bei der Strukturgebung und der Erkennung von mRNA und tRNA zu spielen (Brodersen et al., 2005). Sie sind ebenfalls in die kotranslationale Rekrutierung von Proteinen, wie z.B. Faltungshelfern oder Faktoren der intrazellulären Proteinsortierung, an die neusynthetisierte Polypeptidkette involviert (Beckmann et al., 2001; Kramer et al., 2002). Um eine korrekte Funktion des Ribosoms und der darin enthaltenen rRNAs und ribosomalen Proteine sicherzustellen, müssen im Laufe der Ribosomenbiogenese die ribosomalen Proteine definiert in präribosomale Partikel assembliert werden.

Diese zeitlich klar strukturierten Vorgänge wurden im prokaryotischen Modellorganismus *E. coli* bereits detailliert untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass beide ribosomalen Untereinheiten *in vitro* aus ihren isolierten Bausteinen assembliert werden können (Traub und Nomura, 1968; Nomura und Erdmann, 1970). Auch archaeele Untereinheiten konnten erfolgreich rekonstituiert werden (Londei et al., 1986; Sanchez et al., 1990; Sánchez et al., 1996). Bei der *in vitro* Assemblierung der prokaryotischen Untereinheiten muss die Zugabe der ribosomalen Proteine zu den isolierten rRNA-Spezies in einer hierarchischen Reihenfolge erfolgen, um eine Bindung der Proteine an die rRNA sicherzustellen (Held et al., 1974; Herold und Nierhaus, 1987; Mizushima und Nomura, 1970; Röhl und Nierhaus, 1982). Die ribosomalen Proteine konnten demnach in drei Kategorien eingeteilt werden. Die „primary binder“ Proteine können unabhängig von der Assemblierung anderer Proteine den direkten Kontakt zur rRNA herstellen. Daraufhin erfolgt die Bindung der „secondary binder“ und „tertiary binder“ Proteine, die nur abhängig von der Assemblierung bereits gebundener Proteine erfolgen kann (Nierhaus, 1991). Diese *in vitro* Assemblierung zeigt starke Temperaturabhängigkeit, da erst nach Energiezufuhr durch Erhitzen eine vollständige Rekonstitution erreicht werden konnte (Culver und Noller, 2000). *In vivo* scheint diese Funktion durch das Chaperon DnaK erfüllt zu werden (Maki et al., 2002).

Analoge *in vitro* Rekonstitutionsexperimente wurden auch bei eukaryotischen Ribosomen durchgeführt (Reboud et al., 1972; Vioque und Palacián, 1985). Dabei konnte keine vollständige Assemblierung der Untereinheiten aus den jeweiligen Bausteinen erreicht werden. In Anwesenheit einer nukleären Fraktion mit potentiellen Biogenesefaktoren konnten reife Ribosomen dennoch *in vitro* rekonstituiert werden (Mangiarotti und Chiaberge, 1997). Dies deutet darauf hin, dass die Assemblierung der ribosomalen Proteine in eukaryotische Ribosomen nur in Anwesenheit zahlreicher Biogenesefaktoren ablaufen kann. Dabei scheinen die Prinzipien der *in vivo* Assemblierung der eukaryotischen Untereinheiten mit der beobachteten Hierarchie der prokaryotischen *in vitro* Assemblierung grundsätzlich übereinzustimmen (Ferreira-Cerca et al., 2005, 2007).

1.3.3.4 Intranukleärer Transport und Export präribosomaler Partikel

Neusynthetisierte ribosomale Partikel müssen im Laufe der Ribosomenreifung vom Nukleolus, dem Ort der rDNA Transkription, über das Nukleoplasma an ihren Wirkungsort, das Zytoplasma, transportiert werden.

Wie bereits beschrieben sind am intranukleären Transport, d.h. dem Transport vom Nukleolus ins Nukleoplasma, zahlreiche Proteine beteiligt. Darunter auch die aus insgesamt fünf Proteinen bestehende Gruppe der Noc-Proteine (Noc = Nucleolar Complex associated). Die drei Proteine Noc1p, Noc2p und Noc3p sind am Transport der prä-60S Untereinheit

(Milkereit et al., 2001), die beiden Proteine Noc4p und Nop14p am Transport der prä-40S Untereinheit (Milkereit, Strauss, et al., 2003) beteiligt.

Der Export der beiden Untereinheiten ins Zytoplasma läuft über die Interaktion spezifischer Exportfaktoren mit dem Kernporenkomplex (NPC = nuclear pore complex) in der Kernmembran. Dabei handelt es sich um einen etwa 66 MDa großen Proteinkomplex (Yang et al., 1998), der sich aus 30 verschiedenen Nukleoporinen zusammensetzt und durch deren symmetrische Anordnung als Zylinder in der Membran vorliegt. Der NPC besteht aus drei Domänen, dem zentralen Kern, einem nukleären Korb-ähnlichen Anteil und den zytoplasmatischen Fibrillen (Allen et al., 2000; Rout and Aitchison, 2000, 2001). Einige der Nukleoporine enthalten Domänen mit mehreren Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin (F) und Glycin (G), die sogenannten „FG-repeats“, die möglicherweise bei der Interaktion von Transportfaktoren mit der Kernpore eine Rolle spielen (Rout et al., 2001).

Grundsätzlich interagieren Transportfaktoren wie die Importine und Exportine der Karyopherin- β Familie mit spezifischen Import- (z.B. NLS = nuclear localisation sequences) oder Exportsignalen (z.B. NES = nuclear export sequences) an zu transportierenden Makromolekülen (Görlisch und Kutay, 1999). Außerdem binden sie an die kleine GTPase Ran (Moore und Blobel, 1994), da beim Transport der Zielproteine durch die Kernpore Energie benötigt wird, die durch die Hydrolyse von GTP gewonnen wird.

Ein detailliert untersuchtes Exportin von Proteinen und RNPs mit Leucin-reichen Exportsequenzen ist das Karyopherin- β Crm1p/Xpo1p (Fornerod et al., 1997), das ebenfalls eine Rolle beim RanGTP-abhängigen Export der beiden präribosomalen Untereinheiten spielt (Moy und Silver, 1999, 2002; Ho et al., 2000b; Gadal et al., 2001).

Crm1p scheint direkt mit spezifischen Exportfaktoren an den präribosomalen Untereinheiten zu interagieren. Dabei könnte es sich um eine Bindung an bereits assemblierte ribosomale Proteine oder an nichtribosomale Adapterproteine handeln. Auch der prä-rRNA-Gehalt der Präribosomen scheint eine Rolle beim Export zu spielen, da spezifisch nur 20S rRNA enthaltende SSU-Vorläufer und reife rRNAs enthaltende LSU-Vorläufer exportiert werden (Trapman et al., 1976; Trapman und Planta, 1976).

Der LSU-Biogenesefaktor Nmd3p wurde als Crm1p-abhängiger Exportfaktor der großen ribosomalen Untereinheit beschrieben (Ho et al., 2000b, 2000a; Gadal et al., 2001; Johnson et al., 2002). Nmd3p bindet im Nukleoplasma an späte prä-60S Partikel und den Exportrezeptor Crm1p und scheint so die Interaktion des Präribosoms mit RanGTP und dem NPC zu vermitteln (Johnson et al., 2002; Thomas und Kutay, 2003; Trotta et al., 2003). Nach Transport der prä-60S Untereinheit ins Zytoplasma wird Nmd3p noch vor der Translationsinitiation abgelöst (Ho und Johnson, 1999). Dabei scheinen die zytoplasmatische GTPase Lsg1p und das ribosomale Protein rpL10 eine essentielle Rolle zu spielen (West et al., 2005; Hedges et al., 2005; Hofer et al., 2007).

Neben dem Nmd3p/Crm1p-abhängigen Export scheinen in Hefezellen noch zwei weitere nicht-konservierte Exportmechanismen beim Transport der großen Untereinheit zu existieren. Dabei handelt es sich einerseits um das Heterodimer Mex67p/Mrt2p (Yao et al., 2007, 2008), das bereits detailliert als mRNA-Exportrezeptor untersucht wurde (Segref et al., 1997; Santos-Rosa et al., 1998; Fribourg und Conti, 2003). Andererseits scheint der nichtessentielle LSU-Biogenesefaktor Arx1p als dritter möglicher Exportrezeptor der 60S Untereinheit zu agieren (Bradatsch et al., 2007; Hung et al., 2008). Wie Nmd3p scheint auch Arx1p nach der Translokation der LSU ins Zytoplasma vor der Translationsinitiation abgelöst werden zu müssen (Hung and Johnson, 2006). Dabei spielen mehrere Proteine, wie Rei1p, Alb1p, Jjj1p und Drg1p, eine essentielle Rolle. Generell sind diese Proteine vermutlich ebenfalls notwendig für das Ablösen und Recycling anderer später Faktoren, wie z.B. Tif6p, im Zytoplasma (Lebreton et al., 2006; Hung et al., 2006; Demoinet et al., 2007; Pertschy et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Transportvorgängen der großen Untereinheit weiß man noch wenig über die genauen Exportmechanismen der kleinen Untereinheit. Obwohl für zahlreiche Proteine, wie z.B. Ltv1p, Noc4p, Pno1p und Rio2p, eine essentielle Funktion bei diesem Prozess beschrieben wurde (Zemp et al., 2009; Vanrobays et al., 2008; Seiser et al., 2006; Milkereit, Strauss, et al., 2003), konnte keiner dieser Faktoren als Adapterprotein für die Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1p identifiziert werden.

Grundsätzlich scheinen viele Ribosomenbiogenesefaktoren beider Untereinheiten, die eventuell eine Rolle bei deren Export spielen könnten, definierte Strukturmodule, die „HEAT-repeats“, zu enthalten (Dlakić und Tollervey, 2004; Oeffinger et al., 2004). Diese Domänen findet man auch in großer Zahl in Karyopherinen (Conti et al., 2006). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Faktoren den Export der Untereinheiten begünstigen können, indem sie die stark negative Ladung der Präribosomen beim Durchtritt durch den NPC abschirmen können (Dlakić et al., 2004; Oeffinger et al., 2004).

1.3.4 Dynamik präribosomaler Partikel

1.3.4.1 Zusammensetzung des 90S Partikels

Wie bereits beschrieben beginnt die Synthese der Ribosomen mit der Transkription der 35S prä-rRNA durch die Pol I und der kotranskriptionalen Anlagerung der etwa 40 Komponenten des SSU Prozessoms und der U3 snoRNA im Bereich der 5' ETS und der 18S rRNA (Dragon et al., 2002; Wery et al., 2009; Turner et al., 2009; Bernstein et al., 2004; Grandi et al., 2002; Pérez-Fernández et al., 2007). Nachdem die Identität der verschiedenen Proteinkomponenten dieses Partikels festgestellt werden konnte (Bernstein et al., 2004; Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002), wurde dessen Aufbau und Synthese genauer

untersucht. Dabei konnte ein hierarchischer Ablauf der Assemblierung definierter Proteinmodule an die prä-rRNA beobachtet werden (Pérez-Fernández et al., 2007).

Anhand der Analyse definierter Mutantenstämme wurde vorgeschlagen, dass zunächst der aus den sieben Proteinen Utp10p, Nan1p, Utp4p, Utp8p, Utp5p, Utp9p und Utp15p bestehende t-UTP Subkomplex (Gallagher et al., 2004) an die prä-rRNA bindet (Abbildung 8). Abhängig von der t-UTP Bindung scheint die Rekrutierung weiterer Submodule und von Einzelproteinen auf zwei voneinander unabhängigen Wegen zu erfolgen. Einerseits binden die Submodule U3-snoRNP, Pwp2p/UTP-B (Pwp2p, Utp6p, Utp13p, Utp18p, Utp21p, Dlp2p) und der Mpp10p Komplex (Mpp10p, Imp3p, Imp4p) zusammen mit sieben weiteren Proteinen Utp20p, Bms1p, Kre33p, Nop14p, Enp2p, Noc4p und Krr1p. Andererseits erfolgt die Rekrutierung des UTP-C Komplexes (Utp22p, Rrp7p, Cka1p, Cka2p, Ckb1p, Ckb2p) über Rrp5p an die 35S prä-rRNA. Desweiteren konnte anhand der beobachteten Abhängigkeiten der Interaktionen auch ein *in silico* Modell des modularen Aufbaus des 90S Präribosoms erstellt werden (Pérez-Fernández et al., 2007).

Die Existenz derartiger Submodule konnte nach der Disruption präribosomaler 90S Partikel mehrfach nachgewiesen werden (Dosil and Bustelo, 2004; Granneman et al., 2003; Watkins et al., 2000; Wehner et al., 2002; Krogan et al., 2004), jedoch ist auch hier noch unklar, ob sich diese Komplexe *in vivo* unabhängig von der Synthese und Existenz präribosomaler Partikel ausbilden können.

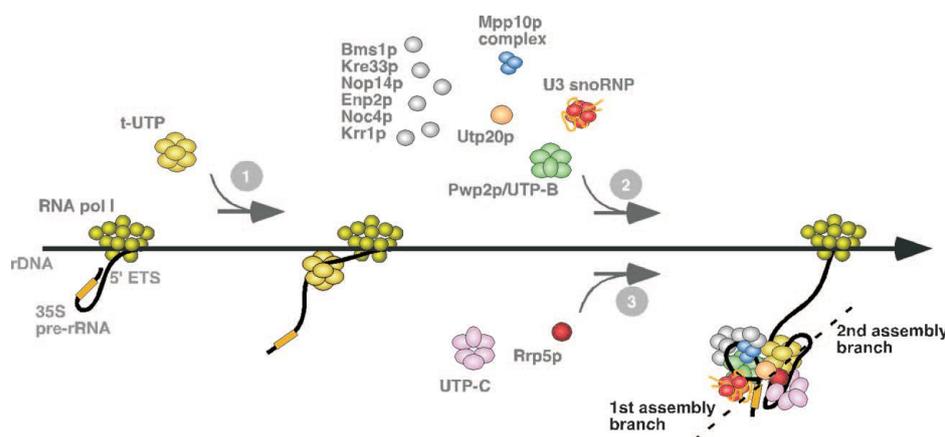


Abbildung 8: Modell der hierarchischen Synthese des 90S Präribosoms

Nach Bindung des t-UTP Subkomplexes an die neusynthetisierte prä-rRNA (Schritt 1) können weitere Komponenten des 90S Präribosoms binden. Dabei handelt es sich einerseits um die Anlagerung des Pwp2p/UTP-B Submoduls, des U3 snoRNPs, des Mpp10 Komplexes und von sieben weiteren Proteinen (Schritt 2). Andererseits erfolgt die davon unabhängige Bindung von Rrp5p und davon abhängig des UTP-C Submoduls (Schritt 3). Aus (Pérez-Fernández et al., 2007)

Das beschriebene 90S Präribosom enthält hauptsächlich Faktoren, die zur Synthese der 40S Untereinheit benötigt werden und kaum Faktoren des 60S Synthesewegs (Grandi et al., 2002). Diese Faktoren scheinen erst nach der Trennung der beiden 40S und 60S Vorläuferpartikel angelagert und benötigt zu werden.

1.3.4.2 Synthese der kleinen ribosomalen Untereinheit

Nur wenige Proteine, die bereits auf der Ebene des SSU Prozessoms an das Präribosom gebunden sind, bleiben nach der Prozessierung an den Schnittstellen A_0 , A_1 und A_2 an das entstandene prä-40S Partikel assoziiert. Dazu gehört das Protein Enp1p, das somit sowohl an nukleäre RNPs bindet, die die 35S prä-rRNA enthalten, als auch an SSU Vorläuferpartikel, die die 20S rRNA enthalten und in Zytoplasma exportiert werden (Schäfer et al., 2003; Chen et al., 2003). Entsprechend zeigen sowohl Komponenten des SSU Prozessoms als auch späte Biogenesefaktoren der kleinen Untereinheit Koreinigung mit Enp1p. Dazu gehören u.a. die Serin-Kinase Rio2p (Vanrobays et al., 2003; Geerlings et al., 2003), die putative Endonuklease Nob1p und deren Interaktionspartner Pno1p (Fatica et al., 2004; Vanrobays et al., 2004; Fatica et al., 2003; Pertschy et al., 2009), Ltv1p (Seiser et al., 2006) und Tsr1p (Gelperin et al., 2001), die alle essentiell für die Prozessierung der 20S prä-rRNA zur 18S rRNA in der translationskompetenten 40S Untereinheit sind. Generell jedoch ist die Komplexität später SSU Vorläuferpartikel deutlich geringer als diejenige der prä-60S Partikel, die im Laufe der LSU-Reifung zahlreichen Änderungen in der Protein- und rRNA-Zusammensetzung unterworfen werden.

1.3.4.3 Synthese der großen ribosomalen Untereinheit

Wie bereits erwähnt erfolgt die Synthese der reifen rRNAs der LSU nach der Trennung der Vorläuferpartikel beider Untereinheiten durch Prozessierung an der Stelle A_2 (oder in geringerem Maße an A_3) über eine Vielzahl von prä-rRNA Zwischenstufen. Daran assoziieren in Laufe der Partikelreifung vorübergehend mehr als 50 für die 60S Synthese spezifische Ribosomenbiogenesefaktoren, was eine große Heterogenität und Dynamik der prä-60S RNPs widerspiegelt (Tschochner und Hurt, 2003; Fromont-Racine et al., 2003). Dabei handelt es sich um (1) frühe nukleoläre Faktoren, die beispielsweise an der Modifikation und Prozessierung der rRNA beteiligt sind, (2) Faktoren, die früh an LSU-Vorläufer binden und mit ihnen exportiert werden, (3) Faktoren des intranukleären Transports, (4) spätere nukleoplasmatische Faktoren und (5) Faktoren, die eine Rolle beim Export der LSU ins Zytoplasma spielen (Tschochner et al., 2003).

Frühe 60S Vorläuferpartikel enthalten die 27SA₂ prä-rRNA, die 5S rRNA und zahlreiche Proteine wie z.B. C/D Box und H/ACA Box snoRNP Komponenten, Nsa3p, Noc1p, Noc2p und Nop7p (Nissan et al., 2002). Dabei spielen Noc1p und Noc2p eine Rolle beim

intranukleären Transport des prä-60S Partikels (Milkereit et al., 2001), während Nop7p an dem Prozessierungsereignis am 5' Ende der 5,8S rRNA an der Stelle B₁ beteiligt zu sein scheint (Oeffinger et al., 2002). Die dadurch entstehenden 27SB prä-rRNA enthaltenden LSU-Vorläuferpartikel (Saveanu et al., 2003) unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung deutlich von frühen prä-60S Komplexen (Nissan et al., 2002). Dies scheint auf die Dissoziation vieler Faktoren, wie z.B. der C/D Box und H/ACA Box snoRNP Komponenten und von Noc1p, und die Assoziation neuer Proteine, wie z.B. Noc3p (Milkereit et al., 2001), zurückzuführen zu sein.

Durch Prozessierung der 27SB prä-rRNA an der Schnittstelle C₂ in der ITS2-Region und exonukleolytischen Verdau der entstandenen prä-rRNAs gehen die in späten prä-60S Partikeln enthaltenen 5,8S und 25S rRNAs hervor. Auch während dieser Reifungsschritte finden zahlreiche Änderungen der Art und Menge der assoziierten Proteine statt. Faktoren wie z.B. Noc3p sind nicht mehr enthalten, während Proteine wie Rix1p, die eine essentielle Rolle bei den beschriebenen Prozessierungsschritten spielen (Galani et al., 2004) an dieses prä-60S Partikel binden. Nach der Bindung von Proteinen wie Arx1p und Nmd3p können diese Partikel über die Kernporen ins Zytoplasma exportiert werden (Bradatsch et al., 2007; Hung et al., 2008; Ho et al., 2000b; Gadal et al., 2001).

Grundsätzlich scheint im Laufe der Partikelreifung die Komplexität, d.h. die Anzahl der jeweils assoziierten nichtribosomalen Proteine, immer mehr abzunehmen. Während frühe 60S Präribosomen noch etwa 50 assoziierte Biogenesefaktoren aufweisen, enthalten späte LSU-Vorläufer beim Export ins Zytoplasma nur noch wenige nichtribosomale Proteine (Nissan et al., 2002). Erst durch die Dissoziation dieser Biogenesefaktoren (z.B. Arx1p, Tif6p und Nmd3p) im Zytoplasma entsteht die translationskompetente 60S Untereinheit (Hedges et al., 2005; Lebreton et al., 2006; Senger et al., 2001).

1.4 Quantitative Massenspektrometrie als sensitive Methode zum Vergleich der Proteinzusammensetzung präribosomaler Komplexe

Wie bereits beschrieben konnten durch Reinigungen über das TAP-Epitop und gel-basierte massenspektrometrische Analysen eine Vielzahl der an der Synthese eukaryotischer Ribosomen beteiligten Proteine identifiziert werden (Schäfer et al., 2003; Saveanu et al., 2003; Pérez-Fernández et al., 2007; Nissan et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Dragon et al., 2002; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006; Grandi et al., 2002). Bei der Auftrennung gereinigter Proteinkomplexe durch SDS-PAGE, Ausschneiden der Proteinbanden und deren massenspektrometrischer Identifikation besteht bei sehr komplexen Proben wie präribosomalen Partikeln die Gefahr, dass nicht alle enthaltenen Proteinkomponenten identifiziert werden können. Zusätzlich wird insbesondere der Vergleich der Zusammensetzungen gereinigter präribosomaler Proteinproben verschiedener

Zellzustände durch starke unspezifische Anreicherung reifer ribosomaler Untereinheiten erschwert.

In den letzten Jahren konnten einige neue Methoden der Proteanalytik als mögliche Lösungsansätze dieser Problematik aufgezeigt werden. Eine sehr effektive Weiterentwicklung stellt die Auftrennung komplexer Protein- und Peptidgemische mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography = HPLC) dar. Dabei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem je nach Bedarf verschiedene Trennmethoden wie Umkehrphasen- und Ionenaustauschchromatographie Anwendung finden. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich im Gegensatz zur gel-basierten Auftrennung auch sehr komplexe Proteinproben auftrennen und massenspektrometrisch analysieren (Mueller et al., 2007).

Um weiterhin eine Möglichkeit zum Vergleich der Zusammensetzungen gereinigter Proteinproben verschiedener Zellzustände zu erhalten, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden der Proteinmarkierung zur anschließenden quantitativen massenspektrometrischen Analyse entwickelt (Ong and Mann, 2005).

Dabei besteht einerseits die Möglichkeit der metabolischen *in vivo* Markierung von Proteinen durch Einbau von Aminosäuren, die je nach zu untersuchendem Zellzustand mit verschiedenen nicht-radioaktiven Isotopen markiert worden sind (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture = SILAC) (Ong et al., 2002). Andererseits können aufgereinigte Proteinkomplexe aus verschiedenen Zellzuständen *in vitro* chemisch modifiziert werden. Dabei werden gereinigte Proteine entweder z.B. an Cysteinresten modifiziert (Isotope-coded affinity tags = ICAT), verdaut und markierte Peptide affinitätsgereinigt und massenspektrometrisch analysiert (Gygi et al., 1999), oder erst nach tryptischem Verdau an den N-Termini und Lysinresten entstandener Peptide modifiziert (isobaric tag for relative and absolute quantitation = iTRAQ) und ebenfalls massenspektrometrisch analysiert (Ross et al., 2004).

Im Zuge der Quantifizierung der Signalintensitäten definierter modifizierter Peptide im Massenspektrum kann schließlich eine vergleichende Aussage über die Zusammensetzung der gereinigten Komplexe aus verschiedenen Zellzuständen getroffen werden.

Die quantitative Untersuchung von Proteinkomplexen mit Hilfe des iTRAQ-Reagenzes konnte bereits erfolgreich zur vergleichenden Analyse spliceosomaler (Schmidt und Urlaub, 2009) und präribosomaler Partikel (Fuentes et al., 2007; Jiang et al., 2007) eingesetzt werden.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bei dem hoch dynamischen und komplexen Vorgang der Synthese eukaryotischer Ribosomen stellt sich grundsätzlich die Frage, in welcher Form die zahlreichen

beschriebenen Ribosomenbiogenesefaktoren an präribosomale Partikel assoziieren. Dabei besteht die Möglichkeit (1) der Bindung einzelner Proteine an unabhängigen Bindungsstellen der (prä-) rRNA, (2) der sequenziellen Assoziation einzelner Proteine an bereits gebundene ribosomale Proteine oder Biogenesefaktoren oder auch (3) der Assoziation vorgeformter, prä-rRNA unabhängiger Proteinmodule. Weiterhin ist auch unklar, ob diese Proteine als Einzelproteine oder im Komplex mit anderen Faktoren im Laufe der Ribosomenreifung von präribosomalen Partikeln abdissoziieren.

Um die Existenz von Proteinmodulen von Ribosomenbiogenesefaktoren zu untersuchen und einen Einblick in die funktionelle Architektur präribosomaler Partikel zu gewinnen, wurden in den letzten Jahren viele systematische Analysen durchgeführt. Beispielsweise wurden die zu untersuchenden Proteine unter Bedingungen gereinigt, die zum partiellen Zerfallen präribosomaler RNPs führen, wie z.B. Zentrifugation bei hohen Geschwindigkeiten (Krogan et al., 2004), Destabilisation durch Hochsalzbehandlung (Milkereit et al., 2001; Schäfer et al., 2006), Behandlung mit Phosphataseinhibitoren (Miles et al., 2005) oder Depletion anderer Biogenesefaktoren (Pérez-Fernández et al., 2007; Miles et al., 2005; Lebreton et al., 2008). Auf diesem Wege konnten einige kleine Proteinmodule von Biogenesefaktoren aus Hefezellen gereinigt und massenspektrometrisch identifiziert werden.

Ob sich diese Subkomplexe *in vivo* unabhängig von der Existenz und Neusynthese präribosomaler Partikel ausbilden und als vorgeformte Komplexe an Präribosomen binden oder von ihnen abdissoziieren und in der Zelle existieren können, blieb jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb im Gegensatz zu früheren Arbeiten eine Strategie gewählt werden, die es ermöglicht, Proteinmodule von Ribosomenbiogenesefaktoren aufzureinigen, die sich *in vivo* unabhängig von der Anwesenheit und der Neusynthese von prä-rRNA ausbilden können.

Dazu wurde ein konditioneller Hefestamm mit einer Mutation des essentiellen Transkriptionsfaktors Rrn3p gewählt, was unter definierten Bedingungen die Reinigung prä-rRNA unabhängiger Proteinmodule von Ribosomenbiogenesefaktoren ermöglicht.

Zunächst sollten verschiedene Faktoren, die an definierten Schritten der Biogenese der kleinen oder der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt sind, mit einer TAP-Epitopmarkierung versehen werden, die eine einfache Reinigung des jeweiligen Faktors ermöglichen sollte. Neben der Untersuchung von Änderungen des Proteingehalts, der subzellulären Lokalisation und der prä-rRNA-Interaktionen dieser Faktoren in An- und Abwesenheit von Transkription durch die Pol I, sollten vor allem deren Proteininteraktionen analysiert werden. Um die Zusammensetzung gereinigter Komplexe in An- und Abwesenheit von prä-rRNA-Neusynthese zu untersuchen, wurde die Methode der quantitativen Massenspektrometrie unter Verwendung des iTRAQ-Reagenzes (Ross et al., 2004) genutzt.

Dabei dienten bereits beschriebene Submodule als Positivkontrolle zur Etablierung dieser Methode.

Weiterhin sollte eine Methode etabliert werden, die eine Rekonstitution der identifizierten Proteinmodule ermöglicht. Dazu sollten verschiedene Komplexkomponenten gemeinsam in SF21 Insektenzellen rekombinant exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden. Zuletzt sollte die Bindung dieser Komplexe an isolierte Abschnitte *in vitro* transkribierter (prä-) rRNA im Vergleich zur Bindung einzelner Proteine untersucht werden, um einen Eindruck über den Ort der Assoziation dieser Proteinmodule an präribosomale Partikel zu gewinnen.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung von epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren in An- und Abwesenheit von rRNA-Synthese durch RNA-Polymerase I

2.1.1 (prä-) rRNA- und Proteingehalt in Wildtyp und *rrn3-8* Hefezellen

In den letzten Jahren konnten insgesamt mehr als 150 eukaryotische Ribosomenbiogenesefaktoren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Durch Affinitätsreinigungen aus Hefezellextrakten konnten sie in verschiedensten präribosomalen Komplexen gemeinsam angereichert werden. Zusätzlich konnten bei dieser Art der Analyse verschiedene Arten und Mengen an prä-rRNA mit den jeweils gereinigten Faktoren kopräzipitiert werden. Dies lässt vermuten, dass zumindest Teile der gereinigten Komplexe als präribosomale Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) in der Hefezelle vorliegen (Schäfer et al., 2003; Saveanu et al., 2003; Pérez-Fernández et al., 2007; Nissan et al., 2002; Bernstein et al., 2004).

In dieser Arbeit sollte eine generelle Strategie entwickelt werden, um reine Proteinkomplexe zu identifizieren, die *in vivo* unabhängig von der Anwesenheit von neu-synthetisierter (prä-) rRNA vorliegen können. Somit wäre es möglich, dass diese Proteinkomplexe als Bausteine in präribosomale RNPs eingebaut werden könnten und funktionelle Blöcke in deren Bildung darstellen.

Um die (prä-) rRNA unabhängige Bildung von Proteinkomplexen von Ribosomenbiogenesefaktoren zu untersuchen, wurde die Pol I abhängige rRNA-Synthese konditionell inaktiviert, und die daraus resultierenden Effekte auf die Protein-zusammensetzung affinitätsgereinigter Komplexe der untersuchten Proteine analysiert.

Zunächst wurde untersucht, wie sich der (prä-) rRNA-Gehalt nach spezifischem Abschalten der Pol I Maschinerie in einem konditionellen temperatursensitiven Hefestamm, mit einer Mutation des essentiellen Pol I Transkriptionsfaktors Rrn3p, ändert. Dazu wurde der (prä-) rRNA-Gehalt im *rrn3-8* Stamm YCC95 (Cadwell et al., 1997) und im zugehörigen RRN3 Wildtyp-Hefestamm CG379 bei permissiver (24°C) und restriktiver Temperatur (37°C) durch Northernblot-Hybridisierung (4.2.2.5) analysiert (Abbildung 9 A).

Dazu wurde die gesamte RNA aus einer definierten Anzahl an Hefezellen isoliert, auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Zur Detektion der jeweiligen (prä-) rRNA Spezies wurden verschiedene radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet.

Die Pol I transkribiert einen Abschnitt des rDNA-Genlokus, wobei eine 35S prä-rRNA entsteht. Durch verschiedene endo- und exonukleolytische Spaltungen werden daraus schließlich die reifen 18S, 5.8S und 25S rRNA-Spezies der translatierenden reifen

Ribosomen (vgl. Abbildung 7). Die Menge der untersuchten Vorläufer-rRNA Spezies beider ribosomaler Untereinheiten (insbesondere der stabileren 27S und 20S prä-rRNAs) war in der *rrn3-8* Mutante nach dreistündiger Inkubation bei 37°C auf ca. 5% der Wildtyp rRNA-Menge reduziert (Abbildung 9 A, vgl. Spuren 2 und 4).

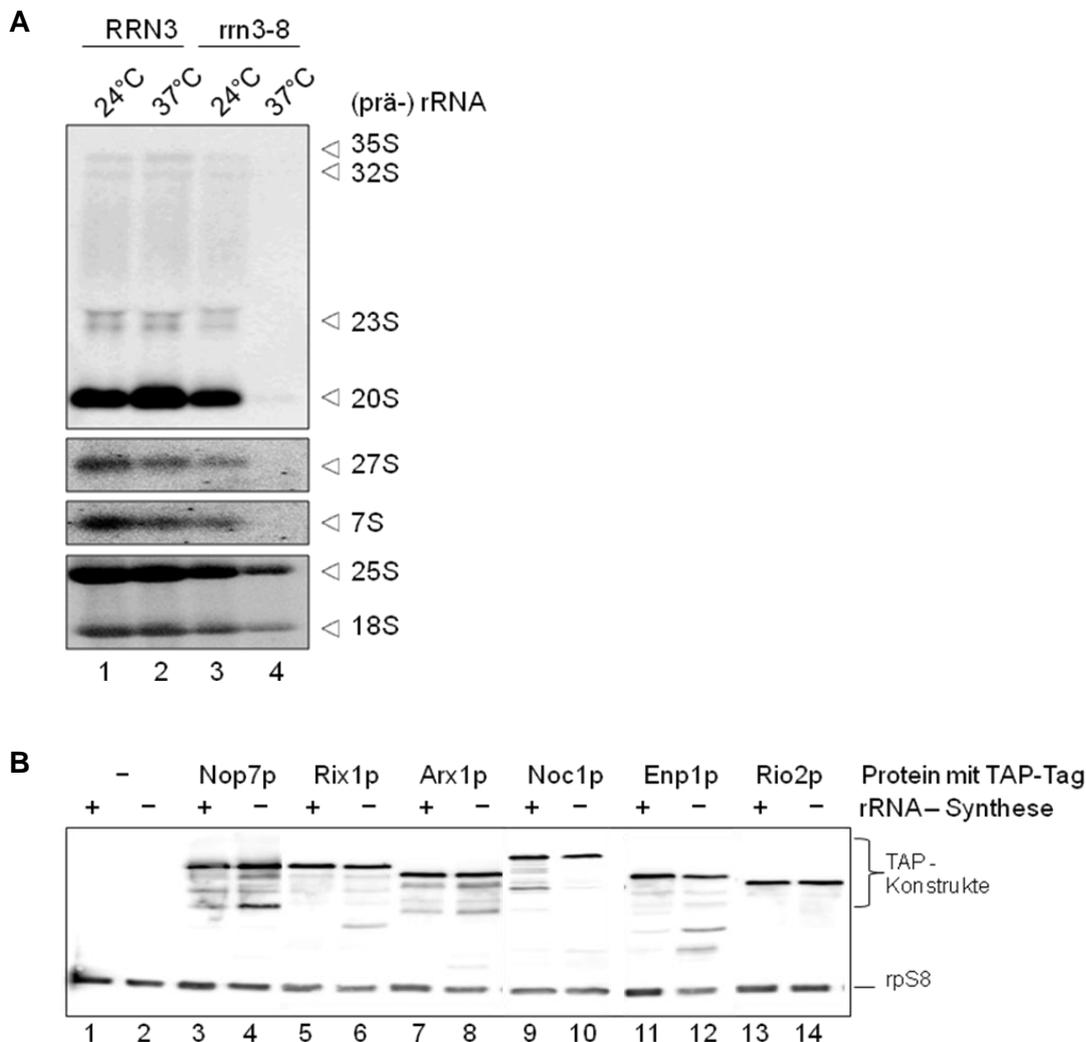


Abbildung 9: Die prä-rRNA-Menge im *rrn3-8* Hintergrund nimmt nach Abschalten der Neusynthese von rRNA stark ab, während die Proteinmenge der untersuchten Ribosomenbiogenesefaktoren kaum beeinflusst wird.

(A) Eine Northernblot-Hybridisierungsanalyse von Vorläufer- und reifer rRNA beider ribosomaler Untereinheiten wurde mit RNA aus Gesamtzellextrakten durchgeführt. Die Hefestämme mit RRN3 und mit *rrn3-8* Allel wurden bei permissiver (24°C) und restriktiver (3h 37°C) Temperatur untersucht. Extrahierte RNA aus einer gleichen Anzahl an Hefezellen wurde jeweils auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und auf eine Nylonmembran übertragen. Verschiedene radioaktiv markierte Oligonukleotide (4.1.9) wurden zur Detektion der angegebenen (prä-) rRNA Spezies verwendet.

(B) Der Proteingehalt der epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren wurde in Hefestämmen mit RRN3 (rRNA-Synthese +) und mit *rrn3-8* Hintergrund (rRNA-Synthese -) bei restriktiver (3h 37°C) Temperatur untersucht. Dabei wurde im Westernblot zur Detektion des ProteinA-Anteils des TAP-Epitops das PAP-Visualisierungsreagenz eingesetzt. Durch Bestimmung der Proteinmenge des ribosomalen Proteins rpS8 wurde ein gleichmäßiges Beladen des Analysesegels überprüft.

Zur Analyse der gewünschten Ribosomenbiogenesefaktoren wurden anschließend Derivate des Hefestamms YCC95 mit dem *rrn3-8* Allel und des entsprechenden RRN3 Wildtyp-Stamms CG379 hergestellt. Dazu wurde jeweils die codierende Sequenz des TAP-Epitops durch homologe Rekombination vor dem Stoppcodon eines der Gene, die für die zu untersuchenden Proteine kodieren, eingefügt (Puig et al., 2001). Dadurch verbleiben diese Gene unter der Kontrolle ihres endogenen Promotors, aber kodieren für C-terminale TAP-Fusionsproteine, die später durch Westernblotanalyse nachgewiesen und unter Verwendung entsprechender Affinitätsmatrizen aufgereinigt werden können.

Für diese Analyse wurden verschiedene Faktoren ausgewählt, für die bereits eine Rolle in definierten Schritten der Biogenese der kleinen (Enp1p, Rio2p) oder der großen ribosomalen Untereinheit (Noc1p, Nop7p, Rix1p, Arx1p) gezeigt werden konnte.

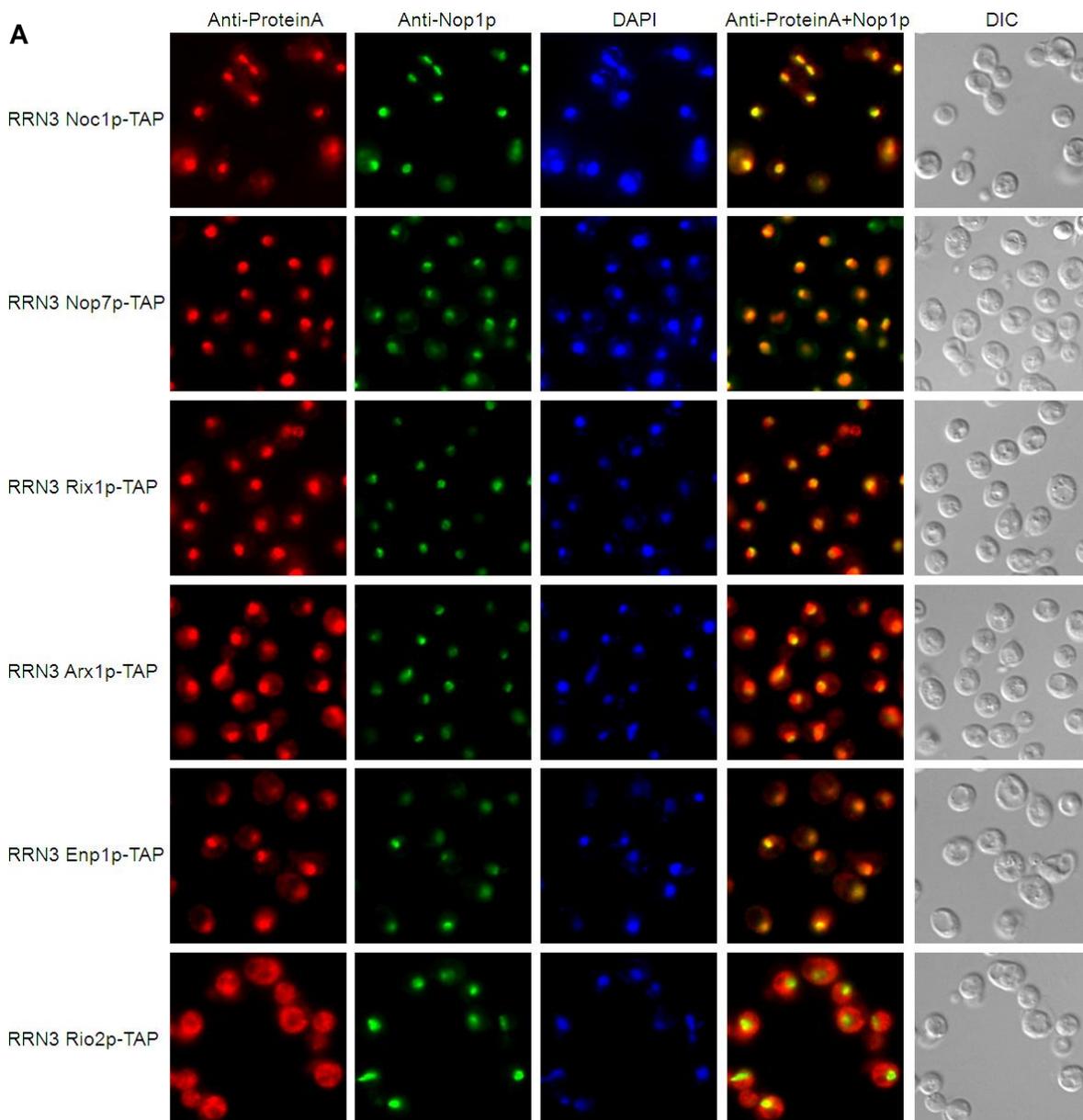
Der immunologische Nachweis des ProteinA-Anteils des TAP-Epitops durch Westernblotanalyse zeigte, dass für fast alle untersuchten Proteine der Expressionslevel nach Abschalten der rRNA-Neusynthese im *rrn3-8* Hintergrund mit der Proteinmenge in Wildtyphefezellen vergleichbar war (Abbildung 9 B, vgl. Spuren 3 und 4, 5 und 6, 7 und 8, 11 und 12, 13 und 14). Das Proteinsignal von Noc1p-TAP zeigte eine deutliche Reduktion auf ca. 40 % des Gehalts in RRN3 Wildtypzellen (Abbildung 9 B, Spuren 9 und 10) nach 3 h Inkubation bei der restriktiven Temperatur im *rrn3-8* Hintergrundstamm, was auf eine erhöhte Instabilität dieses Proteins im Vergleich zu den anderen untersuchten Ribosomenbiogenesefaktoren hinweisen könnte. Dennoch war der restliche Proteingehalt im *rrn3-8* Hintergrund ausreichend für eine weiterführende Analyse des Noc1p-TAP.

Grundsätzlich lässt das kaum veränderte Expressionsniveau des Großteils der untersuchten Faktoren vermuten, dass auch nach Abschalten der Neusynthese von rRNA durch die Pol I einige Proteinbestandteile präribosomaler Partikel noch immer in der Zelle vorhanden bleiben, obwohl durch die stark reduzierte prä-rRNA-Menge der Gehalt an Partikeln, die prä-rRNA enthalten, gleichzeitig stark reduziert sein muss.

2.1.2 Intrazelluläre Verteilung der epitopmarkierten Proteine

Anschließend wurde die intrazelluläre Verteilung der epitopmarkierten Faktoren sowohl im Wildtyp als auch im *rrn3-8* Hintergrund durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert. Zur Detektion der angegebenen Proteine wurde ein Antikörper, der gegen den ProteinA-Anteil des TAP-Tags gerichtet ist, verwendet. Parallel wurde zur Lokalisierung subzellulärer Kompartimente ein Antikörper gegen das nukleoläre Protein Nop1p und zur Färbung des gesamten Zellkerns 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) genutzt (Abbildung 10).

Wie erwartet (Milkereit et al., 2001; Adams et al., 2002) zeigten Noc1p-TAP und Nop7p-TAP im RRN3 Hintergrund eine Kolo­kalisierung mit dem nukleolären Markerprotein Nop1p. Nop7p-TAP schien auch schwache nukleoplasmatische Signale aufzuweisen, jedoch war das Signal dieses vergleichsweise stark exprimierten Proteins aufgrund der gleichbleibenden Belichtungszeiten leicht überbelichtet. Das Signal für Rix1p-TAP überlappte mit dem DAPI-Signal, was für eine Lokalisierung des Proteins im Nukleoplasma spricht. Zusätzlich konnte ein schwaches zytoplasmatisches Signal detektiert werden (Nissan et al., 2002). Arx1p-TAP wies ebenfalls eine deutliche Färbung sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma auf (Nissan et al., 2002). Auch der Biogenesefaktor der kleinen ribosomalen Untereinheit Enp1p-TAP zeigte nukleäre und schwache zytoplasmatische Signale (Schäfer et al., 2003), während Rio2p-TAP überwiegend starke zytoplasmatische Signale aufwies (Vanrobays et al., 2003).



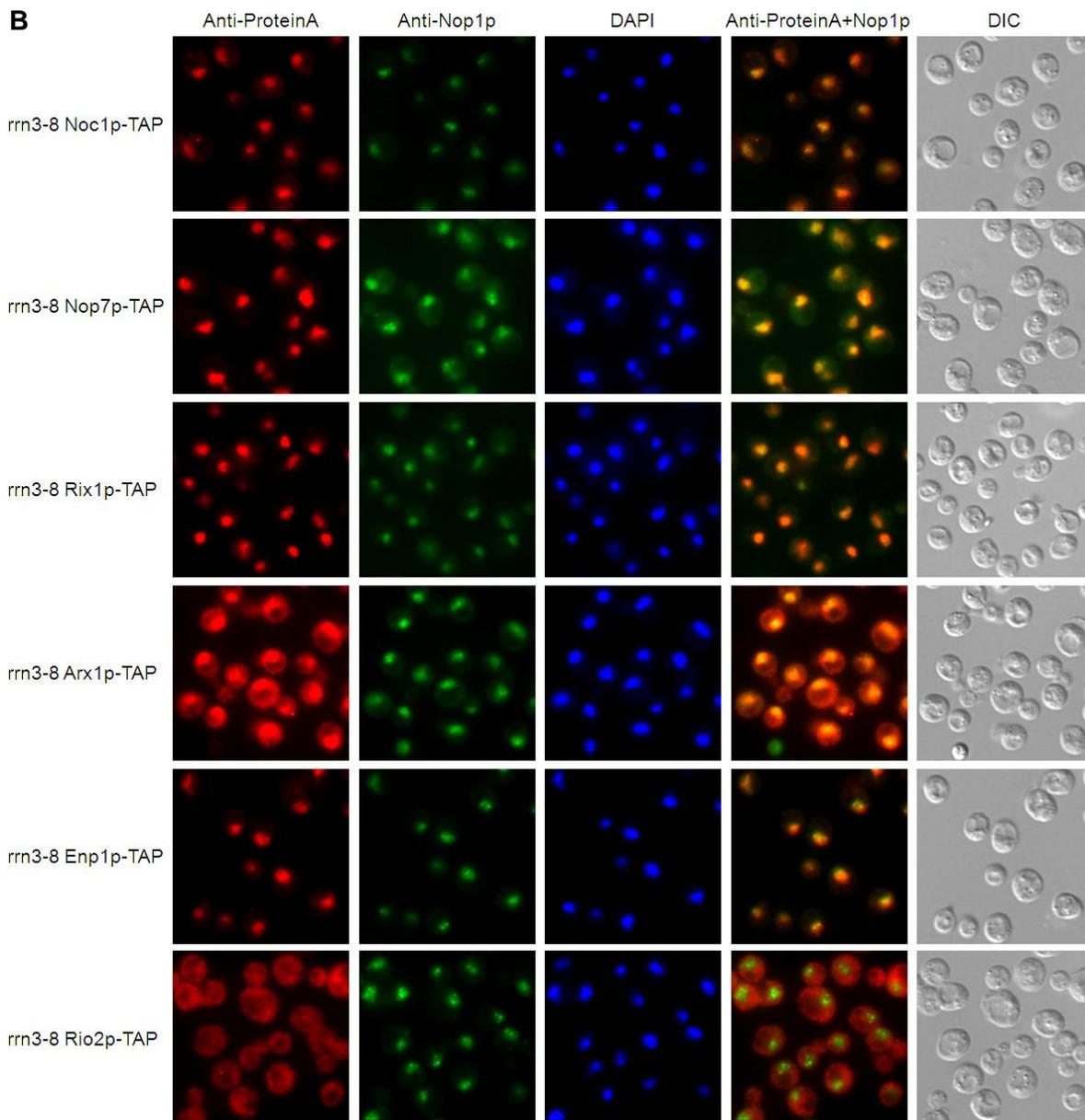


Abbildung 10: Die nukleo-zytoplasmatische Verteilung der untersuchten Ribosomenbiogenesefaktoren ändert sich nicht nach Abschalten der Pol I Transkription.

Die Lokalisierung der epitopmarkierten Proteine wurde in Hefestämmen mit **(A)** Wildtyp RRN3 und mit **(B)** *rrn3-8* Hintergrund nach 3 h Inkubation bei 37°C durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde ein Antikörper, der gegen den ProteinA–Anteil des TAP–Epitops gerichtet ist, zur Detektion der angegebenen Proteine verwendet (Sigma, P-3775, rot). Eine Anfärbung des Nukleolus erfolgte durch Verwendung eines Antikörpers, der gegen das nukleoläre Protein Nop1p gerichtet ist (Abcam, ab4575, grün). Die nachgewiesene Fluoreszenz wurde durch entsprechende sekundäre Antikörper erreicht (Alexa Fluor 594 Ziege anti-Hase (Molecular Probes, A-11012) und Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus (Molecular Probes, A-11017)). Zur Visualisierung des gesamten Zellkerns wurde 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) zugegeben (blau). Zur besseren Einordnung der subzellulären Verteilung mancher Proteine wurden die ProteinA– und Nop1p-Signale in einer weiteren Spalte überlagert. Zusätzlich ist die Morphologie der gesamten Zellen im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) gezeigt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde die Expositionszeit während der Analyse der verschiedenen epitopmarkierten Proteine nicht verändert. Dies bewirkt eine leichte Überbelichtung bei den stärker exprimierten Proteinen Nop7p-TAP und Arx1p-TAP.

Nach Abschalten der rRNA-Synthese im *rrn3-8* Hintergrund durch restriktive Wachstumsbedingungen (3 h bei 37°C) erschien das durch den anti-Nop1p Antikörper detektierte nukleoläre Signal deutlich weniger definiert als in Wildtypzellen, die ein klar sichelförmiges Signal aufwiesen (Abbildung 10 A/B). Stattdessen konnte eine deutliche Überlappung mit dem nukleoplasmatischen DAPI-Signal festgestellt werden. Diese Änderungen in der intranukleären Verteilung von Proteinen könnte auf mögliche Änderungen in der Struktur des Nukleolus als Folge des Abschaltens der Pol I Transkription zurückzuführen sein (Trumtel et al., 2000).

Bei der Lokalisierung der epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren, die im Wildtyphintergrund nukleoläre Signale gezeigt hatten, konnte in der *rrn3-8* Mutante eine mit Nop1p vergleichbare Umverteilung zu mehr nukleärer Lokalisierung beobachtet werden (Abbildung 10 B). Andererseits führte das Abschalten der Neusynthese von rRNA zu keinen offensichtlichen Umverteilungen der untersuchten Proteine zwischen Zellkern und Zytoplasma. Nur Enp1p-TAP schien ein etwas deutlicheres nukleäres Signal in Abwesenheit von rRNA – Synthese zu zeigen, während das zytoplasmatische Signal von Arx1p-TAP leicht zunahm.

Generell kann man jedoch sagen, dass sich die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Proteine nach Abschalten der Pol I Transkription kaum ändert und entsprechend nicht nur von ablaufender Ribosomenbiogenese abhängt und gesteuert werden kann.

2.1.3 (prä-) rRNA Koaffinitätsreinigung durch die epitopmarkierten Faktoren

Um zu untersuchen, mit welcher Art und Restmenge an (prä-) rRNA die epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren nach Abschalten der Neusynthese von rRNA noch assoziiert sind, wurden Affinitätsreinigungen der jeweiligen Proteine aus RRN3 Wildtyp und *rrn3-8* Hefezellen bei restriktiven Bedingungen durchgeführt. Die in den Zellextrakten und in den gereinigten Fraktionen enthaltene (prä-) rRNA wurde anschliessend durch Northernblot-Hybridisierung analysiert. Parallel dazu wurde die Menge der gereinigten, epitopmarkierten Proteine in den jeweiligen Fraktionen durch Westernblotanalyse ermittelt.

Die Art der mit den gereinigten Proteinen angereicherten prä-rRNA entsprach den in der Literatur beschriebenen Koreinigungen (Miles et al., 2005; Schäfer et al., 2003; Nissan et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Vanrobays et al., 2003). Im Wildtyphintergrund wurde durch Noc1p-TAP hauptsächlich 27SA₂ prä-rRNA und geringe Mengen an 35S, 32S und 27SB prä-rRNA angereichert (Abbildung 11 A, Spur 6). Im Gegensatz dazu zeigte Nop7p-TAP Assoziation an spätere, 27SB und 7S prä-rRNAs enthaltende, 60S Vorläuferpartikel. Frühe rRNA-Vorläufer wie 35S und 32S prä-rRNAs wurden in geringerem Maße kogereignet (Abbildung 11 A, Spur 10). Sowohl Rix1p-TAP als auch Arx1p-TAP zeigten Einbau in

präribosomale Partikel, die 27SB und 7S prä-rRNAs enthalten (Abbildung 11 A, Spuren 14 und 18).

Die beiden untersuchten Faktoren der kleinen ribosomalen Untereinheit Enp1p und Rio2p zeigten Assoziation an 40S Vorläuferpartikel, die die 20S prä-rRNA enthalten (Abbildung 11 B, Spuren 6 und 10). In dieser Analyse konnten entgegen früherer Untersuchungen (Chen et al., 2003) jedoch nur geringe Mengen an 35S und 32S prä-rRNAs mit Enp1p-TAP angereichert werden. Dies könnte auf eine generell geringe Menge an prä-rRNA in dem für diese Reinigung verwendeten Gesamtzellextrakt zurückzuführen sein (Abbildung 11 B, Spur 9). Entsprechend war die Präzipitation der frühen Vorläufer-rRNAs wie 35S und 32S prä-rRNAs mit Enp1p-TAP (Abbildung 11 B, Spur 10) eventuell unter dem Detektionslimit der verwendeten radioaktiven Sonden.

Bei allen untersuchten Ribosomenbiogenesefaktoren war die Effizienz der Anreicherung der prä-rRNAs derjenigen Untereinheit, für deren Synthese sie nicht benötigt werden, vergleichsweise gering. Dies spricht für eine hohe Spezifität der durchgeführten Analyse (Abbildung 11 A/B, Spuren 6, 10, 14 und 18).

Wie sich in den durchgeführten Westernblotanalysen zeigte, war für alle untersuchten Faktoren die Effizienz der TAP-Affinitätsreinigungen vergleichbar, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von rDNA-Transkription. Im Gegensatz dazu war der Anteil an mitgereinigter prä-rRNA deutlich reduziert, wenn keine Transkription durch die Pol I stattfand (Abbildung 11 A/B, vgl. Spuren 6 und 8, 10 und 12, 14 und 16, 18 und 20). Das Verhältnis des gereinigten Proteins zu der dabei angereicherten prä-rRNA war hier somit deutlich erhöht, was für eine Anreicherung von prä-rRNA freien Proteinkomplexen unter den gewählten Bedingungen spricht.

Interessanterweise zeigten sich bereits in Zellen, in denen die Transkription der rDNA nicht beeinflusst war, deutliche Unterschiede in den Mengen an angereicherter prä-rRNA mit gereinigtem Noc1p-TAP, Rix1p-TAP oder Nop7p-TAP (Abbildung 11 A, Spuren 6, 10 und 14). Trotz vergleichbarer Proteinsignale in der Westernblotanalyse wurde mit Nop7p-TAP signifikant mehr prä-rRNA angereichert als mit Noc1p-TAP oder Rix1p-TAP. Dies lässt vermuten, dass bereits im Wildtyphefestamm die mit Noc1p-TAP oder Rix1p-TAP angereicherten Fraktionen deutliche Mengen an prä-rRNA freien Proteinkomplexen enthalten. Dies setzt natürlich voraus, dass diese Faktoren in Wildtypzellen in vergleichbarer Stöchiometrie am Präribosom gebunden vorliegen.

Entsprechend kann man vermuten, dass auch Aufreinigungen von weiteren Ribosomenbiogenesefaktoren bereits unter Standardbedingungen aus unterschiedlichen Mengen an präribosomalen RNPs und prä-rRNA freien Proteinkomplexen bestehen könnten.

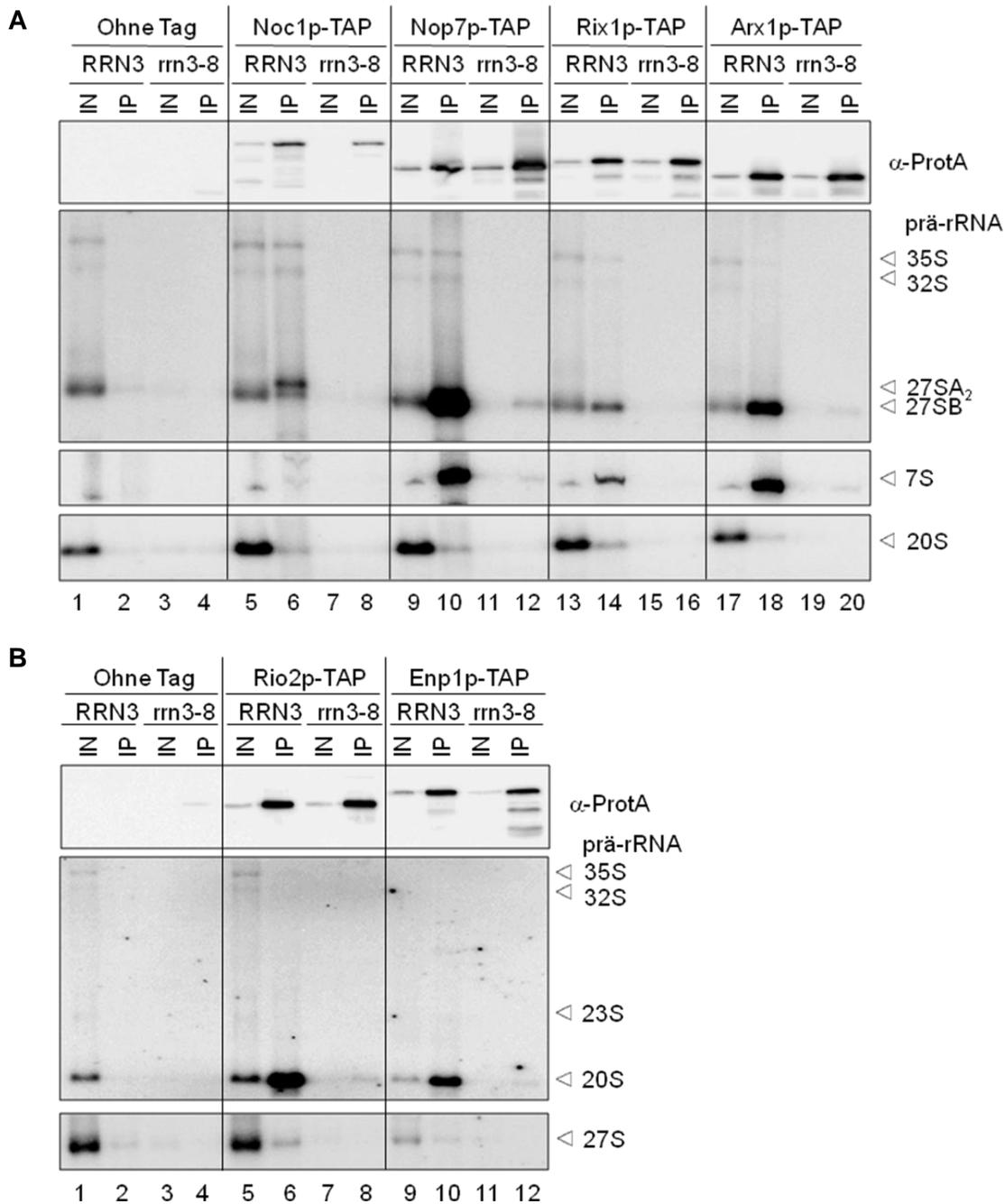
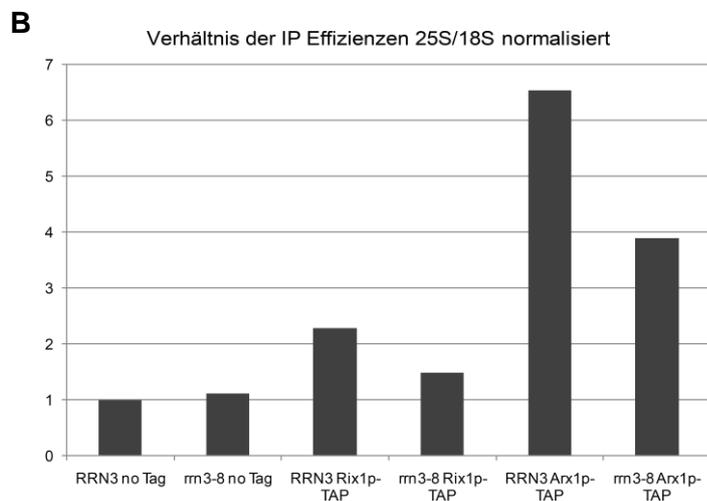
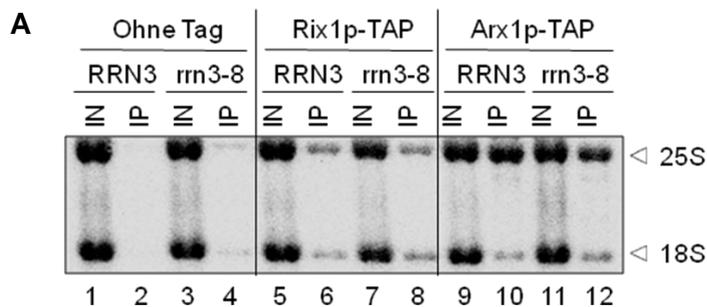


Abbildung 11: Im Gegensatz zur Wildtypsituation zeigen die untersuchten Biogenesefaktoren nach Abschalten der Pol I Transkription keine signifikante Koreinigung von prä-rRNA.

Die Vorläufer-rRNAs beider ribosomaler Untereinheiten wurden durch Northernblot-Hybridisierung analysiert. Dabei wurde die RNA aus Gesamtzellextrakten (IN) und aus Affinitätsreinigungen (IP) der **(A)** LSU-Biogenesefaktoren Noc1p-TAP, Nop7p-TAP, Rix1p-TAP und Arx1p-TAP, und der **(B)** SSU-Biogenesefaktoren Rio2p-TAP und Enp1p-TAP analysiert. Die Hefestämme mit dem RRN3 Wildtyp Allel oder dem *rrn3-8* Allel wurden bei restriktiver Temperatur untersucht. Zum Nachweis der jeweiligen (prä-) rRNA Spezies nach Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und Northernblot wurden verschiedene radioaktiv markierte Oligonukleotide (4.1.9) verwendet. Parallel wurde die Menge des epitopmarkierten Proteins im Gesamtzellextrakt (IN) und in den gereinigten Fraktionen (IP) durch Westernblotanalyse mit PAP-Visualisierungsreagenz bestimmt. Bei jedem Reinigungsansatz bedeuten gleiche Signalintensitäten in den IN und IP Spuren eine Reinigungseffizienz von 1%.

Frühere Analysen von Arx1p und Rix1p deuten darauf hin, dass diese Faktoren mit neusynthetisierten ribosomalen Untereinheiten, die reife 25S rRNA enthalten, assoziiert vorliegen. Sie scheinen jedoch nicht mehr an reife 60S Untereinheiten, die zusammen mit der 40S Untereinheit die Fähigkeit zur Translationsinitiation besitzen, gebunden zu sein (Nissan et al., 2002; Hung et al., 2006).

Deshalb wurden zusätzlich zu den Untersuchungen der Anreicherung von prä-rRNA auch die unter den angegebenen Bedingungen kogereinigten Mengen an reifen 25S rRNA und 18S rRNA-Spezies mit Rix1p-TAP und Arx1p-TAP untersucht. Dazu wurde zur Minimierung des Hintergrunds eine IgG-Dynabead-Matrix verwendet und Affinitäts-reinigungen der beiden Proteine aus Wildtyp und *rrn3-8* Hefezellen bei restriktiven Bedingungen untersucht. Die in den Zellextrakten und in den gereinigten Fraktionen enthaltene reife rRNA wurde anschließend durch Northernblot-Hybridisierung analysiert (Abbildung 12 A). In Anwesenheit von rRNA-Neusynthese zeigte sich eine über sechsfache Anreicherung der 25S rRNA im Vergleich zur 18S rRNA mit Arx1p-TAP und eine zweifache Anreicherung mit Rix1p-TAP (Abbildung 12 A/B, vgl. Spuren 10 und 6 mit 2). Bei dieser Quantifizierung wurden alle bestimmten Verhältnisse auf die unspezifische Anreicherung im Hintergrundstamm, in dem kein Protein mit dem TAP-Epitop markiert wurde, normalisiert.



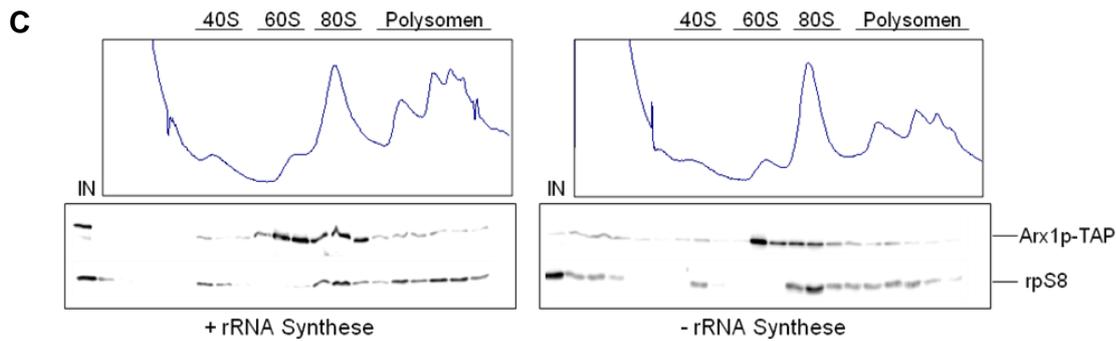


Abbildung 12: Arx1p zeigt auch in Abwesenheit von rRNA-Neusynthese Assoziation an 25S rRNA enthaltende große ribosomale Untereinheiten.

(A) Die reifen rRNAs beider ribosomaler Untereinheiten wurden durch Northernblot-Hybridisierung analysiert. Dabei wurde die RNA aus Gesamtzellextrakten (IN) und aus Affinitätsreinigungen (IP) der LSU-Biogenesefaktoren Rix1p-TAP und Arx1p-TAP analysiert. Die Hefestämme mit dem *RRN3* Wildtyp Allel oder dem *rrn3-8* Allel wurden bei restriktiver Temperatur untersucht. Zum Nachweis der jeweiligen rRNA Spezies wurden verschiedene radioaktiv markierte Oligonukleotide (4.1.9) verwendet. Bei jedem Reinigungsansatz bedeuten gleiche Signalintensitäten in den IN und IP Spuren eine Reinigungseffizienz von 1%.

(B) Das Verhältnis der Präzipitationseffizienzen der Affinitätsreinigungen für die 25S und 18S RNAs wurde berechnet und auf das Verhältnis im Wildtypstamm ohne Epitopmarkierung normalisiert. Dabei wurden die Programme MultiGauge V3.0 (Fujifilm) und Microsoft Excel verwendet.

(C) Das Sedimentationsverhalten des epitopmarkierten Arx1p-TAP wurde durch Auftrennung von Gesamtzellextrakten im Saccharosedichtegradienten ermittelt. Es wurden Extrakte von Stämmen mit dem *RRN3* Wildtyp Allel (+ rRNA Synthese) oder dem *rrn3-8* Allel (- rRNA Synthese) bei restriktiver Temperatur untersucht. Die Verteilung ribosomaler Partikel (40S, 60S, 80S, Polysomen) im Gradienten wurde durch Messung der optischen Dichte bei 254 nm und Westernblotanalyse jeder Fraktion des Gradienten mit einem Antikörper gegen das ribosomale Protein der kleinen Untereinheit rpS8 bestimmt. Die Menge des epitopmarkierten Arx1p-TAP in jeder Fraktion und im Gesamtzellextrakt (IN) wurde mittels Westernblotanalyse mit PAP-Visualisierungsreagenz untersucht.

Interessanterweise zeigte sich auch in Abwesenheit von rRNA-Synthese eine vierfache Anreicherung der 25S rRNA im Vergleich zur 18S rRNA mit Arx1p-TAP (Abbildung 12 A/B, Spur 12). Diese Anreicherung konnte bei Rix1p-TAP nicht beobachtet werden.

Somit konnte man vermuten, dass Arx1p-TAP in Abwesenheit von rRNA-Synthese an reife, nicht an der aktiven Translation beteiligte, große Untereinheiten gebunden vorliegt. Um dies zu bestätigen wurden Sedimentationsanalysen von Zellextrakten in Saccharosegradienten durchgeführt, wobei auch nach Abschalten der rRNA-Synthese der größte Anteil des Arx1p-TAP im Bereich reifer 60S Untereinheiten sedimentierte (Abbildung 12 C). Die durchgeführten Analysen zeigen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, dass Arx1p an große ribosomale Untereinheiten mit reifer 25S rRNA assoziiert ist. Da im untersuchten Hefestamm mit dem *rrn3-8* Allel keine Neusynthese stattfand und somit nur reife LSUs in der Zelle vorliegen können, scheint Arx1p neben der Bindung an neusynthetisierte 60S Untereinheiten auch Assoziation an reife LSUs zu zeigen. Diese Untereinheiten scheinen jedoch nicht aktiv an der Translation beteiligt zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Analysen darauf hinweisen, dass Zusammenschlüsse von Ribosomenbiogenesefaktoren aus Zellen, in denen keine Neusynthese von rRNA stattfand, zum größten Teil nicht an prä-rRNA assoziiert sind und, außer im Fall von Arx1p-TAP, auch frei von reifen rRNA Molekülen vorliegen.

2.2 Semiquantitativer Vergleich der Proteinzusammensetzung von Affinitätsreinigungen von epitopmarkierten Ribosomenbiogenese-faktoren in An- und Abwesenheit von rRNA-Synthese

2.2.1 Ablauf der quantitativen massenspektrometrischen Analyse

Um nun einerseits die mit den zu untersuchenden Faktoren in Wildtypzellen spezifisch angereicherten Proteine zu identifizieren, und andererseits die Unterschiede in der Zusammensetzung gereinigter Komplexe in An- und Abwesenheit von neu synthetisierter prä-rRNA zu untersuchen, wurde die Methode der semiquantitativen Massenspektrometrie (qMS) mit dem iTRAQ-Reagenz (Ross et al., 2004) verwendet.

Diese Methode eignet sich für den quantitativen Vergleich der Zusammensetzung gereinigter Proteinproben, die nach einer *in vitro* Markierung gemischt und gemeinsam im verwendeten Massenspektrometer analysiert werden.

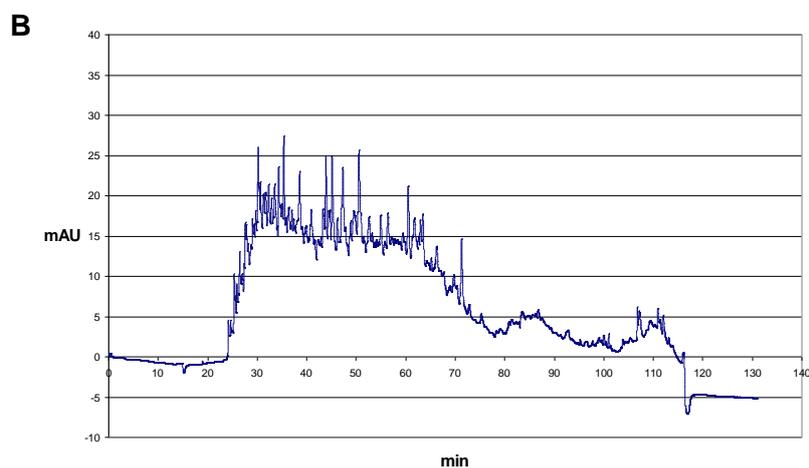
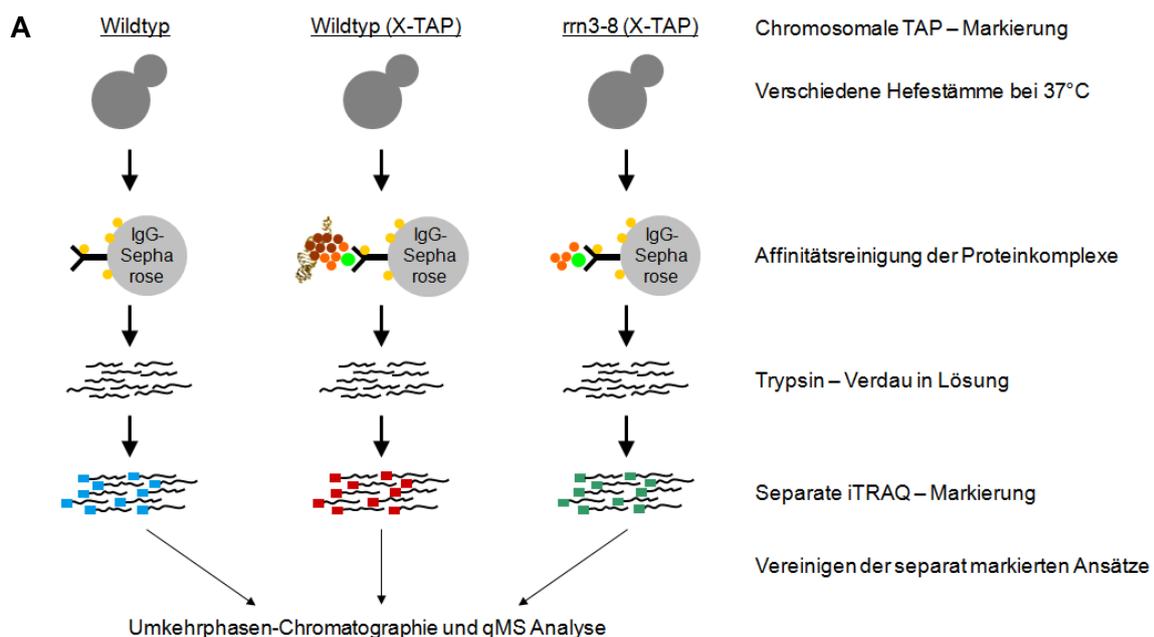


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung zur anschließenden qMS-Analyse

(A) Es wurden Affinitätsreinigungen der jeweiligen Proteine mit IgG–Sepharose durchgeführt. Dabei wurden pro Analyse der Wildtypstamm ohne Epitopmarkierung und der jeweilige Wildtyp und *rrn3-8* Mutantenstamm mit der TAP–Markierung am zu analysierenden Protein (●) untersucht. Dabei wurden Proteine unspezifisch (●), spezifisch rRNA–unabhängig (●) bzw. spezifisch rRNA–abhängig (●) kogereinigt. Die eluierten Proteine jeder Aufreinigung wurden in Lösung mit Trypsin verdaut und die daraus resultierenden Peptide separat *in vitro* mit verschiedenen iTRAQ–Reagenzien markiert (■ ■ ■). Nach Kombination der drei Ansätze wurden die Peptide unter Verwendung einer Nano–Flow–HPLC–Apparatur aufgetrennt, auf eine MALDI–Analyseplatte aufgetragen und im MALDI–TOF/TOF–Massenspektrometer vermessen.

(B) Gezeigt ist ein typisches Spektrum der Auftrennung der tryptischen Peptide auf einer Umkehrphasen–Säule in der verwendeten Nano–Flow–HPLC–Apparatur (Dionex Ultimate 3000). Aufgetragen ist die Absorption der Peptide bei 254 nm in Milli–Absorptionseinheiten (mAU) gegen die Laufzeit in Minuten (min).

Dazu wurden zunächst Affinitätsreinigungen über den ProteinA–Teil des TAP–Epitops der jeweiligen Proteine mit IgG–Sepharose durchgeführt. Dabei wurden für jede qMS–Analyse drei verschiedene Stämme untersucht: der Wildtypstamm ohne Epitopmarkierung sowie der jeweilige Wildtyp und *rrn3-8* Hefestamm mit der TAP–Markierung am zu analysierenden Protein (Abbildung 13). Dabei wurden im epitopmarkierten Wildtyp–Stamm zusätzlich zum Köderprotein weitere Faktoren sowohl (prä-) rRNA unabhängig als auch (prä-) rRNA abhängig angereichert, während im epitopmarkierten *rrn3-8* Stamm nach Abschalten der rRNA Neusynthese zusätzlich zum Köderprotein Faktoren nur (prä-) rRNA unabhängig kogereinigt wurden.

Die mit der TEV–Protease (tabaccho etch virus = Tabakmosaikvirus) eluierten Proteine jeder Aufreinigung wurden mit Methanol/Chloroform gefällt, an Cystein–Resten analysebedingt modifiziert und in Lösung mit Trypsin verdaut (4.2.6.11–4.2.6.14). Die daraus resultierenden Peptide wurden separat *in vitro* mit verschiedenen iTRAQ–Reagenzien markiert. Nach Vereinigung der drei Ansätze wurden die Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie unter Verwendung einer Nano–Flow–HPLC–Apparatur aufgetrennt, die Fraktionen automatisch auf eine Analyseplatte aufgetragen und im MALDI–TOF/TOF–Massenspektrometer (Matrix–unterstützte Laserdesorption/Ionisation– Time Of Flight) der Serie 4700 der Firma Applied Biosystems vermessen.

Das MS–Spektrum für jede Fraktion auf der MALDI–Analyseplatte wurde aufgenommen, wobei die darin enthaltenen Peptide nach Laserbeschuss ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Nach einer ihrem jeweiligen Masse/Ladungsverhältnis (m/z) entsprechenden Flugzeit erreichen die Peptide den Ionendetektor und zeigen somit ein Signal im aufgenommenen Spektrum (Abbildung 14). Da bei MALDI–Analysen jedes Peptid eine einfach positive Ladung trägt erfolgt diese Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Peptide. Dabei stellt jedes Absorptionsmaximum eine Mischung aus Peptiden gleicher

Sequenz aber mit unterschiedlicher iTRAQ-Markierung - je nach durchgeführter Affinitätsreinigung - dar.

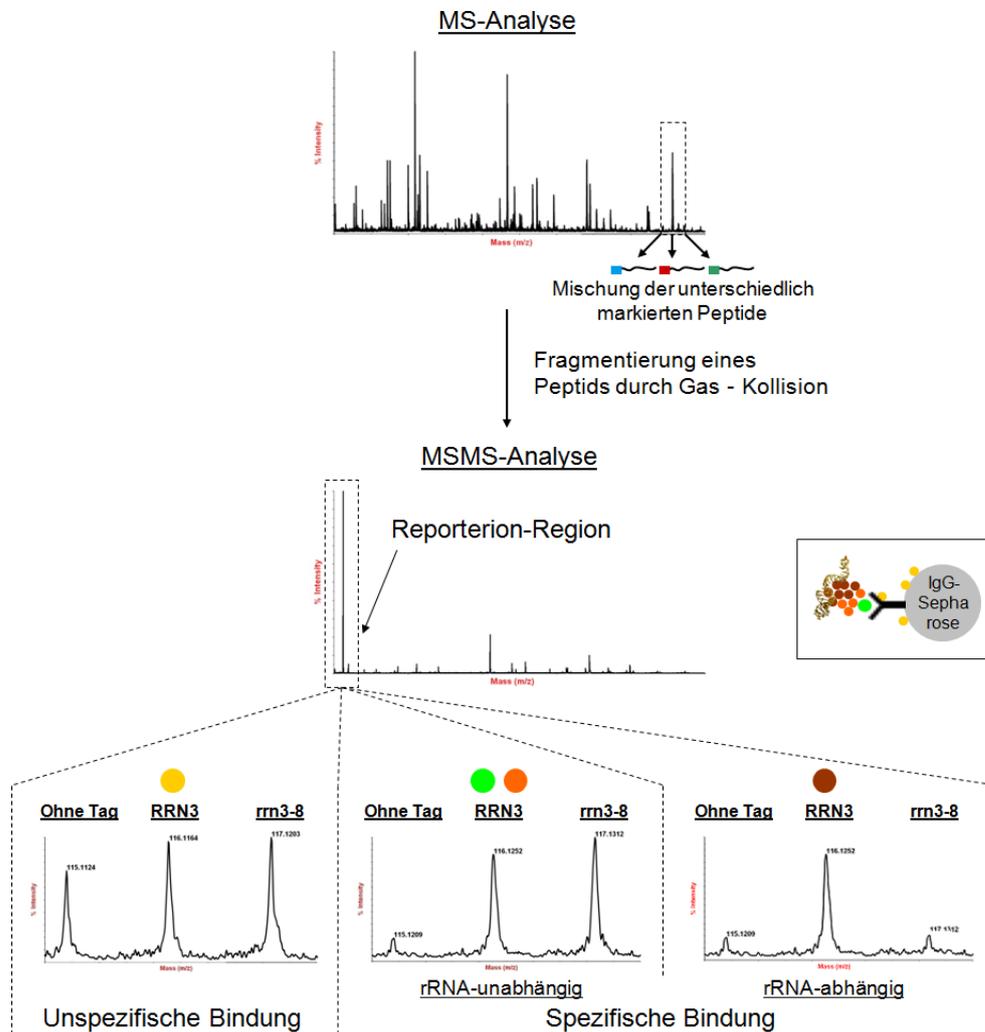


Abbildung 14: Schematische Darstellung der durchgeführten qMS-Analysen

Gezeigt ist ein typisches MS-Spektrum, bei dem jedes Signal eine Mischung aus Peptiden gleicher Sequenz aber mit den drei unterschiedlichen iTRAQ-Markierungen darstellt. Im MS/MS-Modus wurden ausgewählte Peptide durch Gaskollision fragmentiert, wobei sequenzspezifische Peptidfragmente entstanden. Anhand der gefundenen m/z -Verhältnisse konnte das jeweilige Protein durch Datenbanksuche identifiziert werden. Zusätzlich konnte im MS/MS-Modus die Freisetzung der iTRAQ-Reporterionen erreicht werden, die je nach Art der verwendeten Isotope als Signale bei 114, 115, 116 oder 117 Dalton erschienen und zur Quantifizierung der beobachteten Kореinigungen verwendet wurden.

Dabei traten drei verschiedene Möglichkeiten der Signalintensitäten auf. Waren bei allen drei Aufreinigungen die Signalintensitäten vergleichbar, wurde das entsprechende Protein als unspezifisch gebunden eingestuft (●). Bei spezifisch gebundenen Proteinen mit geringer Signalintensität des Reporterions des Wildtyps ohne Tag konnten zwei verschiedene Zustände beobachtet werden: Beim Köderprotein (●) und rRNA-unabhängig angereicherten Proteinen (●) waren die Signalintensitäten der Reporterionen des Wildtyps RRN3 und der *rrn3-8* Mutante vergleichbar, während bei rRNA-abhängig gereinigten Proteinen (●) das Reporterionensignal der *rrn3-8* Mutante deutlich geringere Intensität zeigte.

Zur Identifizierung der Peptide wurden die sechs höchsten Peptidsignale jedes Analysepunkts in einer Gaskollisionskammer weiter fragmentiert um die jeweiligen MS/MS-Spektren zu erhalten. Durch Vergleich mit theoretischen Massen tryptischer Peptidfragmente ließ sich die jeweilige Peptidsequenz und somit das entsprechende Protein mittels MASCOT Datenbanksuche in einer Hefedatenbank zuordnen. Es wurden wenn nicht anders angegeben nur Proteine, die durch das verwendete GPS Explorer Programm mit wenigstens zwei eindeutigen Peptiden eines C. I. (Confidential Intervalls) > 95% zugeordnet werden konnten, in die Untersuchung mit einbezogen.

Zusätzlich zur Sequenzinformation konnte im MS/MS-Modus die Freisetzung der iTRAQ-Reporterionen erreicht werden, welche den jeweiligen Peptiden aus den einzelnen Affinitätsreinigungen zugeordnet werden konnten. Diese Reporter erschienen, je nach Art der zur Synthese des Reagenzes verwendeten Isotope, als Signale bei 114, 115, 116 oder 117 Dalton. Da ihre Signalintensitäten direkt proportional zu der Menge des jeweiligen markierten Peptids in dem analysierten Peptidgemisch sind, wurden sie zur Quantifizierung der beobachteten Koreinigungen verwendet.

Dabei konnten drei verschiedene Möglichkeiten der Verteilung der Signalintensitäten der Reporterionen beobachtet werden. Bei unspezifisch gebundenen Proteinen waren für alle drei verwendeten iTRAQ-Reporter die Signalintensitäten vergleichbar. Bei geringer Signalintensität des Reporterions des unmarkierten Wildtyps wurde das Protein als spezifisch gebunden eingestuft. Dabei traten zwei verschiedene Zustände auf: Beim Köderprotein und rRNA-unabhängig angereicherten Proteinen waren die Signalintensitäten der Reporterionen des RRN3 Wildtyps und der *rrn3-8* Mutante vergleichbar, da die entsprechenden Proteine in beiden Affinitätsreinigungen angereichert werden konnten. Im Gegensatz dazu zeigte das Reporterionensignal der *rrn3-8* Mutante bei rRNA-abhängig gereinigten Proteinen eine deutlich geringere Intensität, da diese Proteine unter den gewählten Bedingungen des Abschaltens der rRNA-Neusynthese in der *rrn3-8* Mutante nicht kogereingt werden konnten (Abbildung 14). Zur genauen Einordnung der angereicherten Proteine wurden Verhältnisse der Signalintensitäten der Reporterionen berechnet und mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.2 Bestimmung von durch Affinitätsreinigung spezifisch angereicherten Proteinen im Vergleich zum unmarkierten Wildtypstamm

Die vorgestellte Methode ermöglichte es schließlich, die Proteinkomplexe, die mit Noc1p-TAP, Nop7p-TAP, Rio2p-TAP, Enp1p-TAP, Rix1p-TAP oder Arx1p-TAP angereichert werden konnten, zu analysieren. Alle gezeigten massenspektrometrischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Steffen Jakob durchgeführt und ausgewertet.

Um zu bestimmen, welche der kogereinigten Proteine in Wildtyp-Hefezellen spezifisch mit dem epitopmarkierten Faktor angereichert werden konnten, wurde zunächst für jedes zugeordnete Peptid das Verhältnis der Signalintensitäten der Reporterionen des Wildtyps RRN3, in dem das jeweilige Zielprotein die TAP–Markierung trägt, zum Wildtyp RRN3 ohne Epitopmarkierung bestimmt und der Mittelwert und die Standardabweichung für alle identifizierten Peptide eines Proteins berechnet.

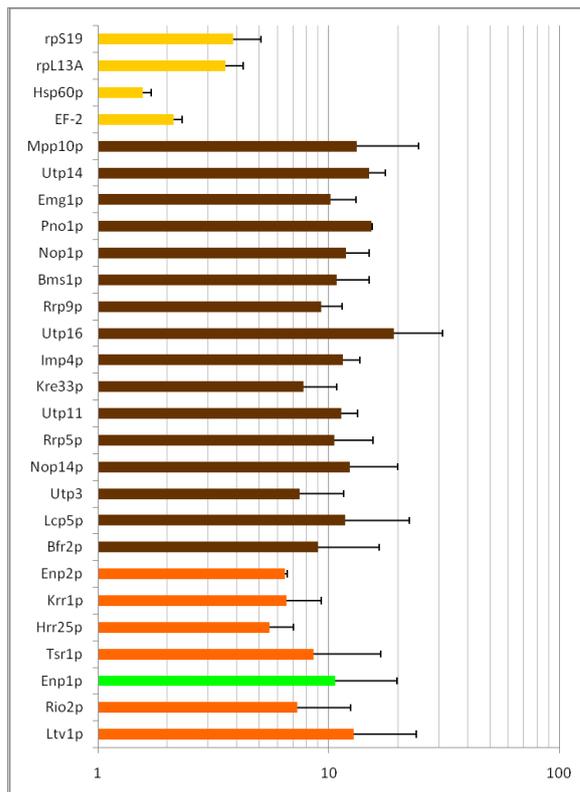


Abbildung 15: Ribosomale Proteine, Hitzeschockproteine und Translationsfaktoren zeigen unspezifische Interaktionen mit der verwendeten IgG–Sephrose.

Das dargestellte Diagramm zeigt die logarithmische Auftragung der Mittelwerte der ermittelten Verhältnisse der RRN3 Enp1p-TAP / RRN3 ohne Tag Reporterionensignale der identifizierten Ribosomenbiogenesefaktoren (■ prä-rRNA unabhängig, ■ prä-rRNA abhängig vgl. Abbildung 16), die mit dem Köderprotein (■) gereinigt werden konnten. Dabei zeigte sich für die meisten der Proteine eine über fünffache Anreicherung im Vergleich zum Wildtypstamm ohne Epitopmarkierung.

Zusätzlich wurden viele unspezifisch angereicherte ribosomale Proteine, Hitzeschockproteine und Translationsfaktoren identifiziert (■), deren iTRAQ–Verhältnisse zum größten Teil deutlich unter den Verhältnissen der spezifisch gereinigten Proteine lagen.

Die Standardabweichungen der ermittelten iTRAQ–Verhältnisse sind durch Fehlerbalken dargestellt ($p < 0,05$).

Das dargestellte Diagramm zeigt exemplarisch die logarithmische Auftragung der Mittelwerte der berechneten Verhältnisse aller Peptide der identifizierten Ribosomenbiogenesefaktoren, die mit dem Köderprotein Enp1p-TAP angereichert werden konnten (Abbildung 15). Dabei

wurden diese Faktoren im verwendeten RRN3 Enp1p-TAP Hefestamm spezifisch sowohl (prä-) rRNA unabhängig als auch (prä-) rRNA abhängig angereichert.

Zusätzlich sind beispielhaft unspezifisch angereicherte ribosomale Proteine, Hitzeschockproteine und Translationsfaktoren gezeigt. Diese Proteinklassen zeigen bekanntermaßen starke unspezifische Bindung an die verwendete Sepharosematrix (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). Bei dieser Analyse lagen die iTRAQ-Verhältnisse dieser unspezifisch angereicherten Proteine ($RRN3 \text{ Enp1p-TAP}/RRN3 < 3$) meist unter den Verhältnissen der spezifisch gereinigten Proteine ($RRN3 \text{ Enp1p-TAP}/RRN3 > 5$). Jedoch war der Unterschied in den berechneten iTRAQ-Verhältnissen deutlich geringer als erwartet.

Somit war eine Bestimmung der Spezifität der Anreicherung des identifizierten Proteins aufgrund des berechneten iTRAQ-Verhältnisses oft nicht möglich. Dies könnte daran liegen, dass bei generell geringer Signalintensität der Reporterionen das Hintergrundrauschen im MS/MS-Spektrum die Bestimmung der tatsächlich vorliegenden Anreicherung der Proteine erschwert. Deshalb wurden nur Proteine, für die bereits eine Rolle in der Ribosomenbiogenese gezeigt worden war, in weiterführende Analysen mit einbezogen.

Generell zeigten die durchgeführten Analysen eine hohe Abdeckung der bereits publizierten Interaktionspartner der untersuchten Köderproteine. Viele der bekannten Interaktionspartner konnten nur aufgrund der Zuordnung eines einzelnen Peptids identifiziert werden, da sie vermutlich in präribosomalen Partikeln stark unterrepräsentiert sind. Diese Proteine sind in den Diagrammen mit Ausnahme der Analyse der Noc1p-TAP Reinigung nicht dargestellt.

Aufgrund der relativ starken unspezifischen Bindung verschiedenster Proteine an die verwendete Affinitätsmatrix eignet sich die durchgeführte Methodik nur bedingt für die Identifizierung neuer Interaktionspartner. Sie kann jedoch für die semiquantitative Untersuchung von rRNA-unabhängigen Interaktionen im Vergleich zu rRNA-abhängigen Interaktionen verwendet werden.

2.2.3 Bestimmung von prä-rRNA-abhängig bzw. prä-rRNA-unabhängig kogereinigten Proteinen

Zur Bestimmung von prä-rRNA-unabhängigen im Vergleich zu prä-rRNA-abhängigen Interaktionen der untersuchten Köderproteine Noc1p-TAP, Nop7p-TAP, Rio2p-TAP, Enp1p-TAP, Rix1p-TAP oder Arx1p-TAP wurden für alle spezifisch angereicherten Faktoren die iTRAQ-Verhältnisse der Signalintensitäten der Reporterionen von *rrn3-8* X-TAP zu RRN3 X-TAP berechnet. Das ermittelte Verhältnis des Köderproteins wurde auf 1 gesetzt und alle Verhältnisse der spezifisch gereinigten Biogenesefaktoren und die berechneten Standardabweichungen wurden entsprechend normalisiert (Abbildung 16). Jede Reinigung

wurde mindestens zwei Mal durchgeführt und die massenspektrometrische Analyse wurde jeweils wiederholt. Gezeigt ist hier für jedes Köderprotein ein repräsentatives Experiment.

Bei einem iTRAQ-Verhältnis $rrn3-8 / RRN3 > 0,5$ wurde die Interaktion des identifizierten Proteins mit dem Köderprotein als unabhängig von rRNA-Neusynthese eingestuft. Bei einem Verhältnis zwischen 0,25 und 0,5 schien die Interaktion stärker beeinflusst, während Verhältnisse unter 0,25 eine Koreinigung, die stark von der Anwesenheit von rRNA-Neusynthese abhängt, repräsentierten. Nach Abschalten der rRNA-Neusynthese schien nur eine geringe Anzahl an Interaktionspartnern noch mit dem jeweiligen Köderprotein angereichert werden zu können.

Wie erwartet (Schäfer et al., 2003) zeigte der frühe Biogenesefaktor der kleinen ribosomalen Untereinheit Enp1p-TAP, der aus RRN3 Wildtypzellen gereinigt wurde, Assoziation an viele Proteine, die vermutlich Teile des SSU-Prozessoms darstellen. Dabei handelt es sich wie bereits beschrieben um einen Zusammenschluss von Faktoren, die an nukleolären Schritten der eukaryotischen Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit beteiligt sind und *in vivo* mit einem U3-snoRNP Komplex interagieren. Im Gegensatz zur Wildtypsituation war die Assoziation des Großteils dieser frühen Faktoren mit Enp1p-TAP nach Abschalten der rDNA-Transkription durch die Pol I stark reduziert ($rrn3-8/RRN3$ Verhältnis $< 0,25$). Dies lässt vermuten, dass die Koreinigung von Enp1p-TAP mit Komponenten des SSU-Prozessoms durch eine Interaktion mit prä-rRNA vermittelt wird. Die Assoziation von Enp1p-TAP an einige andere späte Faktoren schien jedoch kaum beeinflusst durch die Inaktivierung des rDNA-Transkriptionsfaktors Rrn3p ($rrn3-8/RRN3$ Verhältnis für Ltv1p 1,15, für Tsr1p 1,0; für Krr1p 0,53; für Hrr25p 0,73; für Rio2p 1,15). Offensichtlich stellen diese Proteine Teile reiner Proteinmodule dar, die mit Vorläuferpartikeln der kleinen ribosomalen Untereinheit interagieren können, deren Existenz *in vivo* jedoch unabhängig von rRNA-Neusynthese ist.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte kürzlich unter Hochsalzbedingungen ein Teilkomplex (Enp1p-Ltv1p-rpS3) aus Präribosomen extrahiert werden (Schäfer et al., 2006). Da ribosomale Proteine nicht Bestandteil der vorliegenden Untersuchung waren, konnte hier eine prä-rRNA unabhängige Anreicherung von rpS3 mit Enp1p-TAP nicht bestätigt werden.

Der Vergleich der Proteinzusammensetzung von mit Rio2p-TAP angereicherten Komplexen zwischen Zellen mit oder ohne ablaufende rRNA-Neusynthese bestätigte die Existenz und den vermutlichen Aufbau des identifizierten Proteinmoduls. Die Koreinigung von Enp1p ($rrn3-8/RRN3$ 0,97), Ltv1p ($rrn3-8/RRN3$ 1,3), Tsr1p ($rrn3-8/RRN3$ 0,94), Krr1p ($rrn3-8/RRN3$ 3,44), Hrr25 ($rrn3-8/RRN3$ 0,81, nur mit einem Peptid identifiziert) und zusätzlich von Dim1p ($rrn3-8/RRN3$ 0,82) an Rio2p-TAP wurde durch das Abschalten der Pol I Transkription kaum beeinflusst.

Interessanterweise konnten zwei weitere Ribosomenbiogenesefaktoren der kleinen ribosomalen Untereinheit, Nob1p und Pno1p/Dim2p, unter RRN3 Wildtyp Bedingungen wie

erwartet (Schäfer et al., 2003) mit Rio2-TAP angereichert werden. Sie zeigten jedoch nach Abschalten der rRNA-Synthese deutlich reduzierte Koreinigung. Dies lässt vermuten, dass die Anreicherung von Nob1p und Pno1p/Dim2p mit Rio2p-TAP von einer gemeinsamen Interaktion mit präribosomalen Partikeln, die neusynthetisierte prä-rRNA enthalten, abhängt.

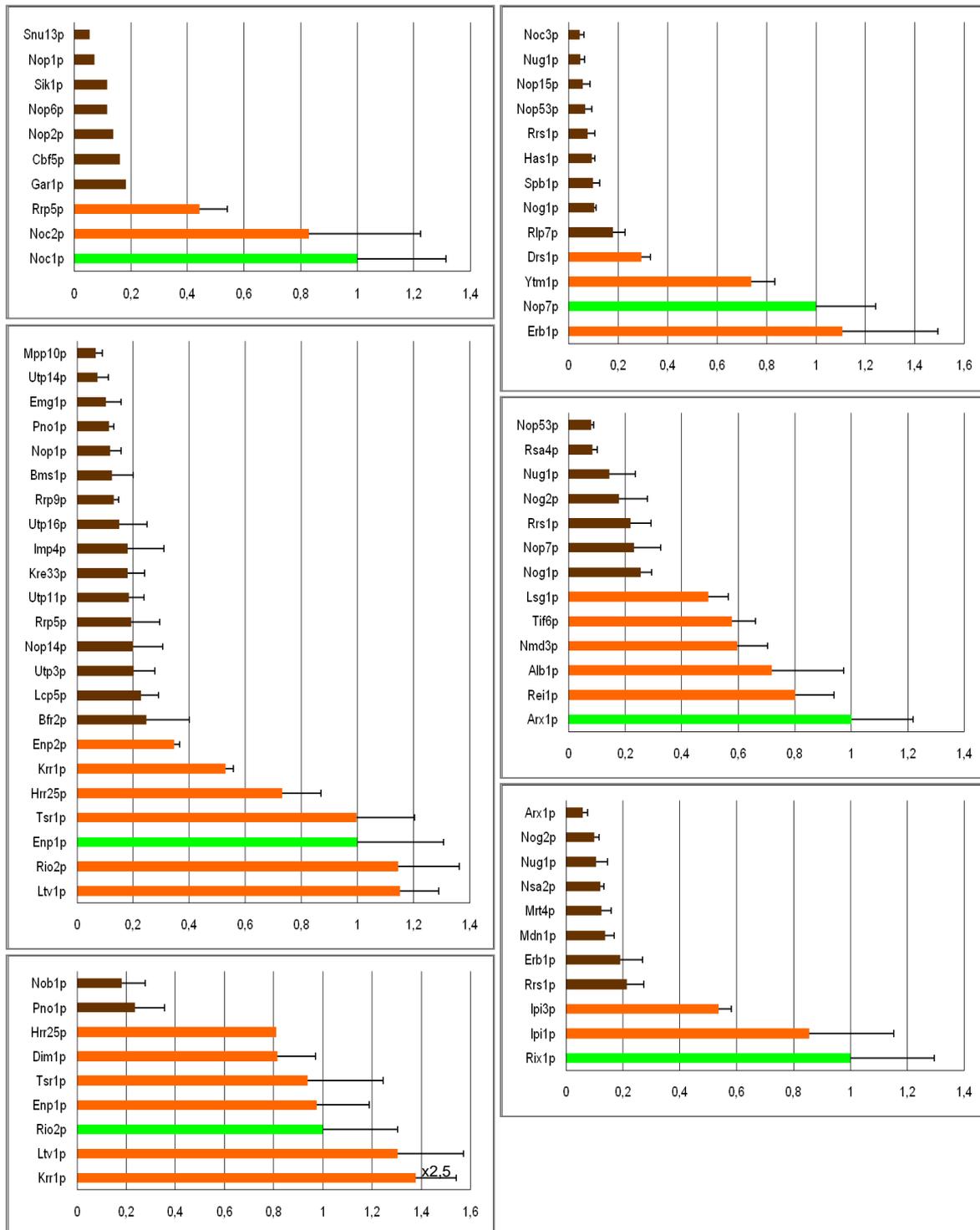


Abbildung 16: Der semiquantitative Vergleich der Affinitätsreinigungen in An- und Abwesenheit von rRNA-Neusynthese zeigt prä-rRNA-unabhängige Interaktionen der Köderproteine mit 2 bis 6 weiteren Ribosomenbiogenesefaktoren.

Die dargestellten Diagramme zeigen den Mittelwert der ermittelten Verhältnisse der *rrn3-8* X-TAP / RRN3 X-TAP iTRAQ-Signale der identifizierten Ribosomenbiogenesefaktoren, die mit den jeweiligen Köderproteinen (■) angereichert werden konnten. Das Verhältnis des epitopmarkierten Proteins wurde auf 1 gesetzt und diejenigen der kogereinigten Faktoren entsprechend normalisiert. Die durch Fehlerbalken dargestellten Standardabweichungen wurden analog bearbeitet ($p < 0,05$).

Bei zusätzlich angereicherten Proteinen wurde bei einem iTRAQ-Verhältnis *rrn3-8*/RRN3 $> 0,5$ die Interaktion des identifizierten Proteins mit dem Köderprotein als unabhängig von rRNA-Neusynthese eingestuft (■). Bei einem Verhältnis zwischen 0,25 und 0,5 schien die Interaktion stärker beeinflusst (■), während Verhältnisse unter 0,25 eine Interaktion, die stark von der Anwesenheit von rRNA Neusynthese abhängt, repräsentierten (■).

Das Verhältnis und die Standardabweichung von Krr1p in der Rio2p-TAP Aufreinigung wurden aus Darstellungsgründen durch 2,5 geteilt aufgetragen.

Mit der vorgestellten Methode wurden auch die Koreinigungen der Biogenesefaktoren der großen ribosomalen Untereinheit Noc1p-TAP, Nop7p-TAP und Rix1p-TAP *in vivo* in Abwesenheit von rRNA-Neusynthese untersucht. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass unter Bedingungen, die *in vivo* oder *ex vivo* zu partiellem Zerfallen von präribosomalen Partikeln führen, Noc1p in einem Subkomplex mit Noc2p gereinigt werden konnte (Milkereit et al., 2001), Nop7p in einem Komplex mit Erb1p und Ytm1p vorlag (Miles et al., 2005) und Rix1p in einem Komplex mit Ipi1p und Ipi3p (Galani et al., 2004). Der experimentelle Ansatz in der vorliegenden Untersuchung lässt vermuten, dass diese drei Proteinkomplexe sich auch *in vivo* unabhängig von der Anwesenheit und Neusynthese von prä-rRNA bilden können (Abbildung 16). Zusätzlich scheint auch eine signifikante Restinteraktion von Rrp5p mit dem Noc1p/Noc2p-Komplex (*rrn3-8*/RRN3 0,44) und der nukleolären Helikase Drs1p mit dem Nop7p-Komplex (*rrn3-8*/RRN3 0,29) vorzuliegen. Dies deutet darauf hin, dass diese Proteine nach Abschalten der rRNA-Neusynthese ebenfalls Bestandteile der identifizierten Proteinmodule darstellen. Jedoch scheint eine Wechselwirkung dieser Proteine mit den bisher publizierten Komplexen durch Anwesenheit von prä-rRNA und den Einbau in präribosomale Partikel stabilisiert zu werden.

Die rRNA-unabhängige Koreinigung von Noc2p und Rrp5p mit Noc1p-TAP auch nach Abschalten der Neusynthese von rRNA konnte auch mit Westernblotanalysen (Abbildung 17 A, vgl. Spuren 6 und 8) und Silbergefärbung nach vollständiger zweistufiger Reinigung von Noc1p über das TAP-Epitop (Abbildung 17 B) bestätigt werden.

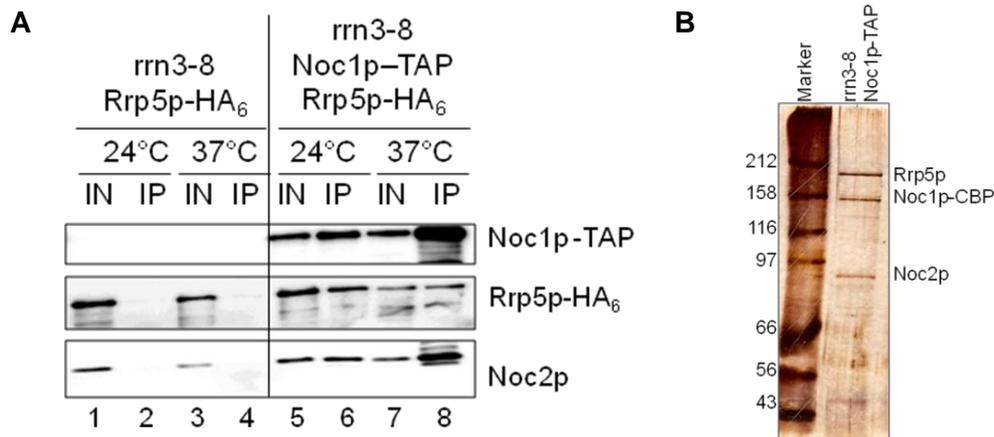


Abbildung 17: Die prä-rRNA-unabhängige Koreinigung von Noc2p und Rrp5p mit Noc1p-TAP kann auch durch Westernblotanalyse und Silbergel bestätigt werden.

(A) Gesamtzellextrakte (IN) und Affinitätsreinigungen (IP) von Noc1p-TAP wurden im Westernblot analysiert. Der Proteingehalt des epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktors Noc1p-TAP und zusätzlich von Rrp5p-HA₆ und von Noc2p wurde in Hefestämmen mit *rrn3-8* Hintergrund bei permissiver (24°C) und bei restriktiver (3h 37°C) Temperatur untersucht. Eine unspezifische Bindung von Rrp5p-HA₆ und Noc2p an die verwendete IgG-Sepharose wurde durch parallele Analyse eines *rrn3-8* Stamms ohne TAP-Markierung ausgeschlossen. Dabei wurde im Westernblot zur Detektion des ProteinA-Anteils des TAP-Epitops PAP-Visualisierungsreagenz eingesetzt. Zum Nachweis von Rrp5p-HA₆ wurde ein anti-HA Antikörper und zur Detektion von Noc2p ein proteinspezifischer Antikörper verwendet. Bei jedem Reinigungsansatz bedeuten gleiche Signalintensitäten in den IN und IP Spuren eine Reinigungseffizienz von 1%.

(B) Eine zweistufige Reinigung über beide Epitope des TAP-Tags von Noc1p-TAP im *rrn3-8* Hefestamm bei restriktiver Temperatur wurde im Silbergel analysiert. Dazu wurde das Eluat der Calmodulinaffinitätsreinigung mit TCA gefällt und auf eine 7,5% SDS-PAGE aufgetragen. Im Eluat enthaltenes Protein wurde mit Silbernitrat angefärbt und mit einem geeigneten Molekulargewichtsstandard verglichen.

Die durchgeführte semiquantitative massenspektrometrische Analyse von Arx1p-TAP Aufreinigungen aus Extrakten von Zellen mit oder ohne ablaufende rRNA-Synthese zeigte, dass signifikante Mengen an Rei1p (*rrn3-8*/RRN3 0,81), Alb1p (*rrn3-8*/RRN3 0,67), Lsg1p (*rrn3-8*/RRN3 0,5), Tif6p (*rrn3-8*/RRN3 0,63) und Nmd3p (*rrn3-8*/RRN3 V 0,55) mit Arx1p-TAP angereichert werden konnten. Diese Koreinigung scheint dabei unabhängig von der Anwesenheit von neu synthetisierten großen ribosomalen Untereinheiten zu sein. Die Beobachtung, dass Arx1p-TAP auch nach Abschalten von rRNA-Neusynthese eine signifikante Interaktion mit reifer 25S rRNA zeigte (Abbildung 12 A/B), lässt vermuten, dass Arx1p-TAP nicht nur Assoziation an neu synthetisierte Untereinheiten zeigt. Vielmehr scheint es auch an reife 60S ribosomale Untereinheiten, die durch die Termination der Translation aus Polysomen freigesetzt werden, binden zu können. Entsprechend könnte die Koreinigung von Rei1p, Alb1p, Lsg1p, Tif6p und Nmd3p mit Arx1p-TAP (1) aufgrund einer Präribosomen-unabhängigen Interaktion mit Arx1p-TAP und/oder (2) aufgrund einer gemeinsamen Interaktion mit reifen 60S ribosomalen Untereinheiten unabhängig von einer direkten Interaktion mit Arx1p-TAP vorliegen.

Die mögliche Bedeutung dieser Interaktionen im Hinblick auf Translationsregulation und Recycling später LSU Biogenesefaktoren wird in der Diskussion ausführlicher behandelt.

Mit den durchgeführten qMS-Analysen konnte die Existenz von reinen Proteinmodulen von Ribosomenbiogenesefaktoren unabhängig von ablaufender Ribosomenbiosynthese *in vivo* nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass diese Komplexe in der Hefezelle als funktionelle Einheiten vorliegen und mit präribosomalen Partikeln als vorgeformte Komplexe interagieren können oder aus präribosomalen Partikeln im Laufe der Ribosomenreifung als Proteinkomplexe freigesetzt werden können.

2.3 *In vitro* Expression von identifizierten Proteinmodulen in *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen

2.3.1 Verwendung des Multibac-Systems zur baculoviralen Expression von Proteinkomplexen

Die Interaktionen innerhalb eines in dieser Arbeit identifizierten Komplexes, des Nop7p-Erb1p-Ytm1p-Komplexes, konnten bereits *in vitro* bestätigt und detailliert untersucht werden (Miles et al., 2005; Tang et al., 2008). Zur Bestätigung der rRNA-unabhängigen Interaktionen innerhalb weiterer hier identifizierter Proteinmodule und zur Expression der Komplexe für anschließende funktionelle und strukturelle Untersuchungen wurde das Multibac-System zur baculoviralen Expression mehrerer Komponenten eines Komplexes in Insektenzellen verwendet (Berger et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006, 2007).

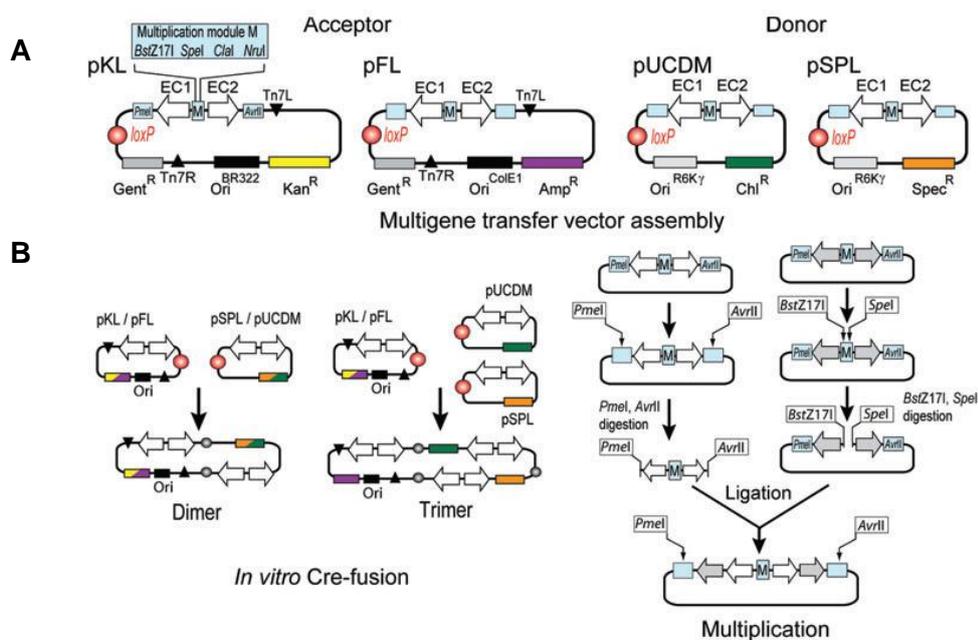


Abbildung 18: Prinzip des Multibac-Systems.

(A) Gezeigt sind die Vektorkarten der zur Verfügung stehenden Multibac-Vektoren. Die beiden Akzeptor-Plasmide pFL und pKL enthalten neben zwei Expressionskassetten (EC1 und 2) spezifische Resistenzgene und die beiden Rekombinationsstellen loxP (●) und Tn7 (▲). Die Vektoren pUCDM und pSPL sind ähnlich aufgebaut, enthalten jedoch keine Tn7-Stellen.

(B) Die Fusion eines Akzeptor-Plasmids (pFL oder pKL) mit 1-2 Donor-Plasmiden (pUCDM und/oder pSPL) erfolgt über *in vitro* Cre-Rekombination an den loxP-Stellen. Die entstandenen Plasmide enthalten somit mehrere Resistenzgene und bis zu 6 Expressionskassetten. Sie können über die Tn7 Rekombinationsstellen komplett ins Baculovirus-Genom integriert werden.

Eine zusätzliche Erweiterungsmöglichkeit liefert das bei jedem Plasmid zwischen beiden Expressionskassetten liegende Multiplikationsmodul. Dabei können beide Expressionskassetten über die Restriktionsenzyme PmeI/AvrII aus einem Vektor geschnitten werden und über kompatible Enden in ein zweites, BstZ171/Spel oder NruI/Spel verdautes, Plasmid ligiert werden. Dadurch erhält man ein Plasmid mit vier Expressionskassetten, das ebenfalls zur *in vitro* Cre-Fusion verwendet werden kann. Aus (Fitzgerald et al., 2006).

Dieses System eignet sich im Gegensatz zur rekombinanten Proteinexpression in prokaryotischen *E. coli* Zellen sehr gut für die lösliche Expression großer eukaryotischer Proteine. Die baculovirale Expression von Proteinkomplexen mit mehreren Untereinheiten in Insektenzellen könnte auch durch Kotransfektion mehrerer Einzelviren erreicht werden. Jedoch kann man durch die Konstruktion von Viren, die die Gene aller gewünschten Komponenten eines Komplexes enthalten, sowohl die Reproduzierbarkeit als auch die Ausbeute der Expression erhöhen (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

Das in Abbildung 18 dargestellte und im Folgenden experimentbezogen beschriebene Multibac-System stellt eine Möglichkeit der Generierung derartiger Bacmide und Baculoviren dar.

In dieser Arbeit stand die Untersuchung der Interaktionen innerhalb des identifizierten Rio2p-Enp1p-Moduls und der Interaktionen von Noc1p-2p-3p untereinander und mit Rrp5p im Vordergrund. Dazu wurden mit Hilfe von Kristin Hergert die Gene aller gewünschten Komponenten jeweils auf einzelne Plasmide (pFL, pUCDM, pSPL) und schließlich unter Verwendung des Multiplikationsmoduls und der *in vitro*-Rekombinations-Option der Multibac-Plasmide auf ein gemeinsames Plasmid kloniert (Abbildung 18). Dieses Plasmid wurde in DH10Bac-eYFP *E. coli* Zellen transformiert und mittels Tn7-Transposition in das enthaltene Bacmid rekombiniert. Entsprechend enthielten die generierten Bacmide (4.2.3.1.4, 4.2.3.2.2) und nach Transfektion in Insektenzellen gebildeten Baculoviren alle Gene des zu exprimierenden Komplexes.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kombinationen der Komplexkomponenten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Noc1p-2p-3p und Rrp5p wurden Plasmide, die die Gene der potentiellen Dimere Noc1p-2p und Noc2p-3p enthalten, konstruiert. Weiterhin wurde ein Plasmid mit den Genen für Noc1p-2p-3p durch *in vitro* Cre-Rekombination hergestellt, um einen Eindruck zu erhalten, welcher der publizierten Komplexe (Milkereit et al., 2001) sich präferentiell ausbildet. Auch die Gene für das gesamte identifizierte Proteinmodul aus Noc1p, -2p und Rrp5p wurden auf ein gemeinsames Plasmid kloniert (Tabelle 1 A). Bei allen untersuchten Kombinationen wurde Noc2p durch Anfügen des Flag-Epitops und Rrp5p durch Anfügen des 6xHis-Epitops N-terminal markiert, wodurch die Reinigung der Proteinkomplexe nach der Expression in SF21 Insektenzellen ermöglicht wurde.

Da eine Expression des gesamten Rio2p-Enp1p-Proteinmoduls erheblichen Klonierungsaufwand bedeutet hätte, für den in Rahmen dieser Arbeit keine Zeit blieb, wurden verschiedene Plasmide, mit Kombinationen von 3 – 4 Genen der zu untersuchenden Komponenten des Proteinkomplexes, konstruiert. Dabei war unklar, bei welcher Kombination

eine Koreinigung der koexprimierten Proteine mit den N-terminal markierten Proteinen Flag-Rio2p und/oder 6xHis-Enp1p zu erwarten war (Tabelle 1 B).

Tabelle 1: Untersuchte Kombinationen der baculoviralen Expression des (A) Noc1-2-3p/Rrp5p-Proteinkomplexes und des (B) Rio2p-Enp1p-Moduls in SF21 Zellen

A

Protein	Zielvektor	Analysierte Kombinationen				
Noc3p	pSPL		pFL-Flag-TEV-Noc2p + pSPL-Noc3p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)		pFL-Flag-TEV-Noc2p + pSPL-Noc3p + pUCDM-Noc1p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)	
Noc2p	pFL-Flag-TEV	pFL-Flag-TEV-Noc2p		pFL-Flag-TEV-Noc2p + pUCDM-Noc1p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)		pFL-Flag-TEV-Noc2p + pSPL-6xHis-Rrp5p + pUCDM-Noc1p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)
Noc1p	pUCDM					
Rrp5p	pSPL-6xHis					

B

Protein	Zielvektor	Analysierte Kombinationen			
Dim1p	pUCDM			pFL-Flag-TEV-Rio2p + pSPL-6xHis-Enp1p + pUCDM-Dim1p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)	
Enp1p	pSPL-6xHis				
Rio2p	pFL-Flag-TEV	pFL-Flag-TEV-Rio2p			
Ltv1p	pSPL		pFL-Flag-TEV-Rio2p + pSPL-Ltv1-Tsr1p (Multiplikationsmodul) + pUCDM-Krr1p (<i>In vitro</i> -Cre-Fusion)		
Tsr1p	pSPL				
Krr1p	pUCDM				

Die kombinierten Plasmide wurden durch Tn7-Transposition in ein Bacmid eingefügt, das bereits über die loxP-Rekombinationsstelle mit dem Gen für das gelb fluoreszierende Protein eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) (Ormö et al., 1996) versehen wurde. Anhand der Expression dieses Proteins und der dadurch entstehenden Fluoreszenz transfizierter und infizierter Zellen lässt sich so die Expression der im Bacmid enthaltenen Gene verfolgen.

Das entstandene Bacmid wurde durch blau/weiß-Selektion ermittelt, gereinigt und zur Transfektion von Insektenzellen verwendet.

2.3.2 Transfektionen und Infektionen von SF21 Zellen

Zur Transfektion von SF21 Zellen wurden logarithmisch wachsende Zellen verwendet. Dabei wurde die zu transfizierende Bacmid-DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel mittels Zellfektin-Reagenz komplexiert und in die Zielzellen als Liposomen aufgenommen. Daraufhin wurden spezifische Viren generiert, die in nachfolgenden Infektionszyklen amplifiziert und als hochtitrige Virus-Lösung zur Expression der gewünschten Proteinkomplexe eingesetzt wurden.

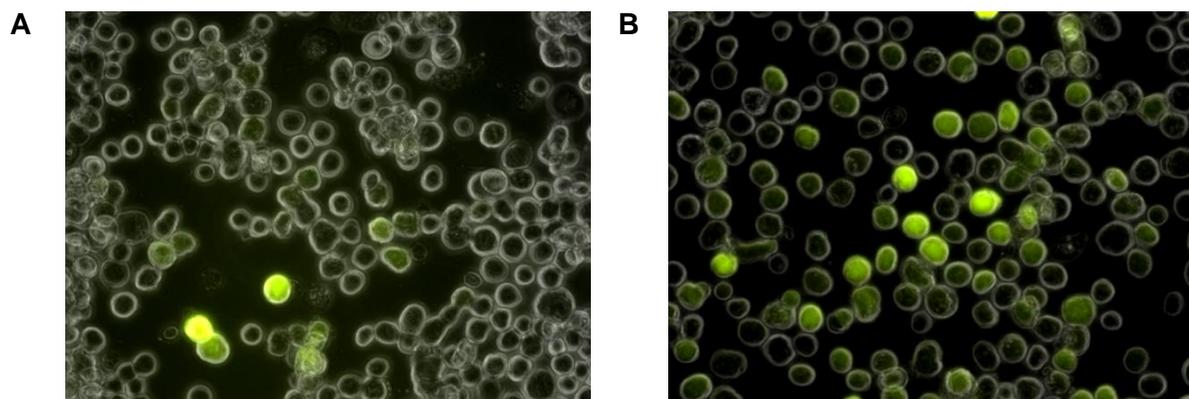


Abbildung 19: Nach erfolgreicher Transfektion oder Infektion zeigen die SF21 Insektenzellen Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität abhängig von der Effizienz der durchgeführten Transfektion/Infektion.

Gezeigt sind **(A)** transfizierte und **(B)** infizierte Insektenzellen im differentiellen Interferenzkontrast in einer 20fachen Vergrößerung. Zusätzlich wurde ein entsprechender Filter zur Detektion der Fluoreszenz des eYFP-Proteins verwendet.

Durch Verwendung des beschriebenen eYFP-Bacmids konnte die Effizienz der Proteinexpression und damit der Transfektion/Infektion verfolgt werden (Abbildung 19).

Bei den durchgeführten Transfektionen zeigten ca. 5 – 10 % der Zellen deutliche Fluoreszenz und hatten entsprechend die transfizierte Bacmid-DNA ins Genom integriert (Abbildung 19 A). Bei Infektionen mit –durch Transfektionen– erhaltenen Viruslösungen lag der Anteil fluoreszierender, infizierter Zellen nach der verwendeten Inkubationszeit von 48 h meist bei 90 – 100 % (Abbildung 19 B).

Da die Infektion der Insektenzellen zur Lyse der infizierten Wirtszellen führt, musste darauf geachtet werden, dass trotz effizienter Infektion der Großteil der Zellen noch intakt war, um optimale Expressionsraten der gewünschten Proteinkomplexe zu erreichen.

2.3.3 Analyse der Noc1-2-3p / Rrp5p Proteinkomplexe

Zunächst sollten im Rahmen dieser Arbeit die publizierten Proteinkomplexe von Noc1p-2p und Noc2p-3p (Milkereit et al., 2001) durch heterologe Expression in SF21 Zellen rekonstruiert werden. Beide Komplexe konnten dabei exprimiert und die Komponenten in scheinbar stöchiometrischen Mengen über das Flag-Epitop an Noc2p aufgereinigt, mittels Flag-Peptid nativ eluiert und massenspektrometrisch identifiziert werden (Abbildung 20, Spuren 13 und 20).

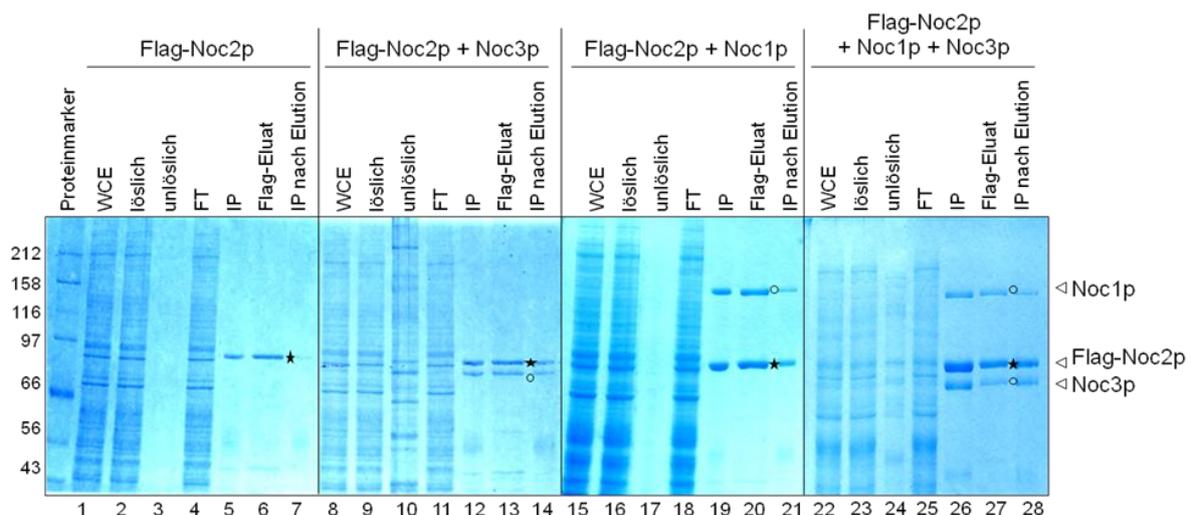


Abbildung 20: Eine direkte Interaktion von Noc1p und auch von Noc3p mit Flag-Noc2p konnte durch heterologe Koexpression und Reinigung der Komplexe über das Flag-Epitop an Noc2p nachgewiesen werden.

Gezeigt sind Coomassie-Gele der durchgeführten Aufreinigungen von Flag-Noc2p (★) über M2-Flag-Agarose nach Koexpression der angegebenen Komplexkomponenten (○) in Insektenzellen. Von Gesamtzellextrakt (WCE; Spuren 1, 8, 15, 22), löslicher Fraktion (Spuren 2, 9, 16, 23), unlöslicher Fraktion (Spuren 3, 10, 17, 24) und Durchfluss der Affinitätsreinigungen (FT; Spuren 4, 11, 18, 25) wurden jeweils 0,05%, von Affinitätsreinigungen (IP; Spuren 5, 12, 19, 26), Flag-Eluat (Spuren 6, 13, 20, 27) und Affinitätsreinigungen nach Elution (Spuren 7, 14, 21, 28) jeweils 5% einer Aufreinigung aus 25×10^6 Zellen auf 10% SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Um erste Hinweise zu erhalten, ob Unterschiede in der Affinität des gemeinsamen Interaktionspartners Noc2p zu Noc1p oder Noc3p bestehen, wurden diese drei Proteine zusätzlich gemeinsam exprimiert und die Affinitätsreinigung von Flag-Noc2p im Coomassie-Gel analysiert (Abbildung 20, Spuren 22-28). Da Noc1p und Noc3p in vergleichbarer Menge kogereinigt werden konnten (Abbildung 20, Spur 26), schien Noc2p keine deutlich erhöhte Affinität zu einem der beiden Interaktionspartner zu zeigen. Dies setzt natürlich vergleichbare Expressionslevel der beiden Interaktionspartner Noc1p und Noc3p voraus.

Der erste Proteinkomplex, der mit dem vorgestellten System in SF21 Zellen heterolog exprimiert werden konnte, war das potentielle Dimer der 60S Biogenesefaktoren Noc2p und Noc3p (Abbildung 20, Spur 13). Dies ermöglichte unter anderem die Analyse der Salzstabilität dieses Komplexes. Dazu wurde Flag-Noc2p alleine oder im Komplex mit Noc3p aus infizierten Insektenzellen unter Niedrigsalzbedingungen mit 0,1 M NaCl gereinigt und an M2-Flag-Agarose gebunden (Abbildung 21, Spuren 3 und 15). Die nach den Waschschrritten mit steigenden Konzentrationen an NaCl (0,2 M – 1,0 M) weiterhin an der Agarose gebundene Proteinmenge wurde ebenfalls im Coomassie-Gel analysiert (Abbildung 21, Spuren 4-12 und 16-24). Dabei zeigte sich, dass sich das Verhältnis an kogereinigtem Noc3p zu gebundenem Flag-Noc2p bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,5 M kaum änderte. Der Komplex scheint somit im Gegensatz zu früheren Untersuchungen der Interaktionen *in vitro* exprimierter Noc-Proteine (Daten nicht gezeigt) vergleichbare Stabilität zum in Hefezellen *in vivo* vorliegenden Komplex (stabil bei 200 mM NH_4SO_4 , (Milkereit et al., 2001)) zu zeigen.

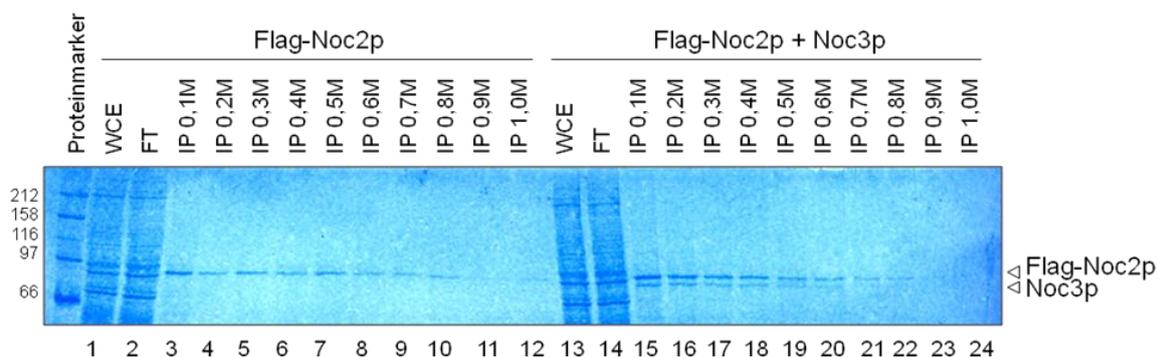


Abbildung 21: Die Interaktion zwischen Noc2p und Noc3p scheint bis zu einer Salzkonzentration von mindestens 0,5 M NaCl stabil zu sein.

Gezeigt ist ein Coomassie-Gel der durchgeführten Aufreinigungen von Flag-Noc2p alleine oder im Komplex mit Noc3p über M2-Flag-Agarose nach Koexpression in Insektenzellen.

Von Gesamtzellextrakt (WCE; Spuren 1 und 13) und Durchfluss der Affinitätsreinigungen (FT; Spuren 2 und 14) wurden jeweils 0,05%; von Affinitätsreinigungen (IP; Spuren 3 und 15) und den Aufreinigungen nach Waschschrritten mit den angegebenen steigenden Konzentrationen an NaCl (Spuren 4-12 und 16-24) jeweils 5% einer Gesamtreinigung aus 40×10^6 Zellen auf einem 10% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Die genaue Zusammensetzung des Noc2-3p-Komplexes war aufgrund der vorliegenden Ergebnisse noch unklar. Deshalb wurden Aufreinigungen von Flag-Noc2p alleine und von Flag-Noc2p im Komplex mit Noc3p zur Größenbestimmung auf verschiedenen Gelfiltrationssäulen aufgetrennt (Abbildung 22). Sowohl der Komplex aus Flag-Noc2p mit Noc3p als auch Flag-Noc2p alleine erschienen dabei bei einer Größe von ~ 200-300 kDa. Dies deutet darauf hin, dass der Komplex aus Flag-Noc2p und Noc3p tatsächlich als

Heterodimer (berechnete Größe: ~ 160 kDa) vorliegen könnte. Flag-Noc2p alleine jedoch schien sogar größere Komplexe auszubilden, was auf eine Oligomerisierung des Proteins in Abwesenheit der bevorzugten Interaktionspartner zurückzuführen sein könnte. Dies könnte durch Verwendung von Gelfiltrationssäulen mit einem für diese Analyse geeigneteren Auftrennungsbereich genauer verifiziert werden.

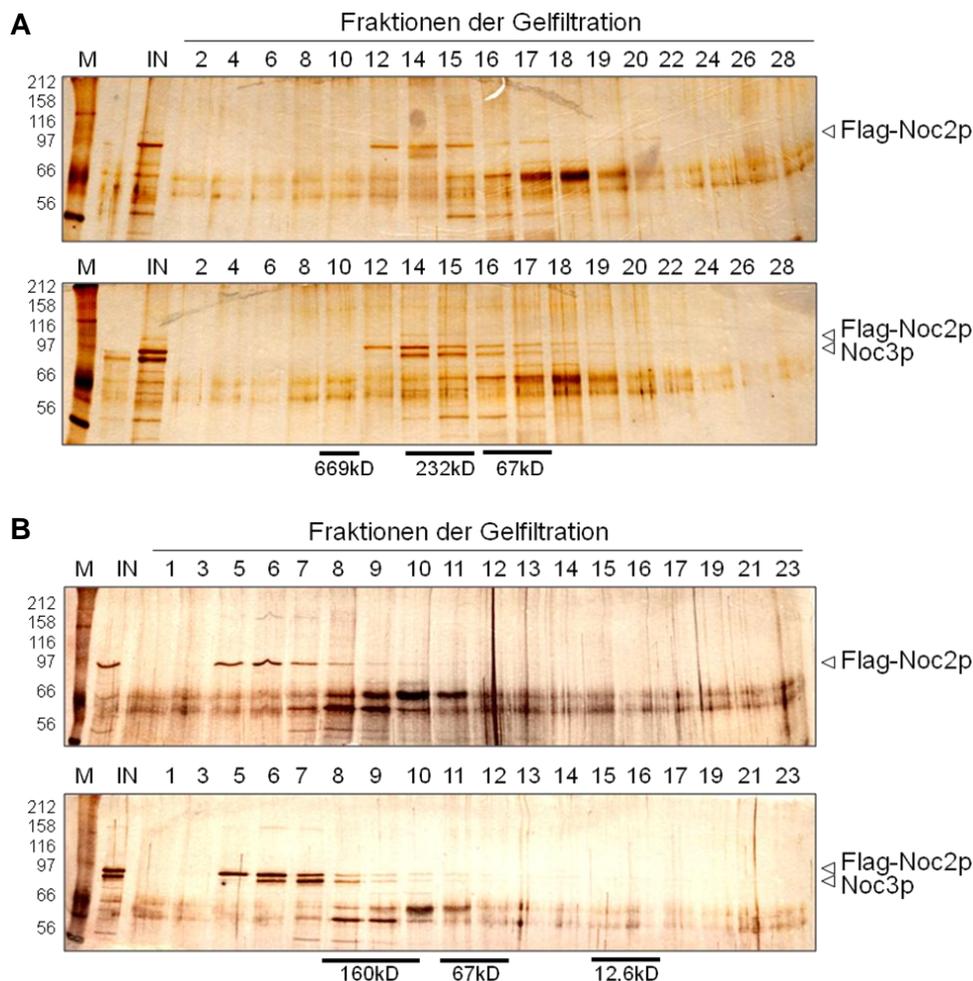


Abbildung 22: Der Komplex aus Flag-Noc2p und Noc3p - aber auch Flag-Noc2p - zeigen in Gelfiltrationsanalysen eine apparente Größe von ~ 200-300 kDa.

Aufreinigungen von Flag-Noc2p alleine oder im Komplex mit Noc3p über M2-Flag-Agarose (IN) wurden auf einer **(A)** Superose 6- oder **(B)** Superose 12-Gelfiltrationssäule aufgetrennt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf einem 10% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Komplexe erfolgte anhand geeigneter Markerproteine mit den angegebenen Molekulargewichten.

Auch der durch Reinigung von Noc1p-TAP aus Gesamtzellextrakten des *rrn3-8* Hefestamms identifizierte prä-rRNA unabhängige Komplex aus Noc1p, Noc2p und Rrp5p (vgl. 2.2.3) sollte vollständig *in vitro* rekonstruiert werden. Bei der Reinigung von Flag-Noc2p über M2-Flag-Agarose nach Expression der drei Komplexkomponenten konnten neben dem

Köderprotein die beiden anderen Proteine kogereinigt werden (Abbildung 23, Spur 7). Dabei konnte Noc1p sehr effizient und 6xHis-Rrp5p nur schwach angereichert werden. Dabei ist unklar, ob die weniger effiziente Koreinigung von 6xHis-Rrp5p durch geringere Expressionslevel dieses sehr großen Proteins oder durch tatsächlich substöchiometrische Interaktion mit Noc1p zustande kam.

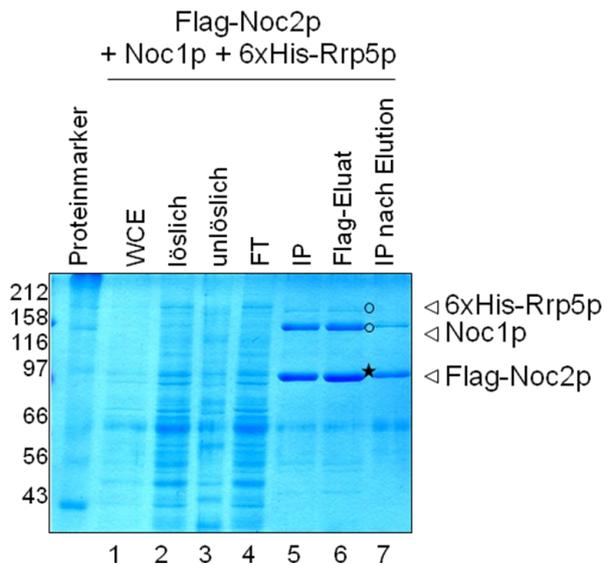


Abbildung 23: Die Bildung eines rRNA-unabhängigen Komplexes von Noc1p, 6xHis-Rrp5p und Flag-Noc2p konnte durch Reinigung über das Flag-Epitop an Noc2p *in vitro* bestätigt werden.

Gezeigt ist ein Coomassie-Gel der durchgeführten Aufreinigung von Flag-Noc2p über M2-Flag-Agarose (★) nach Expression der angegebenen Komplexkomponenten (○). Von Gesamtzellextrakt (WCE; Spur 1), löslicher Fraktion (Spur 2), unlöslicher Fraktion (Spur 3) und Durchfluss der Affinitätsreinigung (FT; Spur 4) wurden jeweils 0,05%, von der Affinitätsreinigung (IP; Spur 5), Flag-Eluat (Spur 6) und Affinitätsreinigung nach Elution (Spur 7) jeweils 5% einer Aufreinigung aus 25×10^6 Zellen auf einem 10% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Der Großteil der beschriebenen Komplexe konnte jedoch sehr effizient exprimiert und gereinigt werden, wobei dabei deren Komponenten aufgrund der Intensitäten der Coomassie-Färbung der jeweiligen Proteinbanden meist in stöchiometrischen Verhältnissen vorzuliegen scheinen.

Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass Noc1p und Rrp5p auch in Abwesenheit von Noc2p *in vitro* eine stabile Interaktion ausbilden können (Daten nicht gezeigt). Bei der Zusammensetzung des gesamten prä-rRNA unabhängigen Komplexes aus Noc1p, Noc2p und Rrp5p war jedoch noch unklar, ob die vorliegende Koreinigung von Noc2p und Rrp5p ebenfalls durch eine direkte Interaktion oder über eine gemeinsame Interaktion mit Noc1p vermittelt wird. Deshalb wurde Rrp5p-TAP aus Wildtyp Hefezellen

unter Hochsalzbedingungen gereinigt, wobei endogen assoziiertes Noc1p und Noc2p nicht mit angereichert wurde (Abbildung 24, Spur 4). Nach Zugabe von Gesamtzellextrakten von SF21 Zellen mit exprimierten Flag-Noc2p, Flag-Noc2p im Komplex mit Noc1p oder Flag-Noc2p im Komplex mit Noc3p konnte nur in Anwesenheit von Noc1p eine Bindung von Flag-Noc2p an Rrp5p-TAP beobachtet werden (Abbildung 24, vgl. Spuren 15, 17 und 19).

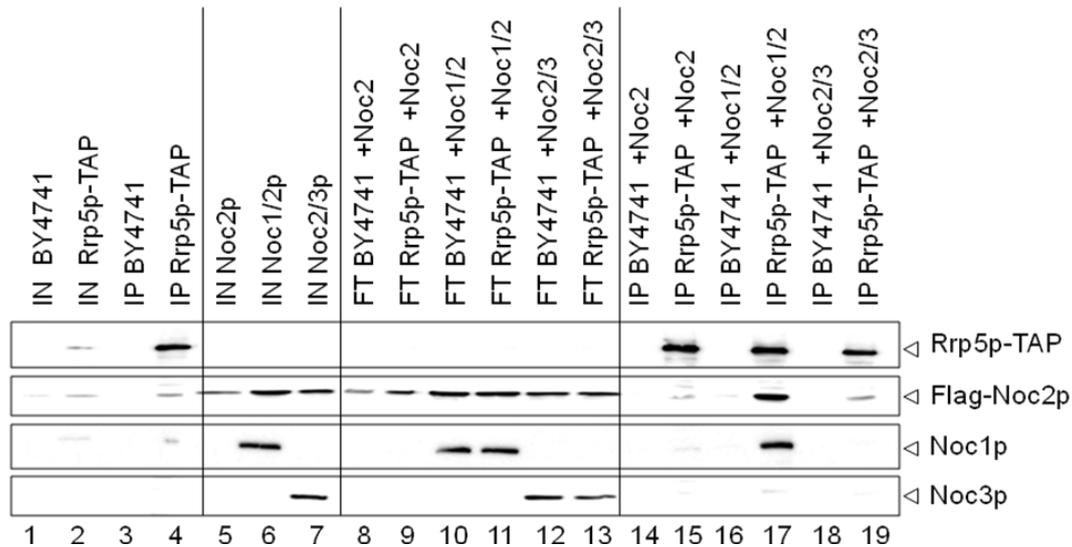


Abbildung 24: Flag-Noc2p bindet nur im Komplex mit Noc1p an gereinigtes Rrp5p-TAP.

Gezeigt sind Westernblots der durchgeführten Aufreinigung von Rrp5p-TAP aus Hefezellen über IgG-Sepharose unter Hochsalzbedingungen (Spuren 2 und 4). Zur Untersuchung unspezifischer Bindungen wurde auch der Wildtyp BY4741 ohne Epitopmarkierung analysiert (Spuren 1 und 3). Nach Zugabe der Gesamtzellextrakte aus SF21 Zellen mit den verschiedenen Kombinationen an Noc1p-2p-3p (IN, Spuren 5-7) wurden die jeweiligen Durchflüsse (Spuren 8-13) und gereinigten Fraktionen (IP, Spuren 14-19) gesammelt und auf einem 7,5% SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die Menge der angegebenen Proteine in den jeweiligen Fraktionen wurde durch Westernblotanalyse untersucht. Dabei wurde zur Detektion des ProteinA-Anteils des TAP-Epitops das PAP-Visualisierungsreagenz eingesetzt. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Noc1p, Noc2p und Noc3p wurden proteinspezifische Antikörper verwendet.

Entsprechend scheint die Koreinigung von Noc2p und Rrp5p im identifizierten prä-rRNA unabhängigen und *in vitro* bestätigten Proteinkomplex wohl nicht über eine direkte Wechselwirkung, sondern über die gemeinsame Interaktion mit Noc1p, vermittelt zu werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Noc1p abhängige Konformationsänderung von Flag-Noc2p, die dessen Bindung an Rrp5p-TAP ermöglicht.

2.3.4 Analyse des Rio2p-Enp1p-Moduls

Zur Untersuchung der Interaktionen innerhalb des Rio2p-Enp1p-Moduls (vgl. Abbildung 16) wurde Flag-Rio2p in verschiedenen Kombinationen mit den gezeigten Komponenten 6xHis-Enp1p, Ltv1p, Tsr1p, Krr1p, Hrr25p und Dim1p heterolog in Insektenzellen exprimiert. Zwei der möglichen Kombinationen wurden mittels Affinitätsreinigung genauer analysiert (vgl. Tabelle 1). Nach Aufreinigung von Flag-Rio2p über die M2-Flag-Agarose oder von 6xHis-Enp1p über die Nickel-NTA-Agarose wurde im Coomassie-Gel untersucht, ob die koexprimierten Proteine mit den jeweiligen Köderproteinen angereichert werden konnten (Abbildung 25 A). Dabei konnte sowohl Flag-Rio2p als auch 6xHis-Enp1p sehr effizient aufgereinigt werden. Bei der Koexpression von Tsr1p, Ltv1p und Krr1p mit Flag-Rio2p und anschließender Flag-Affinitätsreinigung konnte eine deutliche Anreicherung des Faktors Krr1p beobachtet werden (Abbildung 25 A, Spur 13). Zusätzlich wurde bei der Koexpression von Flag-Rio2p, 6xHis-Enp1p und Dim1p mit anschließender Reinigung über das Flag- oder 6xHis-Epitop eine direkte Bindung zwischen Flag-Rio2p und 6xHis-Enp1p beobachtet (Abbildung 25 A, Spuren 20 und 27). Diese Koreinigung konnte auch durch Westernblotanalyse der entsprechenden Reinigungsfraktionen bestätigt werden (Abbildung 25 B).

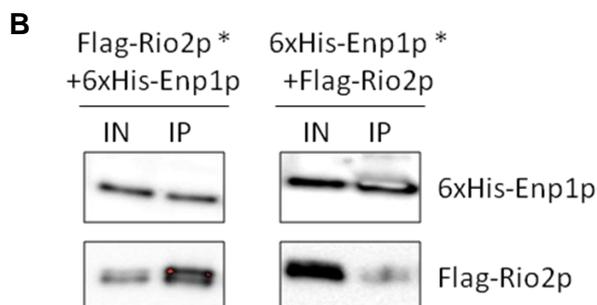
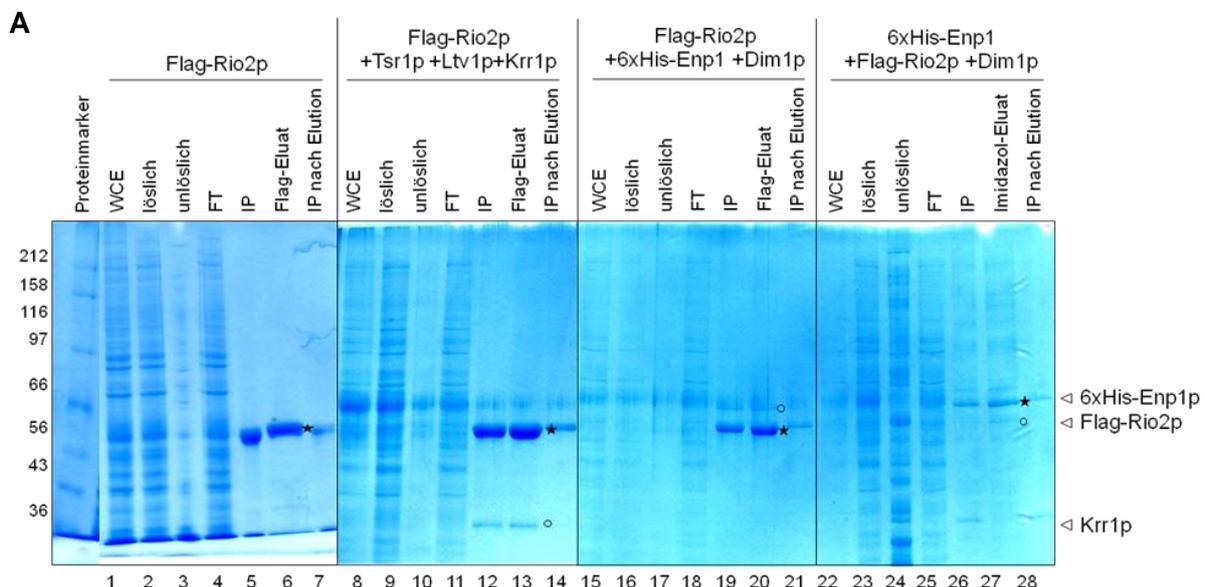


Abbildung 25: Flag-Rio2p zeigt in vitro spezifische Bindung an Krr1p und 6xHis-Enp1p.

(A) Gezeigt sind Coomassie-Gele der durchgeführten Aufreinigungen von Flag-Rio2p über M2-Flag-Agarose und 6xHis-Enp1p über Nickel-NTA-Agarose (★) nach Expression der angegebenen Komplexkomponenten (○). Von Gesamtzellextrakt (WCE; Spuren 1, 8, 15, 22), löslicher Fraktion (Spuren 2, 9, 16, 23), unlöslicher Fraktion (Spuren 3, 10, 17, 24) und Durchfluss der Affinitätsreinigungen (FT; Spuren 4, 11, 18, 25) wurden jeweils 0,05%, von Affinitätsreinigungen (IP; Spuren 5, 12, 19, 26), Flag- (Spuren 6, 13, 20) bzw. Imidazol-Eluat (Spur 27) und Affinitätsreinigungen nach Elution (Spuren 7, 14, 21, 28) jeweils 5% einer Aufreinigung aus 25×10^6 Zellen auf 10% SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Die markierten Banden wurden anschließend massenspektrometrisch identifiziert.

(B) Die Gesamtzellextrakte (IN) und Affinitätsreinigungen (IP) von Flag-Rio2p über M2-Flag-Agarose und 6xHis-Enp1p über Nickel-NTA-Agarose wurden zusätzlich im Westernblot analysiert. Dabei wurde zur Detektion des 6xHis-Epitops an Enp1p die INDIA His-Probe-HRP (Pierce) eingesetzt. Zum Nachweis von Flag-Rio2p wurde ein anti-Flag Antikörper (Sigma) verwendet.

Im Gegensatz dazu konnten die Proteine Tsr1p, Ltv1p und Dim1p unter diesen Bedingungen und in der gewählten Proteinkombination nicht angereichert werden. Mögliche Ursachen hierfür könnten zu geringe Expressionslevel, das Fehlen gemeinsamer Interaktionspartner und Einflüsse gewählter Reinigungsbedingungen sein.

Das gewählte System der heterologen Expression von Proteinkomplexen mit Hilfe des Multibac-Systems in Insektenzellen scheint sich im Allgemeinen sehr gut für die Expression von Komplexen von Ribosomenbiogenesefaktoren zu eignen.

Die prä-rRNA unabhängigen Interaktionen innerhalb der Noc1p-Noc2p-Rrp5p Proteinkomplexe konnten in dieser Arbeit bestätigt und genauer charakterisiert werden. Auch innerhalb des Rio2p-Enp1p-Moduls konnten direkte Wechselwirkungen identifiziert werden, die jedoch noch genauer untersucht werden müssen.

Einige Proteinmodule konnten jedoch mit dieser Methode in der nötigen Menge und Reinheit für anschließende funktionelle und strukturelle Untersuchungen exprimiert und gereinigt werden.

2.4 Assoziation von gereinigten Proteinmodulen an (Vorläufer-) rRNA *in vitro*

2.4.1 *In vitro* Transkription von verschiedenen (prä-) rRNA Fragmenten mithilfe der T7-RNA-Polymerase

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Proteinmodule als Komplexe Assoziation an präribosomale Partikel zeigen könnten, wurden rRNA-Bindungsanalysen durchgeführt.

In anfänglichen Experimenten zeigten die aufgereinigten Proteinkomplexe aus Hefezellen mit *rrn3-8* Allel keine Bindung an große prä-rRNA Moleküle, die aus Wildtyp Hefezellen durch Phenol/ Chloroform-Behandlung extrahiert worden waren (Daten nicht gezeigt).

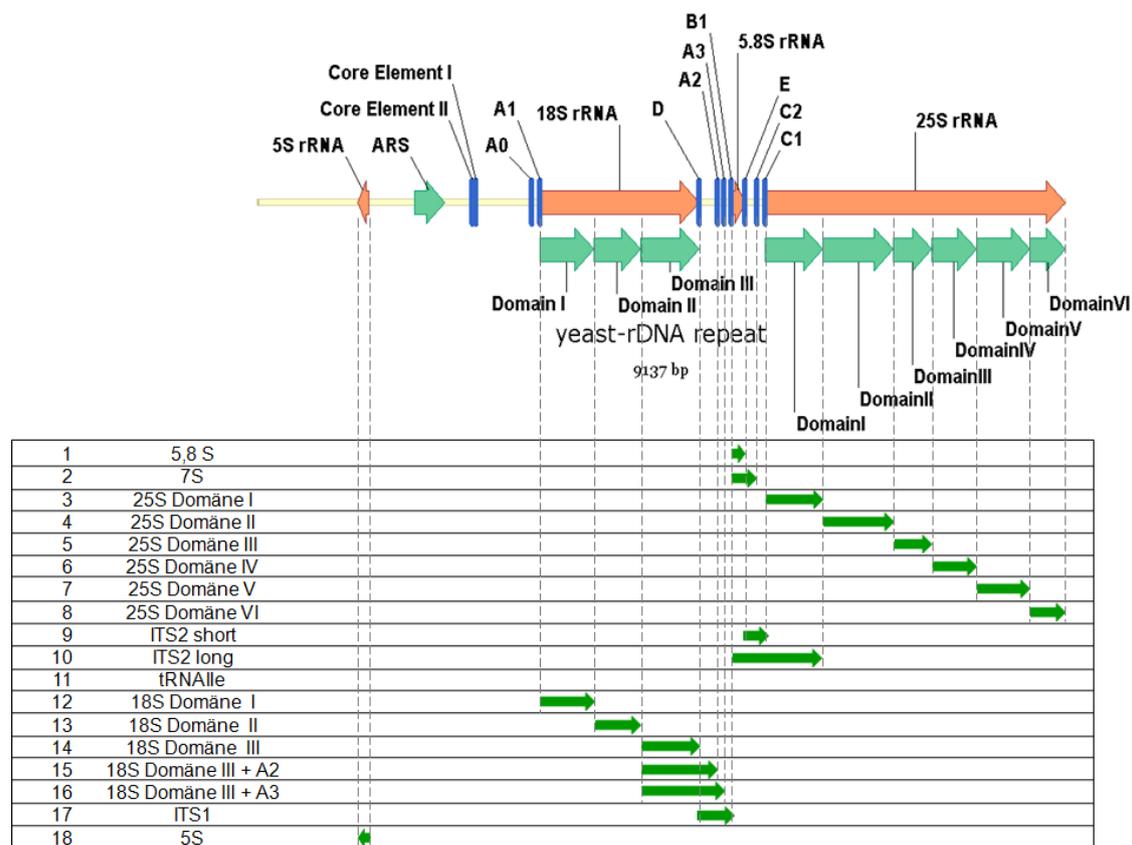


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Identität der untersuchten rRNA-Fragmente.

Um 17 verschiedene rRNA-Fragmente einer Größe von 150 – 1000 Nukleotiden zu erhalten, wurden die entsprechenden Genabschnitte unter die Kontrolle des Promotors der T7-RNA-Polymerase im pGEMT-Vektor gesetzt. Die Benennung und Verteilung der verschiedenen Fragmente ist schematisch dargestellt: Die reifen 5S (Fragment 18) und 5,8S (Fragment 1) rRNA-Spezies wurden jeweils als ein Fragment untersucht, die großen reifen rRNA-Moleküle 18S und 25S wurden in drei (Fragmente 12-14) bzw. sechs (Fragmente 3-18) Domänen unterteilt. Zusätzlich wurden zwei 3'-verlängerte Fragmente der Domäne III der 18S Sequenz untersucht (Fragmente 15 und 16). Auch die stabilere 7S prä-rRNA (Fragment 2) und drei Fragmente der intern transkribierten Spacer ITS1 und ITS2 (Fragmente 9, 10, 17) wurden entsprechend konstruiert. Als Kontrolle diente zusätzlich die tRNA der Aminosäure Isoleucin (Fragment 11).

Um eventuelle Probleme bei der Ausbildung definierter dreidimensionaler Strukturen der sehr großen rRNA-Moleküle zu vermeiden, wurden 17 verschiedene kürzere rDNA-Fragmente einer Größe von 150 – 1000 Nukleotiden unter die Kontrolle des Promotors der T7-RNA-Polymerase in den pGEMT-Vektor kloniert (Abbildung 26).

Zwei der konstruierten Fragmente bestanden aus den reifen 5S und 5,8S rRNA-Spezies, für die bereits mehrfach die Ausbildung definierter dreidimensionaler Strukturen vorgeschlagen wurde (Kauffmann et al., 2009; Nazar, 1991; Szymanski et al., 2002; Vaughn et al., 1984). Die beiden großen reifen rRNA-Moleküle 18S und 25S wurden jeweils in mehrere Fragmente zerlegt. Die 18S rRNA wurde entsprechend ihrer vorgeschlagenen Sekundärstruktur in drei Domänen (Wimberly et al., 2000; Schluenzen et al., 2000), die 25S rRNA in sechs Domänen (Cannone et al., 2002; Spahn et al., 2001; Ban et al., 2000) unterteilt. Zusätzlich wurden zwei 3'-verlängerte Fragmente der Domäne III der 18S Sequenz über die Schnittstelle D hinaus bis zur Prozessierungsstelle A₂ bzw. A₃ untersucht (Fragmente 15 und 16). Der späte 7S rRNA-Vorläufer und drei Fragmente der intern transkribierten Spacer ITS1 und ITS2 (van Nues et al., 1994; van der Sande et al., 1992; Musters et al., 1990) wurden ebenfalls entsprechend konstruiert.

Als Negativkontrolle diente die strukturell gut untersuchte tRNA der Aminosäure Isoleucin (Jühling et al., 2009; Silvan et al., 1999; Nureki et al., 1994).

Die klonierten DNA-Matrizen wurden schließlich in *in vitro* Transkriptionsreaktionen der T7-RNA-Polymerase in Ab- oder Anwesenheit von radioaktivem α -³²P-GTP eingesetzt. Dabei entstanden RNA-Fragmente der erwarteten Größen, die durch Auftrennung in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen analysiert werden konnten (Abbildung 27).

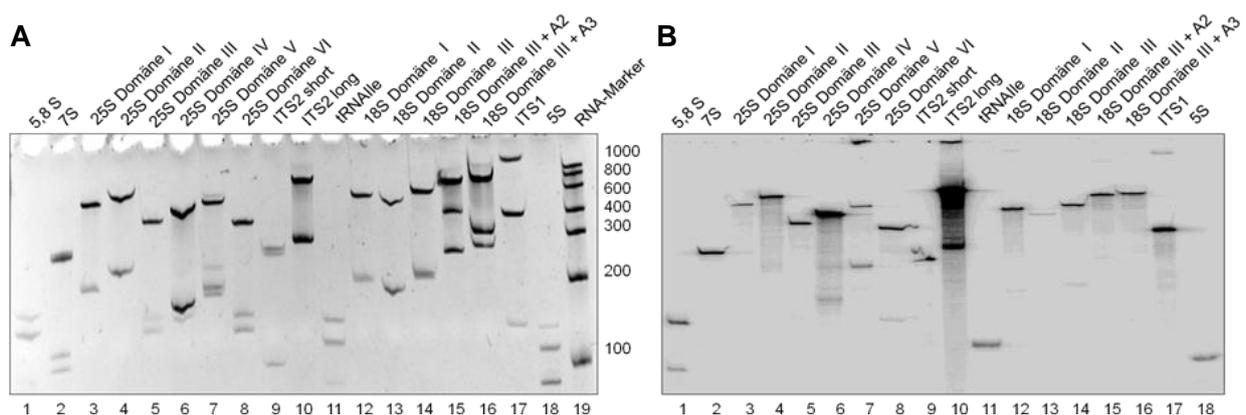


Abbildung 27: Jedes der 18 zu untersuchenden RNA-Fragmente konnte in Ab- oder Anwesenheit von radioaktivem α -³²P-GTP erfolgreich *in vitro* durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden.

In vitro Transkriptionsreaktionen der T7-RNA-Polymerase in (A) Ab- oder (B) Anwesenheit von radioaktivem α -³²P-GTP wurden mit den klonierten Plasmiden als DNA-Matrizen durchgeführt. Die entstanden RNA-Fragmente wurden auf denaturierenden 8%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und durch (A) Färbung mit Ethidiumbromid oder (B) Auflegen eines geeigneten Detektionsschirms nachgewiesen.

Während bei der nicht-radioaktiven *in vitro* Transkription neben RNA-Fragmenten der erwarteten Größen auch 1 – 2 zusätzliche Produkte entstanden (Abbildung 27 A), konnte bei den Ansätzen in Anwesenheit von α -³²P–GTP meist nur ein Hauptprodukt nachgewiesen werden (Abbildung 27 B).

2.4.2 Bindung von *in vitro* transkribierten (prä-) rRNA Fragmenten an gereinigte Proteinmodule

Schließlich sollte die Bindung von aus YCC95 Hefezellen gereinigten oder von *in vitro* rekonstituierten Proteinmodulen an die generierten definierten RNA-Fragmente untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Methoden verwendet, wie die Änderung des Laufverhaltens von RNA im nativen Polyacrylamid-Gel nach Proteinbindung (electromobility shift assay = EMSA) oder die Detektion gebundener Radioaktivität nach Inkubation der radioaktiv markierten RNA-Fragmente mit an Affinitätsmatrizen oder auf Nitrozellulosefiltern immobilisierten Proteinen. Als Positivkontrolle sollte hier das aus Hefezellen unter Hochsalzbedingungen gereinigte Protein Rrp5p-TAP dienen, das *in vitro* Bindung an U-reiche Abschnitte der ITS1-Region (vgl. Fragment 17) zeigt (de Boer et al., 2006). Aufgrund einer möglichen Instabilität gereinigter Komplexe konnten dabei jedoch nicht die in der Publikation beschriebenen Salzbedingungen bei der Reinigung von Rrp5p-TAP verwendet werden.

Leider konnte dadurch mit den gewählten Ansätzen weder bei der Positivkontrolle, noch bei den untersuchten Proteinen und Proteinkomplexen, eine spezifische Bindung eines der untersuchten Fragmente beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Assoziation von prä-rRNA unabhängigen Submodulen von Ribosomenbiogenesefaktoren an kurze definierte rRNA-Fragmente konnte mit den gewählten Methoden nicht nachgewiesen werden. Entsprechend bleibt unklar, ob und, wenn ja, an welcher Stelle der (prä-) rRNA die identifizierten Proteinmodule in der Hefezelle mit präribosomalen Partikeln als vorgeformte Komplexe interagieren können.

3 Diskussion und Ausblick

3.1 Existenz von Proteinmodulen von Ribosomenbiogenesefaktoren in Abwesenheit von rRNA-Synthese

Eine große Anzahl an Ribosomenbiogenesefaktoren wird für eine effiziente Bildung eukaryotischer Ribosomen benötigt. Im Laufe der Ribosomenreifung interagieren viele dieser Faktoren vorübergehend mit neuentstehenden ribosomalen Untereinheiten. Dabei bilden sich spezifische präribosomale Zwischenstufen unterschiedlicher prä-rRNA- und Proteinzusammensetzung. Bei diesem hoch dynamischen und komplexen Vorgang stellt sich die Frage, wie diese zahlreichen Biogenesefaktoren an präribosomale Partikel assoziieren oder von ihnen abdissoziieren. Hier wären mehrere Möglichkeiten der Bindung denkbar. Es wäre möglich, dass (1) einzelne Proteine an unabhängigen Bindungsstellen der (prä-) rRNA binden, dass (2) einzelne Proteine an bereits gebundene ribosomale Proteine oder Biogenesefaktoren sequenziell assoziieren oder dass (3) vorgeformte prä-rRNA unabhängige Proteinmodule binden. Ob die Faktoren als Einzelproteine oder im Komplex mit anderen Proteinen im Laufe der Ribosomenreifung von präribosomalen Partikeln abdissoziieren, ist ebenfalls unklar.

In den letzten Jahren konnten bereits mehrfach durch Bedingungen, die ein partielles Zerfallen von Präribosomen bewirken, oder durch differentielle Zentrifugation, (prä-) rRNA freie Proteinmodule von Ribosomenbiogenesefaktoren durch Affinitätsreinigung aus Hefegesamtzellextrakten isoliert werden (Miles et al., 2005; Milkereit et al., 2001; Schäfer et al., 2006; Pérez-Fernández et al., 2007; Lebreton et al., 2008; Krogan et al., 2004).

Im Gegensatz dazu wurde bei dem hier gewählten experimentellen Ansatz die rRNA-Synthese *in vivo* abgeschaltet. Weiterhin in der Zelle vorliegende rRNA freie Proteinkomplexe von Ribosomenbiogenesefaktoren wurden aufgereinigt und mittels quantitativer Massenspektrometrie mit der Wildtypsituation verglichen. Dabei konnten mehrere neue Erkenntnisse über Proteinmodule, die eine Rolle in der eukaryotischen Ribosomenbiogenese spielen, gewonnen werden.

Zunächst konnte dadurch bestimmt werden, welche der vormals beschriebenen Proteinmodule *in vivo* unabhängig von der Anwesenheit und der Neubildung von präribosomalen Partikeln vorliegen können. Dieser Nachweis der Präribosomen-unabhängigen Bildung von Proteinkomplexen setzt voraus, dass diese Module als funktionelle Einheiten in der Zelle existieren können. Dies lässt vermuten, dass sie im Ganzen vorübergehend mit neugebildeten ribosomalen Untereinheiten interagieren oder im Laufe der Ribosomenreifung von präribosomalen Partikeln abdissoziieren können.

Weiterhin war es bei der gewählten Strategie möglich, während der Affinitätsreinigung und der anschließenden Analyse milde Bedingungen, wie physiologische $MgCl_2$ - und andere

Salzkonzentrationen, anzuwenden. Dadurch und aufgrund der sehr sensitiven Methode der semiquantitativen Massenspektrometrie unter Verwendung des iTRAQ-Reagenzes (Ross et al., 2004) konnten einige neue Elemente bereits bekannter prä-rRNA freier Proteinmodule identifiziert werden, die in vorangegangenen Analysen nicht nachgewiesen werden konnten. Dabei kann jedoch mit der verwendeten qMS-Methode keine Aussage über die Stöchiometrie und Heterogenität gereinigter Proteinkomplexe getroffen werden. Die jeweils mit dem Köderprotein nach Abschalten der rRNA-Synthese angereicherten Proteine könnten sowohl substöchiometrisch vorliegen, also auch in einer Vielzahl von mit dem Köderprotein gereinigten Proteinmodulen. Zwei oder mehr kogereinigte Proteine müssen dabei nicht zwangsläufig gemeinsam in einem einzigen Komplex mit dem gereinigten Biogenesefaktor existieren.

Die durchgeführten Analysen weisen somit auf die Existenz verschiedenster Module von Ribosomenbiogenesefaktoren in eukaryotischen Zellen hin, die unabhängig von Präribosomen *in vivo* existieren können. Diese Subkomplexe könnten im Laufe der Ribosomensynthese an verschiedensten Reifungsschritten beteiligt sein. Einerseits wäre eine Rolle bei der Prozessierung der prä-rRNAs, wie sie bereits für die Submodule des SSU-Prozessoms beschrieben wurde (Dragon et al., 2002; Bernstein et al., 2004; Pérez-Fernández et al., 2007), denkbar. Andererseits könnten derartige Proteinkomplexe einen Einfluss auf den Assemblierungszustand, d.h. den Einbau ribosomaler Proteine, haben (Schäfer et al., 2006). Auch eine Funktion bei der Faltung der rRNA, dem Transport und Export präribosomaler Partikel sowie dem Recycling von Biogenesefaktoren nach deren Abdissoziieren wäre denkbar.

Die verschiedenen nachgewiesenen Proteinkomplexe werden im Folgenden einzeln näher behandelt.

3.1.1 Nop7p-Erb1p-Ytm1p-Komplex

Mit der hier durchgeführten Analyse konnte die Zusammensetzung des detailliert untersuchten und bereits *in vitro* charakterisierten Nop7p-Erb1p-Ytm1p-Komplexes (Miles et al., 2005; Tang et al., 2008) bestätigt werden. Zusätzlich konnte innerhalb dieses Moduls die mutmaßliche DEXD/H Box RNA-Helikase Drs1p (Bernstein et al., 2006; Ripmaster et al., 1992) als ein weiterer Interaktionspartner identifiziert werden. Bei dieser Erweiterung bekannter Proteininteraktionen scheint die Bindung zwar durch die Anwesenheit von prä-rRNA stabilisiert zu werden, jedoch nicht vollständig davon abzuhängen. Die Beobachtung, dass Drs1p Teil der Nop7p-Erb1p-Ytm1p Module sein kann, wird auch durch allel-spezifische synthetische Letalität in *nop7/drs1* Doppel-mutanten (Adams et al., 2002) bestärkt. Außerdem weisen *drs1* Mutanten stark verminderte Produktion der 60S ribosomalen Untereinheit auf (Ripmaster et al., 1992, 1993).

Die Komponenten dieses Komplexes zeigen starke Assoziation an 27SB enthaltende prä-60S Partikel und nach Depletion der einzelnen Faktoren findet die Prozessierung an der Schnittstelle C2 nicht oder nur stark verzögert statt (Adams et al., 2002; Miles et al., 2005; Oeffinger et al., 2002; Pestov et al., 2001). Dies deutet auf eine Rolle dieses Proteinmoduls bei diesem Schnittereignis hin, etwa durch Beeinflussung des Faltungs- oder Assemblierungszustands des beschriebenen prä-60S Partikels.

3.1.2 Rix1p-Ipi1p-Ipi3p-Komplex

Auch die *in vivo* Existenz des bereits mehrfach beschriebenen Rix1p-Ipi1p-Ipi3p- Komplexes konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Krogan et al., 2004; Galani et al., 2004; Nissan et al., 2004). Erst kürzlich wurde die ATP-abhängige Ablösung dieses Subkomplexes von prä-60S Partikeln näher charakterisiert. Dabei scheint eine Interaktion zwischen den beiden Biogenesefaktoren Rsa4p und Rea1p/Mdn1p über die MIDAS-Domäne von Rea1p (MIDAS = metal ion-dependent adhesion site) eine essentielle Rolle zu spielen (Ulbrich et al., 2009). Dennoch zeigen diese beiden Proteine in der vorliegenden Analyse keine prä-rRNA unabhängige Interaktion mit dem gereinigten Komplex.

Es wurde vorgeschlagen, dass die Ablösung dieses Subkomplexes von prä-60S Partikeln und daraus resultierende strukturelle Umordnungen eine Rolle bei späten nukleären Reifungsschritten spielen könnte. Weiterhin könnte das Freiwerden potentieller Binde-stellen für Exportfaktoren schließlich den Transport der LSU ins Zytoplasma ermöglichen (Ulbrich et al., 2009; Galani et al., 2004).

3.1.3 Noc1p-Noc2p-Komplex

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Rrp5p, eine Komponente des SSU Prozessoms, Teil des Noc1p-Noc2p-Moduls (Milkereit et al., 2001) zu sein scheint. Dabei könnte jedoch die Interaktion von Rrp5p mit dem bisher publizierten Komplex durch Anwesenheit von prä-rRNA und den Einbau in präribosomale Partikel stabilisiert werden.

Wie bereits beschrieben, spielt Rrp5p eine Rolle bei der Rekrutierung des UTP-C Komplexes des SSU-Prozessoms an die 35S prä-rRNA (Pérez-Fernández et al., 2007), während der Noc1p-Noc2p-Komplex am Transport der prä-60S Untereinheit beteiligt zu sein scheint (Milkereit et al., 2001). Welche Rolle die prä-rRNA unabhängigen Interaktionen der drei Proteine Noc1p, Noc2p und Rrp5p bei der Ribosomenreifung spielen ist bisher unklar. Weiterhin stellt sich die Frage, welche Funktion Noc3p, der zweite Interaktionspartner von Noc2p (Milkereit et al., 2001), in diesem Zusammenhang besitzt.

Um die Interaktionen von Noc1p/2p/3p untereinander und mit Rrp5p näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Kombinationen der Komplexkomponenten in Insektenzellen koexprimiert und gereinigt.

Die bereits länger bekannten Proteinkomplexe von Noc1p-2p und Noc2p-3p (Milkereit et al., 2001) konnten jeweils *in vitro* rekonstruiert werden. In vorangegangenen Untersuchungen konnten die jeweiligen Komponenten einzeln in prokaryotischen *E. coli* Zellen exprimiert werden. Die Rekonstitution stabiler Komplexe war jedoch aufgrund der großen Instabilität der Einzelproteine nicht möglich. Bekanntermaßen zeigen eukaryotische Komponenten von Multiproteinkomplexen nach ihrer prokaryotischen Expression als Einzelprotein aufgrund falscher Proteinfaltung, -modifikation oder -prozessierung oft schlechte Löslichkeit und geringe Aktivität (Berger et al., 2004; Roy, 2004). In dieser Arbeit konnten dagegen nach Koexpression der Komplexkomponenten in Insektenzellen Komplexe aufgereinigt werden, die eine annähernde Stabilität im Vergleich zu den salzextrahierten Komplexen in Hefezellen aufzuweisen scheinen. Dabei ist jedoch noch immer unklar, ob es sich wirklich wie vorgeschlagen um Dimere handelt. Da bisher aufgrund der Analyse mit verschiedenen Gelfiltrationssäulen keine Aussage über die Zusammensetzung der Komplexe gemacht werden konnte, wäre die Anwendung alternativer Methoden, wie z.B. der Änderung des Laufverhaltens der Proteine bei der SDS-PAGE nach Vernetzung mit Glutaraldehyd (Migneault et al., 2004), denkbar.

Da die beiden Komplexe Noc1p-2p und Noc2p-3p an verschiedenen Zeitpunkten der LSU-Reifung an präribosomale Partikel gebunden vorliegen, wurde lange Zeit vermutet, dass im Nukleolus zunächst ein Noc1p-2p Komplex ans 60S Präribosom bindet und im Laufe des Transports ins Nukleoplasma die Komponente Noc1p durch Noc3p ausgetauscht wird (Tschochner et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Affinität des gemeinsamen Interaktionspartners Noc2p zu Noc3p höher sein könnte als dessen Affinität zu Noc1p. Um einen ersten Eindruck darüber zu erhalten, wurden zusätzlich diese drei Proteine gemeinsam exprimiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Noc1p und Noc3p in vergleichbaren Mengen mit Flag-Noc2p kogereinigt werden konnten. Wenn man bei der Verwendung des gewählten Baculovirus-Expressionssystems von vergleichbaren Expressionsmengen der beiden Interaktionspartner ausgeht (Berger et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006, 2007), scheint Noc2p keine deutlich erhöhte Affinität zu einem der beiden Proteine zu zeigen. Zusätzlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass sich auch ohne die Existenz eines Noc1p-2p Komplexes am Präribosom ein Proteinmodul aus Noc2p und Noc3p ausbilden kann (Diplomarbeit Thomas Hierlmeier). Somit könnte es sich bei dem beschriebenen Vorgang mehr um einen Austausch eines an prä-60S Partikel gebundenen Noc1p-2p Komplexes gegen ein vorgebildetes Noc2p-3p Modul handeln.

Welche Rolle Rrp5p in diesem Zusammenhang spielt ist noch unklar. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl in den Hefezellen nach Abschalten der Pol I Transkription als auch nach *in vitro* Rekonstitution in Insektenzellen nicht alle gereinigten Noc1p-2p Proteinmodule an Rrp5p gebunden vorliegen. Außerdem ist die Interaktion von Rrp5p mit Noc1p-TAP stark salzabhängig, d.h. sie geht schon bei einer minimalen Erhöhung der Ionenstärke im verwendeten Puffer verloren (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich scheint die Koreinigung von Noc2p und Rrp5p im identifizierten Proteinkomplex von einer gemeinsamen Interaktion mit Noc1p abzuhängen.

Ob und wie eine Rekrutierung dieses Komplexes an nukleoläre prä-60S Partikel stattfindet, bleibt jedoch weiterhin unklar.

3.1.4 Rio2p-Enp1p-Modul

Weiterhin konnte der späte 40S Biogenesefaktor Rio2p in einem Modul oder in einer Vielzahl möglicher Modulkombinationen mit Enp1p, Ltv1p, Tsr1p, Krr1p, Hrr25p und Dim1p gefunden werden. Diese Zusammensetzung enthält u.a. Proteine wie Enp1p und Dim1p, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Biosynthese an präribosomale Partikel assoziieren und mit späten prä-40S Partikeln ins Zytoplasma exportiert werden (Chen et al., 2003; Schäfer et al., 2003; Lafontaine et al., 1995). Faktoren wie Rio2p, Ltv1p und Tsr1p scheinen jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt an den Vorläufer der kleinen Untereinheit zu binden (Vanrobays et al., 2003; Schäfer et al., 2003). Somit wäre es unwahrscheinlich, dass dieses Proteinmodul einen Komplex darstellt, der im Ganzen an das Präribosom rekrutiert und gebunden wird. Vielmehr könnte dieses Proteinmodul im Laufe der Ribosomenreifung im Ganzen vom Präribosom abdissoziieren und in Abwesenheit von rRNA Synthese als reiner Proteinkomplex erhalten bleiben.

Auch schließt die beobachtete Zusammensetzung dieses Proteinmoduls die Existenz des kürzlich unter Hochsalzbedingungen aus Präribosomen extrahierten Enp1p-Ltv1p-rpS3 Komplexes (Schäfer et al., 2006) nicht aus. Bei dieser Analyse wurden im Vergleich zu der hier vorliegenden Untersuchung stark abweichende Bedingungen gewählt. Zusätzlich konnte hier aufgrund der bereits beschriebenen Problematik der quantitativen massenspektrometrischen Untersuchung über die Assoziation gereinigter prä-rRNA freier Proteinmodule mit ribosomalen Proteinen keine Aussage gemacht werden.

Interessanterweise konnten Nob1p und dessen vermutlicher Interaktionspartner Pno1p/Dim2p (Fatica et al., 2003; Tone und Toh-E, 2002) nicht als Teile der prä-rRNA freien Rio2p Proteinmodule identifiziert werden (Abbildung 16). In Wildtyp-Hefezellen wurden sie jedoch mehrfach mit Rio2p in präribosomalen Partikeln gefunden (Schäfer et al., 2003). Dabei sind neben Nob1p, einer mutmaßlichen Endonuklease mit einer PIN Domäne (Fatica et al., 2004; Fatica et al., 2003; Pertschy et al., 2009), und Pno1p/Dim2p auch Rio2p selbst

und einige der Komponenten des Rio2p-Moduls nötig für die zytoplasmatische 3' Prozessierung der 18S prä-rRNA an der Schnittstelle D (Fatica et al., 2003; Geerlings et al., 2003; Seiser et al., 2006; Gelperin et al., 2001; Vanrobays et al., 2004).

Scheinbar ist die Interaktion von mindestens zwei verschiedenen Proteinkomplexen, einem Nob1p-Pno1p/Dim2p-Modul und einem Rio2p-Modul, mit neu gebildeten 40S Untereinheiten nötig für effiziente Prozessierung der 3' verlängerten 18S rRNA zu reifer rRNA durch endonukleolytische Spaltung. Sehr wahrscheinlich binden dabei diese beiden Module an unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Stellen des prä-40S Partikels. Während die Bindestelle für Nob1p-Pno1p/Dim2p wahrscheinlich in der Nähe der Helices 44 und 45 der 18S rRNA liegt (Pertschy et al., 2009), könnte ein Rio2p-Enp1p-Modul im Bereich der „Beak“-Vorwölbung über rpS3 an das prä-40S Partikel binden (Schäfer et al., 2006).

Auch die Interaktionen zwischen einzelnen Komponenten des Rio2p-Enp1p-Moduls konnten *in vitro* näher charakterisiert werden. Zusätzlich zu den bereits bekannten salzstabilen Interaktionen zwischen Enp1p, Ltv1p und rpS3 (Schäfer et al., 2006; Loar et al., 2004; Seiser et al., 2006) konnte hier eine direkte Bindung zwischen Enp1p und Rio2p und zwischen Krr1p und Rio2p gezeigt werden. Somit konnten bisher zumindest für vier der sieben Komponenten direkte Interaktionen nachgewiesen werden. Wie stabil diese Interaktionen sind und wie die drei Proteine Hrr25p, Tsr1p und Dim1p in diese Zusammenhänge eingeordnet werden können, ist jedoch noch unklar und muss weiter untersucht werden.

Einige der identifizierten prä-rRNA unabhängigen Proteinmodule konnten in der vorliegenden Arbeit in der nötigen Menge und Reinheit für funktionelle und strukturelle Untersuchungen exprimiert und gereinigt werden. Anhand elektronenmikroskopischer und röntgenkristallographischer Analysen könnten die Bindungsstellen und Interaktionsdomänen der Komplexkomponenten bestimmt werden, was langfristig eventuell auch Informationen zu der Funktion der einzelnen Proteine und auch der gesamten Proteinmodule in der Ribosomenreifung liefern könnte.

3.2 Assoziation von Arx1p und weiteren Ribosomenbiogenesefaktoren an reife 60S Untereinheiten

Interessanterweise konnten bei der durchgeführten Analyse eine Reihe von Ribosomenbiogenesefaktoren, darunter Arx1p, identifiziert werden, die Assoziation an reife 60S Untereinheiten in Hefezellen zeigen, in denen die Neusynthese von Ribosomen über einen Zeitraum von mindestens drei Stunden abgeschaltet worden war (Abbildung 12).

Da die Synthese von Ribosomen in Hefezellen über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten abläuft, kann man davon ausgehen, dass zum analysierten Zeitpunkt in der *rm3-8* Mutante

alle untersuchten prä-rRNA Spezies vollständig umgesetzt waren (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 11). Eine Akkumulation von 25S rRNA enthaltenden neusynthetisierten LSUs während dieser drei Stunden wäre nur dann denkbar, wenn die Ablösung von Arx1p und anderen späten Biogenesefaktoren von neusynthetisierten LSUs von aktiv ablaufender rRNA-Synthese abhängig wäre. Entsprechend müsste das Abdissoziieren dieser Faktoren nach Abschalten der Pol I Transkription durch einen unbekanntem Rückkopplungsmechanismus verhindert werden, was jedoch wiederum einen Einfluss auf die Menge reifer und translationskompetenter LSUs im Zytoplasma haben sollte.

Andererseits scheint die Inaktivierung der Pol I Maschinerie grundsätzlich keinen Einfluss auf die Translationsaktivität reifer Ribosomen zu haben (Wittekind et al., 1990). Entsprechend zeigte in dieser Untersuchung rpS8, ein ribosomales Protein der kleinen Untereinheit, in Saccharosedichtegradienten auch nach Abschalten der Pol I Transkription Sedimentation in Polysomenfraktionen (Abbildung 12 C). Dies spricht für weiterhin aktiv ablaufende Translation in den untersuchten *rrn3-8* Zellen. Folglich stellen die an Arx1p assoziierten Untereinheiten höchstwahrscheinlich freie reife und nicht neusynthetisierte LSUs dar.

Dabei stellt sich die Frage, ob Arx1p sowohl bei der Synthese als auch bei der Funktion der großen ribosomalen Untereinheit eine wichtige Rolle spielen könnte. Neben der bereits mehrfach beschriebenen Funktion von Arx1p beim Export von prä-60S Partikeln (Bradatsch et al., 2007; Hung et al., 2008; Lo und Johnson, 2009) könnte dieser Faktor auch daran beteiligt sein, die Degradation sowohl von neusynthetisierten als auch von reifen LSUs im Zytoplasma zu verhindern. Auch eine Rolle bei der Regulation der Interaktion mit der kleinen Untereinheit wäre denkbar.

Interessanterweise wurde für das humane homologe Protein Ebp1 eine Funktion bei der Translationsregulation vorgeschlagen (Monie et al., 2007; Pilipenko et al., 2000; Squatrito et al., 2006). Weiterhin wurden *in vitro* Analysen von Ebp1p durchgeführt, die zeigten, dass dieses Homolog im Gegensatz zu Arx1p keine Interaktion mit Nukleoporinen zeigt und nicht effizient durch den Kernporenkomplex transportiert werden kann (Bradatsch et al., 2007). Vermutlich ist somit eine Funktion von Arx1p bei der Regulation der eukaryotischen Translation in verschiedenen Organismen konserviert, während sich nur in bestimmten Arten, wie beispielsweise der Bäckerhefe, eine zusätzliche nichtessentielle Funktion beim Export der LSU zeigt.

In Hefezellen, in denen das ARX1 Gen depletiert worden war, konnten weder signifikante Änderungen der Prozessierung der prä-rRNA noch eine deutliche Abreicherung neusynthetisierter LSUs festgestellt werden (Lebreton et al., 2006). In Saccharosegradienten zur Auftrennung ribosomaler Partikel konnte eine Akkumulation sowohl freier 40S als auch freier 60S Untereinheiten und das Auftreten von „halfmers“, d.h. von an mRNA gebundenen 40S Untereinheiten ohne assoziierte 60S Untereinheit, beobachtet werden (Hung et al.,

2008). Dies spricht für eine mögliche Funktion des Arx1p bei der Bindung beider Untereinheiten zur aktiv ablaufenden Translation der mRNA.

Nach Abschalten der rRNA Neusynthese konnte jedoch nicht nur eine Anreicherung von 25S rRNA enthaltenden ribosomalen Partikeln mit Arx1p-TAP nachgewiesen werden. Weiterhin konnten die LSU Biogenesefaktoren Nmd3p, Tif6p/eIF6, Rei1p, Alb1p und Lsg1p kogereinigt werden, während andere Faktoren wie Nug1p, Nog2p und Rrs1p nicht angereichert wurden (Abbildung 16).

Dabei besteht einerseits die Möglichkeit, dass diese Faktoren aufgrund einer von Ribosomen unabhängigen Protein-Protein-Interaktion mit Arx1p-TAP angereichert wurden. Andererseits wäre auch eine gemeinsame Interaktion mit reifen 60S Untereinheiten unabhängig von einer direkten Interaktion mit Arx1p-TAP möglich.

Der bereits detailliert in der Einleitung beschriebene Exportadapter der LSU Nmd3p bindet sowohl *in vivo* als auch *in vitro* an neusynthetisierte und reife 60S Untereinheiten (Hedges et al., 2006; Ho et al., 2000a). Diese Bindung im Bereich der „Central Protuberance“ in der Nähe von rpL10 (Hedges et al., 2005; Gadad et al., 2001) bleibt auch nach Abschalten der rRNA Synthese durch Zugabe des Antibiotikums Thiolutin erhalten (Ho et al., 2000a). Wie bereits beschrieben spielt die ebenfalls kogereinigte GTPase Lsg1p eine Rolle beim Ablösen des Exportadapters Nmd3p von zytoplasmatischen prä-60S Partikeln (Hedges et al., 2005; West et al., 2005). Somit könnte auch dieses Protein nach Abschalten der Neusynthese von prä-rRNA über eine Interaktion in der Nähe von rpL10 und Nmd3p an reife 60S Untereinheiten gebunden vorliegen.

Sowohl in Archaeen als auch in Hefezellen zeigt der späte 60S Biogenesefaktor Tif6p/eIF6 *in vitro* eine spezifische Bindung an reife 60S Untereinheiten. Dabei erfolgt die Bindung wahrscheinlich in der Nähe von rpL23 an der Bindungsstelle beider Untereinheiten. Somit könnte nicht abgelöstes Tif6p/eIF6 ein Zusammentreten beider Untereinheiten zur Translation der mRNA verhindern (Benelli et al., 2009; Si und Maitra, 1999).

Da die Assoziation von Arx1p an präribosomale 60S Partikel durch die Fusion eines GFP-Epitops an die ribosomalen Proteine rpL25 und rpL35 stark beeinträchtigt wird, erfolgt die Bindung dieses Faktors wahrscheinlich im Bereich des „exit-tunnels“ der LSU (Hung et al., 2006). Da die vorgeschlagenen Bindungsstellen von Tif6p/eIF6 und Nmd3p mit Lsg1p an neu gebildeten und an reifen 60S Untereinheiten nicht in direkter Nachbarschaft zueinander und zur potentiellen Bindungsstelle von Arx1p liegen, kann man vermuten, dass die Anreicherung dieser Proteine mit Arx1p-TAP nach Abschalten der Transkription durch die Pol I durch ihre getrennten Interaktionen mit reifen, freien 60S Untereinheiten zustande kommt. Es scheint sich dabei nicht um direkte Interaktionen innerhalb eines präribosomen-unabhängigen Proteinkomplexes zu handeln.

Für die beiden nichtessentiellen Faktoren Rei1p und Alb1p konnte mehrfach eine Rolle bei der Ablösung von LSUs und dem Recycling der Proteine Arx1p und Tif6p/eIF6 gezeigt werden (Hung et al., 2006; Lebreton et al., 2006). Zumindest im Fall von Alb1p könnte die Anreicherung dieses Proteins mit Arx1p-TAP in Abwesenheit präribosomaler Partikel durch eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgen. Eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Lebreton et al., 2006).

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass eine Vielzahl an Biogenesefaktoren im Zytoplasma an freie neusynthetisierte oder an nach der Termination der Translation aus 80S Ribosomen freigesetzte große Untereinheiten assoziiert vorliegen können. Dabei handelt es sich um die Proteine Arx1p, Tif6p/eIF6, Nmd3p und möglicherweise zusätzlich um Rei1p, Alb1p und Lsg1p. Die unerwartete Assoziation dieser Faktoren an reife 60S Untereinheiten ließe sich durch eine doppelte Rolle dieser Proteine sowohl bei der Synthese als auch beim Recycling und der Regulation der LSUs im Laufe der Translation erklären.

Zumindest für das Protein Tif6p/eIF6 wurde diese Möglichkeit in Säugerzellen bereits mehrfach vorgeschlagen (Gandin et al., 2008; Miluzio et al., 2009).

3.3 Ausblick

Um erste Hinweise zur Bindung der identifizierten Proteinmodule an präribosomale Partikel zu erhalten, wurden verschiedene Methoden zur Analyse der Assoziation von gereinigten oder von *in vitro* rekonstituierten Komplexen an verschiedene definierte rRNA-Fragmente angewendet. Dabei wurde vermutet, dass Unterschiede in der Bindungsfähigkeit zwischen den einzelnen Komplexkomponenten und den gesamten Proteinmodulen bestehen.

Bisher konnten bei den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der Instabilität mancher Wechselwirkungen innerhalb der Proteinmodule nicht die gleichen Bedingungen verwendet werden, unter denen das als Positivkontrolle verwendete Protein Rrp5p-TAP *in vitro* Bindung an U-reiche Abschnitte der ITS1-Region zeigt (de Boer et al., 2006). Dadurch konnte mit den gewählten Ansätzen weder mit Rrp5p-TAP noch mit den untersuchten Einzelproteinen und Proteinkomplexen eine spezifische Bindung eines der untersuchten Fragmente beobachtet werden. Dabei stellt sich die Frage, ob die *in vitro* transkribierten rRNA-Abschnitte in Lösung und ohne assemblierte ribosomale Proteine eine Konformation ausbilden können, die von den isolierten Proteinkomplexen gebunden werden kann. Außerdem wäre auch eine Bindung der Module über andere Proteine, darunter ribosomale Proteine, und nicht über eine direkte Wechselwirkung mit der prä-rRNA denkbar.

Erst kürzlich konnte eine Methode entwickelt werden, die eine Bestimmung der *in vivo* Bindestellen spezifischer Ribosomenbiogenesefaktoren an der prä-rRNA durch UV-Quervernetzung ermöglicht (Granneman et al., 2009). Damit kann natürlich die Frage nach der Bindung dieser Proteine als einzelne Faktoren oder als vorgeformte Proteinmodule

nicht beantwortet werden. Jedoch könnte diese Methode Hinweise zu möglichen rRNA-Bindestellen und potenziell interagierenden benachbarten ribosomalen Proteinen liefern und so nachfolgende *in vitro* Interaktionsstudien vereinfachen.

Somit bleibt unklar, ob und gegebenenfalls an welcher Stelle die nachgewiesenen Proteinmodule in der Hefezelle mit präribosomalen Partikeln als vorgeformte Komplexe interagieren können. Da aber im Falle von Rrp5p bereits eine derartige Bindung nachgewiesen werden konnte, müssen zur Analyse der identifizierten Komplexe gegebenenfalls die Versuchsbedingungen entsprechend angepasst werden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Grundlagen zu weiterführenden *in vitro* Analysen der Architektur von Proteinkomplexen von Ribosomenbiogenesefaktoren und zur Untersuchung deren Bindung an präribosomale Partikel geschaffen werden. Dies könnte es langfristig ermöglichen, einen Einblick in die Funktionen der Biogenesefaktoren und die Dynamik und Komplexität deren Bindung an präribosomale Partikel zu gewinnen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser Ø 15 mm	Roth
Filterpapier 3MM	Whatman
Gene Pulser [®] -Küvetten (0.2 cm)	BioRad
Glasperlen 0,75 – 1 mm	Roth
Imagerscreen	Fuji
Immobilon [™] -PSQ 0,2 µm Membran	Millipore
Multiwell-Platten (12-well)	Nunc
NuPAGE [™] 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen
Objekträger 76x26x1 mm	Marienfeld
Plastikküvetten 10x4x45 mm	Sarstedt
Positive [™] Membran	BioGene
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore

4.1.2 Geräte

Agarosegel UV imaging system GelMax	INTAS
BioLogic LP Chromatographiesystem	Biorad
Elektroporator Micropulser [™]	Biorad
Fluoreszenz-Image Reader LAS-3000	Fujifilm
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Geltrockner	Drystar
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Model 785 Vakuum-Blotter	Biorad
Nanodrop [®] ND-1000-UV/Vis Spectrophotometer	Peqlab
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	PeqLab
Phosphor Imager FLA3000	Fuji
Pulverisette für Hefeaufschluss	Fritsch
Safe Imager [™] blue light transilluminator	Invitrogen
SDS-Minigelapparatur	Biorad
SpeedVac Concentrator	Savant
Tischzentrifuge C412	Jouan
Tischzentrifuge CT 412	Jouan
Thermocycler PCR Sprint	Hybaid
Thermomixer compact	Eppendorf
TransBlot [™]	Biorad
Trans-Blot [®] SD Semi-dry transfer cell	Biorad
Ultrazentrifuge Centrikon T-1170	Kontron Instruments
Optima [™] L-80 XP	Beckman Coulter
UV/Visible-Spektrophotometer	Amersham Biosciences
Vibrax VXR basic	IKA
Zentrifuge Centrikon T-324	Kontron Instruments

4.1.3 Kits

BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche
FastPlasmid™ Mini Kit	Eppendorf
iTRAQ–Labelling Kit	Invitrogen
PureLink™ PCR Purification Kit	Invitrogen
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen

4.1.4 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	Merck, Roth, Sigma, Serva u.a. über Chemikalienausgabe der Universität Regensburg
Ampicillin Natriumsalz (Amp)	Roth
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Bacto™ Peptone	BD Biosciences
Bacto™ Tryptone	BD Biosciences
Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences
Benzamidin	Sigma
Bovines Serum-Albumin, Fr. V (BSA)	Sigma
CDP–Star Chemilumineszenz–Substrat	Roche
Cycloheximid	Roth
2´-Desoxyadenosin 5´-triphosphat (dATP)	MBI Fermentas
2´-Desoxycytidin 5´-triphosphat, (dCTP)	MBI Fermentas
2´-Desoxyguanosin 5´-triphosphat, (dGTP)	MBI Fermentas
2´-Desoxythymidin 5´-triphosphat, (dTTP)	MBI Fermentas
4´,6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Merck
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth
Glycerin ca. 87%	Merck
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma
Moviol	Hoechst
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Polyethylenglycol PEG 4000	Sigma
poly-L-Lysin 0,1%	Sigma Diagnostics
Ribonucleosid-Vanadyl-Complex (RVC)	New England BioLabs
Rotiphorese Gel 30	Biorad
rRNasin 40U/μl	Promega
D(-)-Sorbitol	Merck
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Triton® X-100	Serva
Tween-20	Serva

4.1.5 Enzyme

Antarctic Phosphatase (CIP)	New England BioLabs
iProof–DNA–Polymerase	Biorad

Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs
T7-RNA-Polymerase	New England BioLabs
Taq-Polymerase	New England BioLabs
Trypsin, Proteomics Grade	Sigma
Zymolyase 100T	Seikagaku Corporation

4.1.6 Standards

1 kb DNA ladder	New England BioLabs
100 bp DNA ladder	New England BioLabs
Prestained Protein-Marker Broad Range	New England BioLabs
Riboruler Low Range RNA Ladder	Fermentas
Salmon sperm DNA, 10 mg/ml	Invitrogen
Unstained Protein-Marker Broad Range	New England BioLabs

4.1.7 Antikörper

AlexaFluor® 488 goat anti-mouse (1:500)	Molecular Probes
AlexaFluor® 594 goat anti-rabbit (1:500)	Molecular Probes
Goat anti-mouse (Peroxidase-konjugiert) (1:3000)	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-rabbit (Peroxidase-konjugiert) (1:2500)	Jackson ImmunoResearch
Monoklonal Mouse anti-Nop1 (1:200)	Abcam
Monoklonal Rabbit anti-Noc1 (1:200)	Elisabeth Kremmer, GSF München
Monoklonal Rabbit anti-Noc2 (1:200)	Elisabeth Kremmer, GSF München
Monoklonal Rabbit anti-Noc3 (1:200)	Elisabeth Kremmer, GSF München
Monoklonal Rabbit anti-rpS8 (1:2000)	Georgio Dieci
Polyklonal Rabbit anti-ProteinA (1:50000)	Sigma
Polyklonal Rabbit-PAP (Peroxidase-konjugiert) (1:3000)	DakoCytomation

4.1.8 Affinitätsmatrizen

Anti-Flag® M2 Affinity Agarose	Sigma
Calmodulin Affinity Resin	Stratagene
Dynabeads® Pan Mouse IgG	Invitrogen
IgG-Sepharose™ Fast Flow	Amersham Biosciences

4.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung	Gen / Lokus
177	ATCTGCCGACGATTATGCTCAATATT TAGATCAAGATTCAGACTCCATGGA AAAGAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	NOC1
178	TAATTTACAACACCGAAGTGTTTAGT TAATGTATTATTATTTTACGACTCA CTATAGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	NOC1
638	GCCAAACAAAAGCTAAACTGAATA AACTAGATTCCAAGAAATCCATGGA AAAGAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	NOP7

639	AGACAAAATTTTTGAGAGGCTATTG GAAAAGAAGAGAAAATACGACTCAC TATAGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	NOP7
---	AAATCTAAAAATGGATAAACTAGGAA ACTATATACTAGAGTCCATGGAAAA GAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	RIO2
---	TTGATTATTTGCGGCCATTTATGCAG TCGTCTAACTAAATACGACTCACTA TAGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	RIO2
646	CGAATTAAGTGATGACGAAGAGGAG GAGGAAGAAGGAGAATCCATGGAAA AGAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	RIX1
647	TCTAGTCGAAATATAACCAAAACAAAA TCTGGTTGATATTATACGACTCACTA TAGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	RIX1
648	TGAGACATCAAATGGCGGAGTTGAA GAAACCATGAAAATGTCCATGGAAA AGAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	ARX1
649	TATATTATTTATATACTAGCTTTAGAA ATGATGAAGTTTCTACGACTCACTAT AGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	ARX1
---	TCCACAGGAAGCTAATGATGATTTA ATGATTGATGTCAATTCATGGAAAA GAGAAG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	ENP1
---	CCGAGCGATATAAAAATTGATGAAAA ATTGATATTACAGCATACGACTCACT ATAGGG	PCR zur genomischen Integration des TAP-Tags (mit pBS1479 als Matrize)	ENP1
205	CATGGCTTAATCTTTGAGAC	Radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierung in 18S-Sequenz	rDNA
212	CTCCGCTTATTGATATGC	Radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierung in 25S-Sequenz	rDNA
210	GGCCAGCAATTTCAAGTTA	Radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierung in E-C2-Sequenz (Detektion von 35/32S, 27SA ₂ , 27SB, 7S prä-rRNAs)	rDNA
1819	GTAAGCTCTCATGCTCTTGCC	Radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierung in D-A2-Sequenz (Detektion von 35/32S, 23S, 20S prä-rRNAs)	rDNA
1882	TAATACGACTCACTATAGGGAACTT TCAACAACGGATCTCTTGG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (T7-Pr_5.8S-B1_f)	rDNA
1883	AAATGACGCTCAAACAGGCATGCC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (5.8S-E_rev)	rDNA
1884	ACCGTACTTGCATTATACCTCAAG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (7S-C2_rev)	rDNA
1885	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTG ACCTCAAATCAGGTAGGAGT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomI_f)	rDNA
1886	CCGTGTTTCAAGACGGGCGGCATA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (25S-DomI_rev)	rDNA
1887	TAATACGACTCACTATAGGGACCAA GGAGTCTAACGTCTATGCGA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7- Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomII_f)	rDNA

1888	CTACTACCACCAAGATCTGCACTA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (25S-DomII_rev)	rDNA
1889	TAATACGACTCACTATAGGGCAAAT ATTCAAATGAGAACCTTTGAA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomIII_f)	rDNA
1890	CAACTAGAGGCTGTTCACCTTGA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (25S-DomIII_rev)	rDNA
1891	TAATACGACTCACTATAGGGATAGA ATAATGTAGATAAGGGAAAT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomIV_f)	rDNA
1892	TGCCAAGCCCGTTCCTTGGCTGT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (25S-DomIV_rev)	rDNA
1893	TAATACGACTCACTATAGGGGAATC AGCGGGGAAAGAAGACCCTG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomV_f)	rDNA
1894	ATTCATCAGTAGGGTAAAACCTAAC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (25S-DomV_rev)	rDNA
1895	TAATACGACTCACTATAGGGGTTAC CGCAATAGTAATTGAACCTTA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_25S-DomVI_f)	rDNA
1896	ACAAATCAGACAACAAAGGCTTAA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (25S-DomVI_rev)	rDNA
1897	TAATACGACTCACTATAGGGTGCCT GTTTGAGCGTCATTTCTTC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_ITS2_for)	rDNA
1898	TACCTGATTTGAGGTCAAACCTTA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (ITS2_rev)	rDNA
1899	TAATACGACTCACTATAGGGGCTCG TGTAGCTCAGTGGTTAGAGC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Pr_Ile-tRNA_f)	rDNA
1900	TGCTCGAGGTGGGGTTTGAACCCA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (Ile-tRNA_rev)	rDNA
1952	TAATACGACTCACTATAGGGTATCT GGTTGATCCTGCCAGTAGTC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-P_18S-DomI_f)	rDNA
1953	CTTTAATATACGCTATTGGAGCTG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (18S-DomI_rev)	rDNA
1954	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTT GCAGTTAAAAGCTCGTAGT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-P_18S-DomII_f)	rDNA
1955	CTTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (18S-DomII_rev)	rDNA
1956	TAATACGACTCACTATAGGGGAATT GACGGAAGGGCACCACCAGG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-P_18S-Dom3_f)	rDNA
1957	TAATGATCCTTCCGCAGGTTCCACC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (18S-DomIII_rev)	rDNA
1958	GTTGTATTGAAACGGTTTTAATTG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (18S-DomIII+A2_r)	rDNA
1959	TTGTTACCTCTGGGCCCGATTGC	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (18S-DomIII+A3_r)	rDNA
1960	TAATACGACTCACTATAGGGGGATC ATTAAGAAATTTAATAATT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Prom_ITS1_for)	rDNA

1961	GCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (ITS1_rev)	rDNA
1962	TAATACGACTCACTATAGGGGGTTG CGGCCATATCTACCAGAAAG	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (T7-Prom_5S_for)	rDNA
1963	ATTGCAGCACCTGAGTTTCGCGTA	Klonierung von rDNA-Fragmenten mit T7-Promotor in pGEMT (5S_rev)	rDNA
2152	GGCGAATTGGGCCCGACG	Sequenzierung der rDNA-Fragmente in pGEMT (pGEMT-seq-for)	pGEMT
1964	TCGACGAGGGATCCGGCGCCCTGA AAATACAGGTTTTCCAGGATCTTATC GTCGTCATCCTTGAATCCATA	Einbau des Flag-Epitops in die MCS2 der Multibac-Plasmide mittels Primer-Annealing (FLAG-TEV_rev)	FLAG-Tag
1965	GATCTATGGATTACAAGGATGACGA CGATAAGATCCTGGAAAACCTGTAT TTTCAGGGCGCCGGATCCCTCG	Einbau des Flag-Epitops in die MCS2 der Multibac-Plasmide mittels Primer-Annealing (FLAG-TEV_for)	FLAG-Tag
1966	GATCTATGCATCACCATCACCATCA CGATTACGGATCCCTCG	Einbau des 6xHis-Tags in die MCS2 der Multibac-Plasmide mittels Primer-Annealing (6xHis_for)	His-Tag
1967	TCGACGAGGGATCCGTAATCGTGAT GGTGATGGTGATGCATA	Einbau des 6xHis-Tags in die MCS2 der Multibac-Plasmide mittels Primer-Annealing (6xHis_rev)	His-Tag
1968	TTTTTGTGCGACATGGGTAAAGTTTC TAAATC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc2-Sall_for)	Noc2
1969	TTTTTCTGCAGTTAAGCGTCTGACA TTCAA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc2-PstI_for)	Noc2
1970	TTTTTGTGCGACATGGCTAAGAGAAA TAGATC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc3-Sall_for)	Noc3
1971	TTTTTCTGCAGCTATTTAGAACACT CTTTAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc3-PstI_for)	Noc3
1972	TTTTTGGATCCATGGTAGCTTCCAC CAAAAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Rrp5-BamHI_for)	Rrp5
1973	TTTTTCTGCAGTTATTCGTCTGCTT TTGAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Rrp5-PstI_for)	Rrp5
1974	TTTTTGTGCGACATGAGTGAGAACAA CGGCAA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc1-Sall_for)	Noc1
1975	TTTTTCTAGATTAGTCTGAATCTT GATCTA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Noc1-XbaI_rev)	Noc1
1978	TTTTTGTGCGACATGAAATTGGATAC TTCTCA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Rio2-Sall_for)	Rio2
1979	TTTTTCTGCAGCTACTCTAGTATAT AGTTTC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Rio2-PstI_rev)	Rio2
1980	TTTTTGTGCGACATGTCTGAAGAAATT TAGCTC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Ltv1-Sall_for)	Ltv1
1981	TTTTTCTGCAGCTAAAATTTAAGC TGCTTA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Ltv1-PstI_rev)	Ltv1
1982	TTTTTGTGCGACATGGCAGGTCATTC ACACAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Tsr1-Sall_for)	Tsr1

1983	TTTTTCTGCAGTTACATACCATTCC AAGGTA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Tsr1-PstI_rev)	Tsr1
1984	TTTTTGTGCGACATGGCCAGAGCAT CCTCTAC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Enp1-Sall_for)	Enp1
1985	TTTTTCTGCAGTCAATTGACATCAA TCATTA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Enp1-PstI_rev)	Enp1
1986	TTTTTGTGCGACATGGACTTAAGAGT AGGAAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Hrr25-Sall_for)	Hrr25
1987	TTTTTCTGCAGTTACAACCAAATTG ACTGGC	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Hrr25-PstI_rev)	Hrr25
1988	TTTTTGTGCGACATGGGAAAGGCTG CGAAAAA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Dim1-Sall_for)	Dim1
1989	TTTTTCTGCAGTCATGAAAAATGGA TACCAA	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Dim1-PstI_rev)	Dim1
1990	TTTTTGTGCGACATGGTGTCTACACA TAACAG	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Krr1-Sall_for)	Krr1
1991	TTTTTCTGCAGCTAATTTGGTTTG GCTTGT	Klonierung des jeweiligen ORFs in MCS2 der Multibac-Vektoren (Krr1-PstI_rev)	Krr1
2153	ACCTATAAATATTCCGGA	For-Sequenzierung der MCS2 von Multibac- Vektoren (MultibacMCS2-seq)	MCS2 (Multibac)
2154	CTCTACAAATGTGGTATG	Rev-Sequenzierung der MCS2 von Multibac-Vektoren (Bac_SV40-rev_seq)	MCS2 (Multibac)

4.1.10 Puffer und Medien

Puffer

4x Lower Tris (SDS-PAGE)

1,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 8,8 mit HCl

4x Proteinprobenpuffer (SDS-PAGE)

0,25 M Tris/HCl pH 6,8
40 % Glycerin
8,4 % SDS
0,57 M β -Mercaptoethanol
Bromphenolblau
@ -20°C

4x Upper Tris (SDS-PAGE)

0,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 6,8 mit HCl
Bromphenolblau

5x DNA–Probenpuffer	15 ml Glycerin Bromphenolblau ad 50 ml mit 1x TE @ 4°C
10 x Formaldehyd–Laufpuffer (NB)	20 mM NaAc x 3 H ₂ O 0,2 M MOPS 10 mM EDTA pH 7 mit 2M NaOH
10x SDS-PAGE-Puffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS
10x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O pH 7,4 mit NaOH
5x TBE–Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat x 3 H ₂ O pH 7,0
AE–Puffer	50 mM Natriumacetat pH 5,3 10 mM EDTA
Westernblotpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,3
Calmodulin-Elutionspuffer für TAP-Aufreinigung	10 mM Tris/HCl pH 8 5 mM EDTA 50 mM NaCl
Hybridisierungspuffer für NB	5 x SSC 50 % Formamid 0,5% SDS 1 mg/ml BSA 1 mg/ml Ficoll 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidone

LiTSorb-Puffer für Hefe-Transformation	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA 1M Sorbitol
LiT-PEG-Puffer für Hefe-Transformation	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA 40% PEG3350
Lysepuffer für TAP-Aufreinigung	100 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 0,15 % NP40 1mM DTT 2 mM PMSF 1mM Benzamidin
Moviol für IF	2,4 g Moviol 25% Glycerin 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 ad 24 ml @ -20°C
PBST	1x PBS 0,05 % Tween 20
Puffer A200 für DYNA-Beads – IP	200 mM KCl 20 mM Tris/HCl pH 8 5mM MgAc 1mM DTT 0,5% Triton X-100 0,1% Tween20
Puffer A für Saccharosegradient	20 mM Hepes pH7,5 10 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1mM EGTA 1mM DTT +/- 100 µg/ml Cycloheximid @ 4°C
Solubilisierungspuffer für RNA (Agarosegel)	2 mM NaAc x 3 H ₂ O 20 mM MOPS 1 mM EDTA 8% Formaldehyd 50% Formamid deionisiert Bromphenolblau

Solubilisierungspuffer für RNA (PAA-Gel)	0,1x TBE 80% Formamid deionisiert 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
Tfb I	30mM KAc 50mM MnCl ₂ 100mM KCl 15%Glycerin pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen steril filtrieren
Tfb II	10mM MOPS 75mM CaCl ₂ 10mM KCl 15%Glycerin pH 7,0 mit verdünnter NaOH einstellen steril filtrieren

Soweit nicht anders angegeben werden die Puffer nach dem Autoklavieren für 20 Minuten bei 110°C bei Raumtemperatur gelagert.

Medien

LB	10 g Bacto™ Tryptone 5 g Bacto™ Yeast Extract 10 g NaCl ad 1 l
SOB Medium	5g Bacto Trypton 1,25g Bacto Yeast Extract 0.125g NaCl 0,625 ml 1M KCl ad 250ml H ₂ O pH 7,0 mit 10M NaOH einstellen autoklavieren vor Gebrauch 2,5 ml 1M MgCl ₂ (steril- filtriert) zugeben
SDC–Trp	2,68 g YNB 8 g Glucose 0,252 g CSM – His – Leu – Trp 8 ml Leu 1 mg/ml 8 ml His 1 mg/ml ad 400 ml

YPD	2,5 g Yeast extract 5 g Bacto peptone 5 g Glucose ad 250 ml
-----	--

Alle Medien werden 20 Minuten bei 110°C autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Für den Gebrauch als Platten werden die Medien mit 2% Agar versetzt.

4.1.11 Software

Adobe® Photoshop® 7.0
Adobe® Reader version 7.0
Axiovision LE version 4.2
Microsoft® Office 2007
MultiGauge
Data Explorer
GPS Explorer
4000 Series Explorer
MASCOT
LP-Data View v 1.03

Adobe®
Adobe®
Carl Zeiss Vision
Microsoft®
Fujifilm
Applied Biosystems
Applied Biosystems
Applied Biosystems
Matrix Science Ltd.
Biorad

4.2 Allgemeine Methoden

4.2.1 Arbeiten mit DNA

4.2.1.1 Polymerase–Kettenreaktion

Die Polymerase–Kettenreaktion (PCR) kann mit geeigneten Oligonukleotiden zur *in-vitro*–Amplifikation von DNA–Abschnitten verwendet werden (Saiki et al., 1985). Dazu wird doppelsträngige DNA mit zwei begrenzenden Oligonukleotiden einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primerhybridisierungen und DNA–Polymerisierungen in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter DNA–Polymerase ausgesetzt. Zur Klonierung spezieller Gene oder Genfragmente in definierte Vektoren haben die Oligonukleotide an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden, mit deren Hilfe Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt werden können. Zur Epitopmarkierung spezieller Gene in Hefezellen haben die Oligonukleotide an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden mit komplementären Sequenzen zu den genomischen Loci der jeweiligen Gene.

Um die DNA–Vorlage zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wird für den ersten Zyklus eine Denaturierungsdauer von 120 sec bei 95°C (Taq–Polymerase) bzw. 30 sec bei 98°C (iProof–Polymerase) gewählt. Für den letzten Zyklus wird eine Polymerisationsdauer von 600 sec benutzt, um bei 72°C vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wird anhand seiner Basenzusammensetzung abgeschätzt.

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die Zyklen automatisch gesteuert.

Reaktionsansatz Taq–Pol: 10 µl 10x Taq–Polymerase–Puffer
0,1 µg Plasmid–DNA pBS1479 (#96)
10 µl Oligonukleotid A (2,5 pmol/ml)
10 µl Oligonukleotid B (2,5 pmol/ml)
10 µl dNTP–Mix (10 mM)
1 µl Taq–Polymerase (Taq)
mit Wasser auf 100 µl auffüllen

Reaktionsansatz iProof–Pol: 20 µl 5x HF–Puffer
0,1 µg genomische Hefe–DNA
10 µl Oligonukleotid A (2,5 pmol/ml)
10 µl Oligonukleotid B (2,5 pmol/ml)
8 µl dNTP–Mix (10 mM)
1 µl iProof–DNA–Polymerase (iProof)
mit Wasser auf 100 µl auffüllen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA–Restriktionsfragmente durch Agarosegelelektrophorese wird die Bande des gewünschten DNA–Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zu je 100 mg Agarosegel werden jeweils 300 µl Gel-Solubilisierungspuffer gegeben. Die Probe wird zehn Minuten bei 50°C inkubiert und zwischendurch mehrmals durchmischt. Sobald sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat, wird ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben und durch invertieren gemischt. Danach wird die Lösung auf eine beiliegende Säule geladen. Nach Zentrifugation bei 20000 x g für 60 Sekunden wird der Durchfluss verworfen und die Säule mit 500 - 700 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Entfernung verbliebenen Ethanol wird die Säule erneut bei maximaler Geschwindigkeit ohne erneute Zugabe des Puffers zentrifugiert. Anschließend wird die Säule in ein sauberes Gefäß überführt und die DNA mit 30 bzw. 50 µl heissem Wasser (ca. 65°C) eluiert.

4.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA–Lösungen

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und –reinheit erfolgt durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einem Nanodrop® ND-1000–UV/Vis Spektrophotometer von Peqlab. Die Absorption bei 280 nm gibt den Proteingehalt der Lösung an, die Absorption bei 260 nm den DNA–Gehalt. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Durch Erstellen des Quotienten A_{260}/A_{280} erhält man die Reinheit der Nukleinsäureprobe; dieser liegt für saubere Proben bei 1,8. Bei einem Wert unter 1,8 befinden sich in der Probe Proteinverunreinigungen; bei einem Wert über 1,8 RNA–Verunreinigungen.

4.2.1.6 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Puffer und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA werden zwei bis zehn Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid – DNA wird ein bis zwei Stunden verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert.

4.2.1.7 Phosphatase – Behandlung von DNA – Fragmenten

Die 5'–Phosphatgruppen der Restriktionsfragmente werden mit Hilfe der Antarctic Phosphatase entfernt, um eine Religation des verwendeten Vektors zu verhindern. Dazu wird nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme der Phosphatasepuffer und die Phosphatase zugegeben. Die Dephosphorylierung erfolgt durch eine einstündige Inkubation bei 37°C. Danach wird die Reaktion durch eine zehn Minuten lange Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C gestoppt. Anschließend wird der Reaktionsansatz über das PCR–Purification–Kit von Invitrogen aufgereinigt.

4.2.1.8 Ligation hydrolysierter DNA

DNA-Fragmente werden mit der T4-DNA-Ligase verknüpft. Zur Verbindung überhängender Enden werden Ligationsansätze im entsprechenden Puffer zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation kleiner Fragmente (<1100 Bp) wird ein etwa vier- bis fünffach molarer Überschuss des Fragments eingesetzt; große Fragmente (>3000 Bp) werden mit der gleichen Menge Vektor ligiert. Die verwendeten Vektoren werden stets dephosphoryliert eingesetzt (siehe 4.2.1.7), um den Hintergrund religierter Vektoren zu minimieren.

4.2.1.9 Sequenzierung von DNA

Erhaltene Plasmide werden bei der Firma Geneart sequenziert. Der jeweilige Ansatz enthält 150 - 300 ng DNA mit 10 µM eines, die zu untersuchende Sequenz begrenzenden, Oligonukleotids in einem Gesamtvolumen von 8µl.

4.2.2 Arbeiten mit RNA

4.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA

Zur Abtrennung von Nukleinsäuren aus ganzen Zellen, proteinhaltigen Lösungen wie Zellextrakten oder von Beads eines Immunpräzipitationsansatzes werden Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt.

Dazu werden 1 OD₆₀₀ Zellen, die wässrige Lösung oder die zu analysierende Matrix auf 500µl mit AE-Puffer aufgefüllt, nach Zugabe von 50µl 10% SDS mit einem Volumen Phenol (in AE equilibriert) versetzt und gemischt. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich die enthaltenen Proteine zwischen beiden Phasen, in der sogenannten Interphase, anordnen. Nach vier Minuten Inkubation bei 65°C und zwei Minuten auf Eis wird der Ansatz zwei Minuten bei 20000g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und mit einem Volumen Phenol ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation bei 20000 g und 4°C wird erneut die wässrige Phase abgenommen. Durch die Zugabe von einem Volumen Chloroform wird die wässrige Lösung von restlichem Phenol befreit. Nach gründlichem Durchmischen beider Phasen und erneuter Zentrifugation wird die wässrige Phase abgenommen und eine Ethanol-Natriumacetat-Fällung durchgeführt.

4.2.2.2 Ethanol-Natriumacetat-Fällung von Gesamt-RNA

Zu der wässrigen Phase nach der Phenol-Chloroform-Extraktion wird Ethanol zu einer Endkonzentration von 70% (750 µl Ethanol auf 300 µl Chloroform) und Natriumacetat zu einer Endkonzentration von 80 mM (30 µl 3M Natriumacetat pH5,3 auf 300 µl Chloroform

und 750 µl Ethanol) gegeben. Bei sehr geringen RNA-Mengen in der Probe werden zusätzlich 4 µg Glykogen zugegeben, um die gefällte RNA sichtbar zu machen. Der Ansatz wird mindestens fünf Minuten bei -20°C inkubiert und bei 20000 g und 4°C fünf Minuten abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das RNA-Pellet in der entsprechenden Menge des jeweiligen Solubilisierungspuffers aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.2.2.3 Koaffinitätsreinigung von rRNA

Um Proteine und daran assoziierte (prä-) rRNA selektiv aus einem Zellextrakt zu präzipitieren wird die Affinität spezieller Antikörper zu diesen Proteinen oder zu angehängten Epitopen genutzt.

Der Zellextrakt wird dem Zellpellet einer 400 ml – Kultur in YPD-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,7 - 1,0 durch Aufschluss mit Glasperlen (0,75 – 1,0 mm) im jeweiligen Puffer gewonnen (4.2.4.3). Dabei erhält man aus einem Zellpellet von ca. 2 g 1 – 2 ml Zellextrakt einer Konzentration von ca. 20 mg/ml. Zur Immunpräzipitation werden 50µl einer im jeweiligen Puffer äquilibrierte Affinitätsmatix mit 15 – 20 mg Zellextrakt für 1 – 2 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend mehrmals mit dem entsprechenden Puffer gewaschen.

Hierbei coimmunopräzipitierte (prä-) rRNA kann nach RNA-Extraktion (4.2.2.1) im Northernblot (4.2.2.5) analysiert werden. Analog wird die RNA aus 200µg Zellextrakt isoliert und analysiert.

4.2.2.4 Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA werden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,2 % Agarose verwendet. Dazu werden 2,4 g Agarose mit 170 ml Wasser und 20 ml 10x Formaldehyd-Laufpuffer, pH 7,0, versetzt und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Nachdem die Mischung auf eine Temperatur unter 65°C abgekühlt ist, werden 10,8 ml 37%iger Formaldehydlösung und 3 µl Ethidiumbromidlösung (20mg/ml) hinzugegeben. Anschließend wird die Lösung in eine Flachbettgelapparatur gegossen. Die zu trennende RNA wird in Solubilisierungspuffer fünfzehn Minuten bei 65°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt über Nacht bei einer Spannung von 40 V. Die aufgetrennte RNA kann bei einer Wellenlänge von 254 – 366 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

4.2.2.5 RNA-Analyse mit der Northernblot-Technik (Kapillarblot)

Nach der Elektrophorese wird das RNA-Agarosegel zunächst fünf Minuten in Wasser und anschließend 20 Minuten in 50 mM NaOH gewaschen, um Ethidiumbromid und Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Nach Inkubation für 10 Minuten in 10x SSC erfolgt der Transfer der negativ geladenen RNA auf die positiv geladene Nylonmembran für zweieinhalb Stunden

in 10x SSC Lösung in einer Vakuum-Blotapparatur von Biorad. Die Membran wird nach dem Transfer in 2x SSC-Lösung kurz gewaschen, 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und zur Fixierung der RNA ca. 30 Sekunden im UV-Crosslinker bestrahlt.

Die Membran wird anschließend mit 2x SSC angefeuchtet und eine Stunde in Hybridisierungslösung bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (meist 30°C) inkubiert. 2 – 3 x 10⁶ cpm der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde (4.2.2.8) werden zugegeben und mit der Membran ca. 16 h im Hybridisierungsofen wie vorher inkubiert. Die Sonde bindet in dieser Zeit an ihre komplementäre Zielsequenz auf der Membran. Dann wird der Northernblot dreimal 10 Minuten mit 2 x SSC gewaschen, um nicht hybridisierte Sonde zu entfernen. Die gewaschene Membran wird in einer Folie auf einem Detektionsschirm (Imagerscreen von Fuji) exponiert und je nach erwarteter Signalintensität nach 3 Stunden bis 3 Tagen analysiert. Die rRNA-Signale wurden mit einem Phosphor Imager FLA3000 (FUJI) detektiert und mit dem Programm MultiGauge (Fujifilm) quantifiziert.

4.2.2.6 Auftrennung von RNA im denaturierenden Polyacrylamidgel

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von kleinen rRNA-Spezies werden denaturierende Polyacrylamidgele mit einer Endkonzentration von 8 % Polyacrylamid verwendet. Dazu werden 16,8 g Harnstoff mit 12 ml Wasser und 4 ml 5x TBE erhitzt und nach Abkühlen 10,6 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid) zugegeben. Die Polymerisation wird mit 200 µl 10% Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED gestartet. Die Mischung wird in vertikale Gelträger (Peqlab) gegossen und nach vollständiger Polymerisation über Nacht werden die im entsprechenden Solubilisierungspuffer erhitzten Proben aufgetragen und in 0,5x TBE bei ca. 150 V für 1 – 1,5 h aufgetrennt. Das Gel kann mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE gefärbt werden. Die aufgetrennte RNA kann dann bei einer Wellenlänge von 254 – 366 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

4.2.2.7 RNA-Analyse mit der Northernblot-Technik (Nasstransfer)

Nach der Elektrophorese wird das RNA-Polyacrylamidgel kurz in 0,5x TBE gewaschen. Der Transfer der negativ geladenen RNA auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgt für 1 – 1,5 Stunden bei 50 V in 0,5x SSC in einer Nasstransferapparatur (TransBlot™ von Biorad). Die Membran wird nach dem Transfer 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, zur Fixierung der RNA ca. 30 Sekunden im UV-Crosslinker bestrahlt und analog 4.2.2.5 hybridisiert.

4.2.2.8 Markierung von Oligonukleotidsonden mit radioaktivem γ -³²P-ATP

Oligonukleotide zur Hybridisierung von Northern Blots werden in einer Kinasierungsreaktion radioaktiv markiert:

Ansatz:

1 µl	Oligonukleotid (10µM)
1,5µl	10x Polynukleotidkinase–Puffer
6,5 – 8,5µl	H ₂ O
3 – 5µl	γ- ³² P–ATP (10µCi/µl, Hartmann Analytic)
1µl	T4-Polynukleotidkinase

Der Ansatz wird 45 Minuten bei 37°C inkubiert und die Kinasierung wird anschliessend durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA gestoppt. Nach Zugabe von 50 µl H₂O wird der Ansatz über eine Microspin6–Säule gereinigt, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. 1 µl des Ansatzes wird im Szintillationszähler ausgezählt. Die markierte Sonde kann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

4.2.2.9 Auftrennung von RNA im nativen Polyacrylamidgel

Zur nativen gelelektrophoretischen Auftrennung von kleinen rRNA-Fragmenten werden Polyacrylamidgele mit einer Endkonzentration von 5% Polyacrylamid verwendet. Dazu werden 14,6 ml Wasser und 2 ml 5x TBE erhitzt und nach Abkühlen 3,4 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid) zugegeben. Die Polymerisation wird mit 120 µl 10% Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED gestartet. Die Mischung wird in vertikale Gelträger (Peqlab) gegossen und nach vollständiger Polymerisation über Nacht werden die mit 3 µl 50% Glycerin versetzten Proben aufgetragen und in 0,5x TBE bei ca. 150 V für 1 – 1,5 h aufgetrennt. Das Gel kann mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5 x TBE gefärbt werden. Die aufgetrennte RNA kann dann bei einer Wellenlänge von 254 – 366 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

4.2.2.10 *In vitro*–Transkription von RNA–Fragmenten

Zur *In vitro*–Transkription von rRNA–Fragmenten werden DNA–Matrizen, die die Sequenz des T7-Promoters vor der eigentlichen TSS (Transkriptionsstartstelle) enthalten, mithilfe der T7–RNA–Polymerase transkribiert:

Ansatz:

5 µl	DNA–Matrize (ca. 10 ng / 100 Bp Länge)
4 µl	5x T7-Transkriptionspuffer
6 µl	H ₂ O
Je 1 µl	20mM ATP, CTP, UTP, GTP
0,5 µl	rRNAsin
0,5 µl	T7 RNA Polymerase

Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion wird anschliessend durch Einfrieren des Ansatzes bei -20°C gestoppt. Die Effizienz der Transkription kann durch Auftragen des Ansatzes auf denaturierende (4.2.2.4) oder native (4.2.2.9) Polyacrylamidgele untersucht werden.

4.2.2.11 *In vitro*-Transkription von RNA-Fragmenten in Anwesenheit von radioaktivem α -³²P-GTP

Zur radioaktiven Markierung von RNA-Fragmenten wird der T7-Transkriptionsansatz in Anwesenheit von α -³²P-GTP angesetzt:

Ansatz:

- 5 μ l DNA-Matrize (ca. 10 ng / 100 Bp Länge)
- 2 μ l 10x T7-Transkriptionspuffer (NEB)
- 7,1 μ l H₂O
- Je 0,5 μ l 20mM ATP, CTP, UTP
- 2,4 μ l 200 μ M GTP
- 0,5 μ l rRNAsin
- 0,5 μ l α -³²P-GTP (10 μ Ci/ μ l, Hartmann Analytic)
- 0,5 μ l T7-RNA-Polymerase (NEB)

Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion wird anschliessend durch Einfrieren des Ansatzes bei -20°C gestoppt. Die Effizienz der Transkription kann durch Auftragen des Ansatzes auf denaturierende (4.2.2.4) oder native (4.2.2.9) Polyacrylamidgele untersucht werden.

4.2.3 Arbeitstechniken mit *Escherichia coli*

4.2.3.1 Transformation von *Escherichia coli*

4.2.3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

400 ml SOB-Medium werden mit ca. 4 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,35 – 0,6 erreicht ist. Die Zellen werden fünfzehn Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 6.000 upm und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit insgesamt 600 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschliessend werden die *E. coli*-Zellen in 10 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und bei 5.000 upm und 4°C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1,5 ml 10%igem Glycerin werden 50 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

100 ng Plasmid-DNA oder 1 – 2 μ l eines Ligationsansatzes werden mit 40 μ l elektrokompenten *E. coli*-Zellen in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt in einer Elektroporationsapparatur bei folgenden Einstellungen: 6 ms, 2,5 kV, Ec2. Anschliessend werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 45 – 60

Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden Aliquots der Suspension auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausgebracht und bei 37°C inkubiert.

4.2.3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

200 ml SOB-Medium werden mit einer *E. coli*-Übernachtkultur (in SOB-Medium) auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bei 37°C 1 – 1,5 h kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 erreicht ist. Die Zellen werden auf 50 ml –Röhrchen aufgeteilt und bei 4500 upm und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Jedes Pellet aus 50 ml Kultur wird in 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4500 upm und 4°C für zehn Minuten werden die Zellen in insgesamt 4 ml TfbII-Puffer pro 200 ml Kultur aufgenommen und 10-20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden in 100µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

4.2.3.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen inkubiert man die Zellen mit 10 – 100 ng zu transformierender DNA für 5 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 40 sec werden die Zellen erneut 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium werden die Zellen schüttelnd bei 37°C inkubiert: 1h bei 37°C für die Transformation von 8c-Zellen, 8h bis über Nacht bei 37°C für DH10Bac-Zellen. 10 - 100% des Transformationsansatzes werden auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Spectinomycin, 7 µg/ml Gentamycin und/oder 10 µg/ml Tetracyclin) ausplattiert und bei 37°C inkubiert bis sich deutliche Einzelkolonien bilden.

Für die Blau/Weiss-Selektion in DH10Bac-Zellen werden die LB-Platten zusätzlich mit 0,5mM IPTG + 125µg/ml Blue-Gal versetzt.

4.2.3.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

4.2.3.2.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Minimaßstab

Um bis zu 30 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu gewinnen, wird das FastPlasmid™ Mini Kit von der Firma Eppendorf benutzt. Dabei wird die Aufreinigung laut den vom Hersteller angegebenen Protokollen durchgeführt. Die Plasmid-DNA wird mit 30 – 50 µl heissem Wasser (65°C) eluiert.

4.2.3.2.2 Aufreinigung von Bacmid-DNA

Zur Isolierung von Bacmid-DNA aus DH10Bac-Zellen nach T7-Transposition und Blau/Weiss-Selektion wird der entsprechende Bakterienklon steril in 15 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 7 µg/ml Gentamycin und/oder 10

µg/ml Tetracyclin) angeimpft. Die Zellen werden bei 37°C kultiviert, bis die Zellen die stationäre Phase erreichen (über Nacht ca. 16 – 20 h). Die Zellen werden durch abzentrifugieren für 10 min bei 4000 upm und Raumtemperatur geerntet und in 0,3 ml 15 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA (sterilfiltriert und bei 4°C gelagert) resuspendiert. Anschliessend werden 0,3 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS (sterilfiltriert) zugegeben und vorsichtig durch invertieren gemischt. Die Lösung wird 5 min bei RT inkubiert, wobei die Lösung fast durchsichtig werden sollte. Nach langsamer Zugabe von 0,3 ml 3M Kaliumacetat-Lösung pH5,5 (autoklaviert und bei 4°C gelagert) bildet sich ein Präzipitat aus Protein und genomischer DNA. Die Probe wird 5 – 10 min auf Eis inkubiert und bei 14000 g und RT für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 14000 g und RT für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird erneut in ein neues Reaktionsgefäß mit 0,7 ml Isopropanol überführt. Die Probe wird durch mehrmaliges Invertieren gemischt und mindestens 30 min oder auch über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren der Probe für 15 min bei 14000 g und 4°C wird der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wird mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der ÜS wird vollständig entfernt und das DNA-Pellet bei RT für 5-10 min an der Luft getrocknet. Nach vorsichtigem Lösen der DNA in 40 – 80 µl sterilem Wasser wird die Konzentration der Lösung bestimmt (4.2.1.5). Die DNA-Lösung kann bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden, darf aber nicht eingefroren werden.

4.2.4 Arbeitstechniken mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.4.1 Lithiumacetat-Transformation von Hefezellen

Für eine effiziente Transformation werden die Hefezellen frisch kompetent gemacht.

Eine Hefekultur wird in 50 ml YPD über Nacht bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 – 0,7 kultiviert. Die Zellen werden 3 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Die Zellen werden erst mit 25 ml sterilem Wasser und dann mit 5 ml LiTSorb-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wird anschliessend in 360 µl LiTSorb-Puffer resuspendiert und mit 40 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml, 10 min bei 100°C erhitzt) versetzt. Die kompetenten Zellen werden in 50 µl –Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur genomischen Epitopmarkierung in Hefezellen werden ca. 1 – 5 µg des jeweiligen PCR-Produkts zu 50 µl kompetenter Hefezellen gegeben und gut durchmischt. Nach Zugabe von 300 µl LitPEG-Puffer wird der Ansatz 30 min auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 39 µl DMSO zugegeben und durch pipettieren sorgfältig gemischt. Danach erfolgt bei Wildtypzellen ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C; bei temperatursensitiven Mutanten wird der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Die Ansätze werden nun für 2 min bei ca. 3000 g abzentrifugiert und das Pellet anschliessend in 100 µl sterilem

Wasser resuspendiert. Der gesamte Ansatz wird danach auf eine entsprechende Minimalmedium–Agarplatte (SDC-Trp) ausplattiert und zwei bis drei Tage bei 30°C (Wildtyp) oder 24°C (ts-Mutante) inkubiert. Nach einem Reinigungsausstrich erhaltener Kolonien werden die Zellen im Westernblot auf die Expression des gewünschten Proteins getestet.

4.2.4.2 Denaturierende Proteinextraktion aus Hefezellen

Zur denaturierenden Extraktion von Proteinen aus Hefezellen wird eine Hefekultur in 20 ml des entsprechenden Mediums bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 3 angezogen. Es werden je nach Dichte der Kultur 1 – 5 ml bei 3000 g und 4°C geerntet und in 1 ml kaltem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Vorbehandlungslösung (7,5% β -Mercaptoethanol, 1,85 M NaOH) werden die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteine werden durch Zugabe von 150 µl 55% TCA und eine 15 Minuten Inkubation auf Eis gefällt und anschließend zehn Minuten bei 20000 g und 4°C abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wird das Pellet in 50 µl 1x Proteinprobenpuffer resuspendiert. Sollte dabei ein Farbumschlag der Probe nach gelb auftreten, wird mit Ammoniakdampf bis zur erneuten Blaufärbung neutralisiert. Die Probe wird fünf Minuten bei 95°C inkubiert und bei 20000 g eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Eine entsprechende Menge des Überstands wird auf einem SDS–Gel analysiert.

4.2.4.3 Native Proteinextraktion aus Hefezellen

Zur nativen Proteinextraktion aus Hefezellen werden diese in YPD–Flüssigmedium zunächst bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 – 1,0 kultiviert. Die Zellen werden geerntet, mit H_2O gewaschen und können bei -20°C gelagert werden. Zum Aufschliessen der Zellen werden diese in einem Volumen des jeweiligen Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit gekühlten Glasperlen versetzt. Danach werden die Ansätze für 45 min im automatischen Vibrax bei mindestens 14000 upm und 4°C geschüttelt. Nach dem Aufschluss wird für 15 min mit 13000 upm (20000 g) bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (4.2.6.1).

4.2.4.4 Genomische Epitopmarkierung von Proteinen

Zur genomischen Integration des TAP–Epitops am C–Terminus von Zielgenen wird zunächst eine PCR (4.2.1.1) mit Oligonukleotiden, die an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden mit komplementären Sequenzen zu den genomischen Loci der jeweiligen Gene enthalten, durchgeführt. Als Matrize dient hier der Vektor pBS1479 (Puig et al., 2001) mit der Sequenz des TAP–Epitops und eines Tryptophan-Auxotrophiemarkers. Nach Reinigung wird das entstandene PCR–Produkt in kompetente Hefezellen transformiert (4.2.4.1), wobei das TAP–Epitop durch homologe Rekombination vor dem Stoppcodon des

Zielgens eingefügt werden soll. Positiv transformierte Hefezellen können durch erhaltene Tryptophan–Prototrophie identifiziert werden.

4.2.4.5 Immunfluoreszenzlokalisierungen

4.2.4.5.1 Vorbereiten der Objektträger

Vor Gebrauch müssen die Aussparungen auf den verwendeten Objektträgern \varnothing 14 mm (Menzel-Gläser) mit poly-L-Lysin 0,1% der Firma Sigma Diagnostics beschichtet werden, wodurch aufgrund elektrostatischer Effekte die Haftung der Zellen an der Glasoberfläche verbessert wird.

Dazu werden auf die sauberen Objektträger je 20 μ l poly-L-Lysin 0,1% pro Aussparung gegeben und ca. 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und die Objektträger mindestens drei Stunden, meist aber über Nacht, getrocknet.

4.2.4.5.2 Fixierung der Hefezellen

Die Fixierung logarithmisch wachsender Hefezellen erfolgt mit 3,36% Formaldehyd. Dabei werden die Zellen permeabilisiert und das Zellinnere wird für Antikörper leichter zugänglich. Die Proteine in der Zelle werden zusätzlich durch Denaturierung und Vernetzung stabilisiert. 5 ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur einer OD_{600} von ca. 0,5 werden mit 0,5 ml 37% Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 3,36% versetzt und eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 3000 g für zehn Minuten werden die Zellen mit 1 ml 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH7,5 gewaschen.

4.2.4.5.3 Spheroplastieren der Hefezellen

Um das Innere der Hefezellen für Antikörper zugänglich zu machen, muss die 100 – 200 nm dicke Zellwand der Hefezelle enzymatisch entfernt werden. Die zu 80 – 90 % aus Polysacchariden (u.a. Chitin) bestehende Zellwand wird durch die verwendete Zymolyase hydrolytisch gespalten.

Die fixierten Zellen werden jeweils in 1 ml 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH7,5 mit 50 μ g/ml Zymolyase 100T und 2 μ l / ml β -Mercaptoethanol aufgenommen und ca. 30 Minuten bei 30°C in kleinen Petrischalen unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 4°C und 3000 g für fünf Minuten werden die Zellen in 1 ml TBS aufgenommen.

Die Spheroplasten können unter dem Mikroskop analysiert werden. Sie erscheinen leicht durchsichtig und dunkelgrau, während Zellen mit intakter Zellwand deutlich heller sind.

4.2.4.5.4 Immunlokalisation von Proteinen in fixierten Hefezellen

Um Proteine in der Hefezelle sichtbar zu machen, verwendet man Primärantikörper gegen diese Proteine und bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszierende Sekundärantikörper, deren Signale unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.

50 µl der Spheroplastensuspension werden auf die beschichteten Aussparungen auf den Objektträgern gegeben und fünf bis zehn Minuten bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um die Spheroplasten auf der Glasoberfläche anhaften zu lassen. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden dreimal mit 50µl TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu minimieren werden die Zellen für 30 min bei RT mit 50µl TBS/2%BSA/0,1%NP40 inkubiert. Die Spheroplasten werden dreimal mit je 50µl TBS/0,1%NP40 gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in 50µl TBS mit 0,1% BSA inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird durch viermaliges Waschen mit je 50µl TBS/0,1%NP40 entfernt. Nach Zugabe des fluoreszierenden Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:500 in 50µl TBS/0,1%BSA werden die Spheroplasten für eine weitere Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird wie vorher gewaschen und die Zellen werden mit 3 – 4 µl DAPI 1µg/ml in Moviol überschichtet und mit Deckgläsern Ø 15 cm bedeckt. Der fluoreszierende Farbstoff DAPI färbt dabei durch Einlagerung in die DNA den Zellkern der Hefespheroplasten an.

Die Proben können so mehrere Tage bei 4°C in Dunkeln gelagert werden und mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M mit einem 63x/1.40-Ölobjektiv analysiert werden. Dazu werden folgende Filter verwendet: Filter 49 DAPI für DAPI – Analyse, Filter 37 Wildtyp – GFP zur Analyse von AlexaFluor® 488 und Filter 20 Rhodamine zur Analyse von AlexaFluor® 594. Die Expositionszeiten werden je nach Signalintensität variiert.

4.2.5 Arbeitstechniken mit SF21 Insektenzellen

4.2.5.1 Anzucht von SF21 Insektenzellen

Beim Animpfen von Sf21 Insektenzellen aus Dauerkulturen werden 60×10^6 Zellen zügig in 60 ml des jeweiligen Mediums angeimpft, sodass die Zelldichte bei 1×10^6 Zellen/ml liegt. Sollen die Zellen nach Wachstum für 3 – 4 Generationszeiten mit Bacmid transfiziert werden, wird Sf-900 II Medium von Invitrogen verwendet; bei geplanten Baculovirus – Infektionen wird PAA – Medium verwendet. Die Medien enthalten jeweils zusätzlich 63 mg/l Penicillin (Pen), 50 mg/l Streptomycin (Strep) und 10 % Fötale Rinderserum (FCS). Die Zellen werden in 500 ml Spinner-Flaschen bei 27°C und 75 upm kultiviert. Nach ca. 12 – 24 h werden 50ml frisches Medium +10% FCS, + Pen/Strep zugeben, sodass die Zelldichte bei

ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml liegt. Nach ca. 48 h beginnen die Zellen sich zu teilen. Ab diesem Zeitpunkt muss darauf geachtet werden, dass die Zellen sich ständig im logarithmischen Wachstum befinden, d.h. im Bereich von Zelldichten zwischen $0,5 \times 10^6$ und 2×10^6 Zellen/ml.

Das Wachstum der Zellen sollte deshalb regelmäßig verfolgt werden. Dazu werden lebende Zellen mit Trypan-Blau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Auch die Anzahl an toten Zellen muss bestimmt werden, wobei der Anteil an lebenden Zellen 95 – 100 % der gesamten Zellzahl ausmachen sollte.

Zur weiteren Anzucht der Zellen werden diese im entsprechenden Medium auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt.

Nachdem sich die Zellen 3 – 4 x geteilt haben, können sie für Transfektionen, Infektionen oder zur Herstellung von Dauerkulturen verwendet werden.

4.2.5.2 Herstellen von SF21 Dauerkulturen

Dauerkulturen von SF21 sollten so hergestellt werden, dass pro Dauerkultur 60×10^6 Zellen verwendet werden. Dafür werden gut wachsende SF21 Zellen (P5-10) einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen/ml in größerer Menge (ca. 200ml) Medium (+FCS, +Pen/Strep) angezogen. Nach Bestimmung der Zellzahl wird die Menge der Kultur, die 60×10^6 SF21 Zellen entspricht, bestimmt und steril in 50 ml Röhrchen abgefüllt. Nach Zentrifugation bei 800upm, 10min, RT wird der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in je 1ml Medium + 30% FCS + 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen werden in sorgfältig beschrifteten Kryo-Tubes (Datum, Passage, Art der Zellen, verwendetes Medium) zügig in auf -20°C temperiertem Isopropanol weggefroren. Nach 24 h werden die Dauerkulturen auf -80°C gebracht, wo sie für mehrere Monate gelagert werden können. Zur langfristigen Lagerung von SF21 Dauerkulturen werden diese in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.5.3 Transfektion von SF21 Zellen und Gewinnung von Viruslösung V0

Zur Transfektion von SF21 Zellen werden logarithmisch wachsende Zellen einer Dichte von $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in Sf-900 II Medium von Invitrogen (+FCS, +Pen/Strep) verwendet.

Pro Well werden $0,5 - 1,0 \times 10^6$ SF21 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und die Zellsuspension pro Well auf 2 ml mit Medium aufgefüllt. Durch leichtes Schütteln werden die Zellen im Well verteilt und für 15 min bei RT inkubiert. Hierbei sollten sich die Zellen absetzen und am Boden des Wells adherieren.

Parallel wird Bacmid-DNA für zwei parallele Transfektionen vorbereitet. Pro Ansatz werden ca. 50 – 100 μg Bacmid-DNA mit 100 μl serumfreien Sf-900 II Medium (–FCS, –Pen/Strep!) vorsichtig in einem Reagiergefäß gemischt.

Pro Ansatz wird das verwendete Zellfektin-Reagenz vorbereitet: 100 μl Sf-900 II serumfreies Medium (–FCS, –Pen/Strep!) wird in ein Reagiergefäß vorgelegt und 6 μl des gut

resuspendierten Zellfektin-Reagenzes vorsichtig zugegeben. Die beiden Ansätze der Bacmid-DNA und des Zellfektin-Reagenzes werden anschliessend vorsichtig gemischt und für 15 – 45 min bei Raumtemperatur gemischt, wobei sich die DNA-Zellfektin-Lipid-Komplexe bilden, die später in die Zellen aufgenommen werden können.

Wenn sich die Insektenzellen in den 6-Well abgesetzt haben, wird das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 2 ml serumfreien Sf-900 II Medium gewaschen. Die DNA-Zellfektin-Mischung wird mit 0,8 ml serumfreien Sf-900 II Medium verdünnt und komplett zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schütteln verteilt. Parallel wird eine Mock-Kontrolle ohne Bacmid, nur 1ml serumfreien Sf-900 II Medium, angesetzt. Die 6-Well werden mit Parafilm umwickelt, um Kontaminationen zu vermeiden, und bei 27°C für 5 h inkubiert. Nach Inkubation wird die DNA-Zellfektin-Mischung von den Zellen abgesaugt. Nach Zugabe von 3 ml Sf-900 II Medium +FCS +Pen/Strep auf die Zellen in jedem Well werden diese wieder mit Parafilm umwickelt und weiter bei 27°C inkubiert. Nach 48 – 60 h wird der Überstand abgenommen und für jedes Bacmid vereinigt, d.h. pro transfiziertem Bacmid erhält man ca. 6 ml Virusstock V0, der bei 4°C gelagert werden kann.

Pro Well können anschliessend weitere 3ml Sf-900 II Medium +FCS +Pen/Strep zugegeben werden und die Zellen nach Inkubation für weitere 24 - 48 h bei 27°C mit einem Zellschaber abgelöst werden. Nach Waschen mit 1 ml 1 x PBS können die Zellen zunächst bei -20°C gelagert werden. Die Expression der gewünschten Proteine kann nach Zugabe von Protein-Probenpuffer direkt im WB/Coomassie untersucht werden.

Generell kann bei Verwendung des eYFP-Bacmids (d.h. im Bacmid ist ein eYFP-Gen enthalten) die Effizienz der Proteinexpression und damit der Transfektion verfolgt werden.

Dazu werden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M unter Verwendung eines entsprechenden Filters analysiert und photographisch dokumentiert.

4.2.5.4 Low-MOI Infektion von SF21 Insektenzellen mit Viruslösung V0

Zur Amplifikation von Baculoviren wird eine Low-MOI-Infektion (low Multiplicity of infection = geringe Vielfachheit der Infektion) mit dem Virusstock V0 durch geführt. Dazu werden logarithmisch wachsende SF21 Zellen in 50 ml PAA-Medium mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml (insg. 25×10^6 Zellen) in einer 500ml-Spinner-Flasche angesetzt. Zur Infektion werden 10 – 50 μ l V0-Stock zugeben und die Zellen bei 27°C unter Rühren (75upm/min) inkubiert. Nach 24, 48, 72 h wird die Zellzahl bestimmt und die Zelldichte immer wieder auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Wenn keine Zellteilung mehr erfolgt (meist nach ca. 72 h) wird der Zeitpunkt des Wachstumsstopp ermittelt. Von diesem Zeitpunkt an nach 48 h wird der Überstand durch zentrifugieren bei 800 upm, 15 min, RT gewonnen. Dieser Virusstock V1 wird bei 4°C gelagert und für nachfolgende Infektionen verwendet.

Parallel können die geernteten Zellpellets in flüssigen Stickstoff weggefroren werden und für eine Testaufreinigung verwendet werden.

4.2.5.5 Titration der Viruslösung V1

Um für nachfolgende Infektionen ein optimales Virus-Zellen-Verhältnis zu bestimmen, wird eine Titration der Viruslösung V1 durchgeführt.

Dazu werden pro Virus 6 x je $1,0 \times 10^6$ logarithmisch wachsende SF21 Zellen in 6-Well ausgelegt und auf 2 ml mit PAA-Medium +FCS +Pen/Strep aufgefüllt. Die Zellen werden durch leichtes Schütteln im Well verteilt und für 15 min bei RT inkubiert, wobei sich die Zellen absetzen sollten. Nach Absaugen des Mediums werden je 2 ml frisches PAA-Medium +FCS +Pen/Strep und 0, 1, 5, 25, 50, 100 μ l V1-Stock zugegeben und bei 27°C inkubiert. Nach 24 und 48 h wird jeweils mit dem Fluoreszenz-Mikroskop der Anteil leuchtender = infizierter Zellen ermittelt. Nach 48 h sollte ein Großteil der Zellen infiziert sein. Die Zellen von jedem Ansatz werden mit einem Zellschaber abgelöst, mit 1x PBS waschen und bei -20°C gelagert. Nach Aufschluss der Zellen kann eine Testreinigung im kleinen Maßstab durchgeführt werden, um das optimale Verhältnis von zugegebenem Virus V1 zu infizierten Zellen zu bestimmen. Erfahrungsgemäß liegt dies meist bei ca. 5 – 25 μ l / 10^6 Zellen.

4.2.5.6 Infektion von SF21 Insektenzellen mit optimalem V1/Zell-Verhältnis

Logarithmisch wachsende SF21 Zellen werden angezogen und das Kulturvolumen bis auf mindestens 200ml PAA-Medium in einer 500ml Spinner-Flasche erhöht. Die Zelldichte sollte bei ca. 1×10^6 Zellen / ml (insg. 200×10^6 Zellen) liegen. Nach Zugabe von Viruslösung V1 im optimalen Verhältnis (4.2.5.5) werden die Zellen bei 27°C unter Rühren (75 upm/min) für 48 h inkubiert. Die infizierten, stark leuchtenden Zellen werden durch Zentrifugation geerntet und in Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.5.7 Aufschluss von SF21 Insektenzellen

In flüssigen Stickstoff eingefrorene und bei -80°C gelagerte SF21 Zellpellets werden mit 1 ml Lysepuffer / 10^6 Zellen versetzt und gut resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, werden diese anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Dies wird noch zweimal wiederholt und restliche Zellen durch Ultraschallbehandlung (5 x 30 sec kontinuierlich, dazwischen 30 sec Pause) im Eisbad aufgeschossen. Unlösliche Bestandteile dieses Zellextrakts werden durch Zentrifugation bei 4500upm, 15min, 4°C abgetrennt. Der dabei erhaltene Überstand enthält lösliche Proteine und wird als Gesamtzellextrakt für Immunoprecipitationsuntersuchungen verwendet.

4.2.6 Proteinbiochemische Methoden

4.2.6.1 Konzentrationsbestimmung in Zelllysaten nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen (Bradford, 1976) wird mit Hilfe des BIORAD-Protein-Assays bestimmt. Das Prinzip dieser Proteinbestimmung ist eine Farbänderung des

Farbstoffes Coomassie® Brillant Blue G-250 nach Zugabe der Proteinlösung: Die Wellenlänge des Absorptionsmaximum des sauren Farbstoffs verschiebt sich von 465 nm nach 595 nm, wenn der Farbstoff an vorhandenes Protein bindet.

Der zu bestimmende Proteinextrakt wird mit 1:5 in Wasser verdünnter Biorad-Lösung versetzt und nach fünf Minuten wird die Extinktion des entstandenen Farbstoff-Protein-Komplexes bei 595 nm vermessen.

Die Proteinkonzentration lässt sich dann folgendermaßen abschätzen:

$$c = \frac{OD_{595} \cdot 23 \text{ mg}}{V_{\text{eingesetzt}} \text{ ml}}$$

4.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgt durch vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in 1x SDS-Laufpuffer bei 150 – 180 V. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine werden 7,5 – 15 % Gele verwendet.

Die Proteinproben werden mit 4x-Proteinprobenpuffer versetzt, drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf das Sammelgel geladen. Als Proteinmarker dient der Prestained Protein-Marker Broad Range von New England BioLabs bei anschließendem Semi-Dry-Transfer auf eine PVDF-Membran (4.2.6.5) und der Unstained Protein-Marker Broad Range von New England BioLabs bei Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau (4.2.6.3).

4.2.6.3 Coomassie-Blau-Färbung

Die Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgt mit Coomassie Brillant Blue R-250.

Die Empfindlichkeit der Anfärbung liegt bei 0,3 – 1 µg Protein pro Bande. Hierzu wird das Gel nach dem Lauf für eine Stunde in der Färbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 1g Coomassie-Blau R-250 auf 1l) geschüttelt und danach so lange in der Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt, bis alle nichtgebundenen Farbstoffkomplexe entfernt sind. Anschließend wird das Gel im Vakuum-Geltrockner bei 80°C zwei Stunden getrocknet.

4.2.6.4 Silberfärbung

Alternativ kann bei geringeren Proteinkonzentrationen eine Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Silbernitrat erfolgen. Die Empfindlichkeit dieser Anfärbung liegt bei bis zu 1 ng Protein pro Bande. Hierzu wird das Gel nach dem Lauf für eine Stunde in der Fixierlösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,0185% Formaldehyd) geschüttelt, für 20 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen und anschließend für eine Minute in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Nach Waschen mit Wasser für dreimal eine Minute erfolgt die Färbung des Gels mit Silbernitratlösung (0,1 % (w/v) AgNO₃, 0,02775% Formaldehyd).

Nach erneutem Waschen mit Wasser für dreimal eine Minute wird das an die Proteine im Gel gebundene Ag^{2+} zu metallischem Silber reduziert, wodurch eine Färbung der Proteinbanden erreicht wird. Dazu wird das Gel für wenige Minuten entwickelt (0,0185% Formaldehyd, 6% Natriumcarbonat (w/v), 0,0005 % (w/v) Natriumthiosulfat). Wenn die gewünschte Bandenstärke erreicht ist, wird die Reaktion durch Überführen des Gels in 1% Essigsäure abgestoppt.

4.2.6.5 Westernblot–Proteintransfer

Mit Hilfe des Semi–Dry–Transfer–Verfahrens werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf Membranen übertragen. Dazu wird eine zunächst mit Methanol, dann mit Blotpuffer befeuchtete ImmobilonTM–PSQ 0,2 μm –Membran von Millipore auf drei Lagen ebenfalls in Blotpuffer getränkte 3MM Filterpapiere gelegt. Nach der Elektrophorese wird das SDS–Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit weiteren drei Lagen feuchten 3MM Filterpapieren bedeckt. Dieser Aufbau wird so zwischen die Elektroden einer Semi–Dry–Apparatur (Biorad) gelegt, dass die negativ geladenen Proteine Richtung Anode auf die Membran übertragen werden. Der Transfer erfolgt für eine Stunde bei 24 V.

4.2.6.6 Ponceaufärbung von membrangebundenen Proteinen

Zur Kontrolle des Transfers auf die Blotmembran im Westernblot werden die transferierten Proteine durch Ponceau S (0,5 % Ponceau in 1 % Essigsäure) reversibel angefärbt.

4.2.6.7 Detektion von Proteinen im Westernblot

Die Blotmembran wird nach dem Proteintransfer für mindestens eine Stunde mit 5 % Milchpulver in PBST abgesättigt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper in der jeweils angegebenen Verdünnung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran dreimal je fünf bis zehn Minuten mit PBST–Puffer gewaschen und dann mit dem Meerrettich–Peroxidase–gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 30 – 40 Minuten inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBST–Puffer für je fünf Minuten entfernt. Die Immunmarkierung wird nun mit Hilfe des BM Chemilumineszenz–Blotting–Substrates (POD) von Roche sichtbar gemacht. Dabei katalysiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich–Peroxidase die Umsetzung von Diacylhydraziden wie Luminol, was zu einer Lichtreaktion bei 430 nm durch Chemilumineszenz führt.

Hierzu werden entsprechende Volumina der Detektionsreagentien 1 und 2 gemischt und auf die Proteinseite der Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 1 min bei RT wird der Blot

luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt und die Chemilumineszenz–Signale werden mit Hilfe des Fluoreszenz–Image Readers LAS-3000 der Firma Fujifilm detektiert.

4.2.6.8 Polyribosomenpräparation aus Hefe

Zur Präparation von Polysomen aus *S. cerevisiae* werden zu 100 ml einer Hefe–ÜN–Kultur einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 10 mg Cycloheximid gegeben. Cycloheximid verhindert als Translationselongationshemmstoff ein Zerfallen der Polysomen beim anschließenden Zellaufschluss (Baliga et al., 1969). Die Zellen werden 15 min bei der jeweiligen Wachstumstemperatur unter Schütteln inkubiert und schließlich 15 min auf Eis abgekühlt. Die Kultur wird mit ca. 3000g drei Minuten bei 4°C abzentrifugiert und mit 10 ml kaltem Puffer A gewaschen. Je 0,4 g Zellpellet werden in 0,6 ml Puffer A resuspendiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

Zum Aufschließen der Zellen werden zu obigem Ansatz 1,4 g Glaskugeln (\varnothing 0,5 mm) zugegeben und 45 min mit Hilfe eines Vibrax bei 4°C aufgeschlossen. Die Glaskugeln werden bei 20000 g und 4°C zehn Minuten abzentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes wird mit Hilfe des Bradford – Protein – Assays (4.2.6.1) bestimmt.

4.2.6.9 Dichtegradientenzentrifugation zur Auftrennung ribosomaler Partikel

600 µg der Extrakte der Polysomenpräparation (4.2.6.8) werden auf einen 10 – 50%igen Saccharosegradienten in Puffer A ohne DTT und Cycloheximid geladen, um die verschiedenen ribosomalen Partikel aufzutrennen. Dazu wird 2,5 h bei 39000 upm und 4°C in einem SW40–Rotor in einer Ultrazentrifuge ohne Abbremsen zentrifugiert. Jeder Gradient wird mit dem BioLogic LP Chromatographiesystem von Biorad in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert und die jeweils enthaltenen Nukleinsäuren werden bei 254 nm parallel vermessen.

Um zu untersuchen welche Proteine in welchen Fraktionen zu finden sind, werden diese einer TCA–Fällung (4.2.6.10) unterzogen und anschließend im Westernblot (4.2.6.5, 4.2.6.7) analysiert.

4.2.6.10 TCA–Fällung von Proteinen

Um eine Probe zur Untersuchung im SDS–Gel aufzukonzentrieren wird eine TCA–Fällung durchgeführt. Dazu wird zu einer Proteinlösung einer zu geringen Konzentration 1/10 Volumen 100% Trichloressigsäure (TCA) zugegeben. Die Zugabe von 3 µl 2% Natriumsalz der Desoxycholsäure (DOC) auf 500 µl Probe unterstützt die Proteinfällung. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wird die Probe 15 Minuten bei 13000 upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die gewünschte Menge 4x–Proteinproben-puffer zugegeben und bis zum Farbumschlag von gelb nach blau mit Ammoniakdampf neutralisiert.

4.2.6.11 TAP–Aufreinigung von epitopmarkierten Ribosomenbiogenesefaktoren

Um die Assoziation von Proteinen an epitopmarkierte Ribosomenbiogenesefaktoren zu untersuchen wird eine ProteinA–Affinitätsreinigung über den ProteinA–Teil des TAP-Tags (tandem affinity purification) (Puig et al., 2001) der jeweiligen Proteine nach dem Cellzome–Protokoll durchgeführt. Nach Bedarf kann zusätzlich eine Reinigung über die Calmodulin–Bindedomäne angehängt werden.

Dazu werden die epitopmarkierten Hefestämme (4.3.1) bei 24°C in 2 - 6 l YPD–Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen und anschliessend für 3h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden schließlich bei 3000 g und 4°C durch fünf minütiges Zentrifugieren geerntet. Nach Waschen mit kaltem Lysepuffer werden die Zellpellets in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei –20°C gelagert. Aus diesem Ansatz erhält man ein Zellpellet von ca. 10 - 30 ml.

Zum Aufschluss werden die Zellpellets mit einem Volumen kaltem Lysepuffer versetzt und je 25 ml Zellsuspension werden mit 25 ml Glasbeads (Ø 0,75 – 1,0 mm) bei 4°C in der Pulverisette6 der Firma Fritsch mit folgenden Einstellungen aufgeschlossen: 500upm, 4 Minuten, 2 Wiederholungen mit 1 Minute Pause. Die Glasbeads werden über eine 50ml–Spritze abgetrennt und mit 10 ml Lysepuffer nachgewaschen. Der erhaltene Extrakt wird zunächst bei 3000 g und 4°C zehn Minuten und der hier erhaltene Überstand dann bei 35000 g und 4°C 30 Minuten zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des so gewonnenen Lysats (ca. 25 – 50 ml für Gesamtansatz) liegt bei 20 – 25 mg/ml.

Zur Immunopräzipitation der epitopmarkierten Proteine werden 300 µl IgG–Sephrose dreimal in Lysepuffer äquilibriert und für 1 – 2 h bei 4°C mit dem Zellextrakt inkubiert. Die Beads werden anschließend in 10 ml Biorad–Säulen überführt und 2 x mit 1ml, 5 x mit 2 ml und 2 x mit 10 ml Lysepuffer gewaschen. Nach Überführen der Sepharose in Mobicol–Säulen wird zusätzlich 6 x mit 0,5 ml Lysepuffer gewaschen. Die gewaschenen IgG–Beads werden in 150-200 µl Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe von 3-5 µl TEV–Protease (4,5 mg/ml) bei 16°C für zwei Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Bei diesem Schritt schneidet die TEV–Protease an einer spezifischen Stelle zwischen ProteinA und der Calmodulin–Bindedomäne, wodurch die epitopmarkierten Ribosomen-biogenesefaktoren mit eventuell assoziierten Proteinen von der IgG–Sephrose eluiert werden können.

Der zweite mögliche Aufreinigungsschritt beruht auf der Interaktion der Calmodulin–Bindedomäne (CBD) mit der Calmodulin Affinity–Matrix bei Anwesenheit von CaCl₂.

300 µl Calmodulin Affinity Resin von Stratagene werden mit Lysepuffer mit 2 mM CaCl₂ equilibriert und schließlich in 170 – 250 µl Lysepuffer mit 4 mM CaCl₂ resuspendiert. Das TEV–Eluat von ca. 170 – 250 µl wird zu den Beads gegeben und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Beads werden in Mobicol–Säulchen mit 10 x 0,5 ml Lysepuffer mit 2 mM CaCl₂

gewaschen und gebundenes Protein wird mit 300 - 600 μl Elutionspuffer für 30 Minuten bei 30°C durch Komplexierung des Ca^{2+} mit EGTA eluiert.

Die im TEV–Eluat oder Calmodulin–Eluat enthaltenen Proteine werden mit Methanol/Chloroform gefällt (4.2.6.12), lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

4.2.6.12 Methanol/Chloroform–Fällung von Proteinen

Um aus TEV–Eluaten einer TAP–Aufreinigung enthaltenes NP40 komplett abzutrennen, wird eine Methanol/Chloroform–Fällung durchgeführt. Dazu wird zu 200 μl einer Proteinlösung (ca. 150 – 300 μg Protein) 800 μl Methanol zugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform und 600 μl H_2O wird erneut gemischt und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 g für 5 min bei 4°C wird die obere Phase verworfen, wobei das weiße Präzipitat zwischen den Phasen erhalten bleiben muss. Nach erneuter Zugabe von 600 μl Methanol, Inkubation für 5 min auf Eis und Zentrifugation bei 13000 g für 5 min bei 4°C wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das Proteinpellet für 10 min lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

4.2.6.13 Trypsin–Verdau in Lösung

Die lyophilisierten Proteinproben eines Gesamtproteingehalts von ca. 50 – 100 μg werden für einen Trypsin–Verdau in Lösung zunächst in 20 μl Dissolution Puffer des iTRAQ–Labelling Kits von Invitrogen durch Inkubation bei RT für 1 – 2 h gelöst. In den Proteinen enthaltene Disulfidbrücken werden anschliessend mit 5mM Tris-(2-carboxyethyl) Phosphin bei 60°C für 1 h reduziert und dabei entstandene freie Cystein–Reste werden mit 10mM Methyl-Methanthiosulfonat (MMTS) bei RT für 10 min blockiert (Ross et al., 2004). Der tryptische Verdau in Lösung erfolgt nach Zugabe von 3 μl Trypsin–Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) für ca. 20 h bei 37°C.

4.2.6.14 iTRAQ–Markierung von tryptischen Peptiden

Zur iTRAQ–Markierung von Peptiden nach dem tryptischen Verdau werden jeweils 70 μl Ethanol p.a. zu den benötigten iTRAQ™–Reagenz–Behältern gegeben. Dabei werden jeweils verschiedene Kombinationen von drei verschiedenen Reagenzien für eine Analyse gewählt. Durch Zugabe des mit Ethanol verdünnten iTRAQ™–Reagenzes zu der jeweiligen Probe und Inkubation für 2 h bei RT werden die tryptischen Peptide der Proteinproben an ihrem jeweiligen N–Terminus und an Lysin–Resten mit dem verwendeten iTRAQ™–Reagenz kovalent markiert. Nach vollständiger Reaktion werden die drei Markierungsreaktionen vereinigt und wieder lyophilisiert

4.2.6.15 Auftrennung von tryptischen Peptiden mit Nano-HPLC

Zur anschließenden Auftrennung der Peptide wird der Niederschlag der iTRAQ-Markierung in 30 – 50 µl 0,1% Tri-Fluor-Essigsäure resuspendiert und zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen für 10 min bei 20000 g zentrifugiert. 10µl des Überstands werden auf ein Nano-Flow HPLC-System (Dionex) mit einer Pep-Map C18-Reversed Phase Säule (LC-Packings/Dionex) aufgetragen. Die in der Probe enthaltenen Peptide werden bei einer Flussrate von 0,3 µl/min in einem Gradienten von 5% bis 95% Puffer B (80% Acetonitril, 0.05% TFA) aufgetrennt. Die Fraktionen des Eluats werden 127 min lang alle 20 sec gesammelt, dabei mit je 5 Volumenanteilen CHCA-Lösung (alpha-cyano-4-hydroxy-Zimtsäure-Matrix, 2 mg/ml in 70% Acetonitril/0.1%TFA) gemischt und automatisch auf MALDI-Platten mit vorgegebenen Spots aufgetragen.

4.2.6.16 MALDI-TOF/TOF-Analyse von aufgetrennten tryptischen Peptiden

Die aufgetrennten tryptischen Peptide auf den MALDI-Platten werden mit einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer der Serie 4700 der Firma Applied Biosystems analysiert. Zur Kalibrierung des Geräts wird die Cal 4700 Standard-Peptid-Mischung verwendet. Im MS-Modus werden 1000 Schüsse und im MSMS-Modus 2500 Schüsse zur Ionisierung der Peptide eingestellt. Die Intensität des Lasers wird entsprechend der Peptidmengen in der Probe angepasst. Das MS-Spektrum wird aufgenommen und die sechs höchsten Peptid-Signale jedes Spots werden weiter fragmentiert um die jeweiligen MSMS-Spektren zu erhalten. Um ein Fragmentieren der Peptide aus einem tryptischen Verdau von IgG-Molekülen oder von Trypsin selbst zu verhindern, werden deren Peptidmassen in eine Ausschlussliste für die Analyse aufgenommen.

Zur Identifizierung der Peptide und der dazugehörigen Proteine werden die bestimmten m/z Verhältnisse mithilfe einer MASCOT Datenbanksuche in einer Hefedatenbank zugeordnet. Dabei werden nur Proteine, die mit wenigstens zwei eindeutigen Peptiden eines Confidential Intervalls > 95% zugeordnet werden können, in die Untersuchung mit einbezogen.

4.2.6.17 Auswertung der MALDI-TOF/TOF-Daten mithilfe von Microsoft Excel

Um die MALDI-TOF/TOF-Daten mithilfe von Microsoft Excel auswerten zu können, werden die Daten jeder iTRAQ-LC-MALDI-Messung als MS/MS-Summary exportiert und in ein Tabellenblatt eingefügt. Dabei kann für die Berechnung der iTRAQ-Verhältnisse sowohl der Wildtypstamm ohne Epitopmarkierung als auch der entsprechend markierte Wildtypstamm als Referenz dienen. Da die Zuordnung der identifizierten Peptide zu den entsprechenden Proteinen in der verwendeten NCBI-Datenbank oft keine eindeutigen Proteinamen liefern kann, wird eine Zuordnungsdatenbank unter Zuhilfenahme der Makro-Funktion von Microsoft Excel erstellt und verwendet. Um aussagekräftigere Daten zu erhalten werden die

zugeordneten Peptide manuell überarbeitet: Dazu werden doppelt fragmentierte Peptide und Peptide mit zu geringen Signalen der Reporterionen nicht in die Quantifizierung mit einbezogen. Durch Verwendung der Pivot Table-Funktion lässt sich aus den bestimmten iTRAQ-Verhältnissen jedes Peptids der Mittelwert für alle eindeutig zugeordneten Peptide eines identifizierten Proteins und die entsprechende Standardabweichung berechnen.

Proteine, die bekanntermaßen starke unspezifische Bindung an IgG-Sepharose zeigen, wie ribosomale Proteine, Hitzeschockproteine und Translationsfaktoren, werden in weiterführende Berechnungen nicht einbezogen.

Für alle untersuchten Faktoren wird das iTRAQ-Verhältnis *rrn3-8/RRN3* des Köderproteins auf 1 gesetzt und alle Verhältnisse der spezifisch gereinigten Proteine und die berechneten Standardabweichungen werden entsprechend normalisiert. Wenn nicht anders angegeben, werden außerdem nur Proteine, die mit mehr als einem Peptid identifiziert wurden, für die Quantifizierung berücksichtigt.

Bei einem iTRAQ-Verhältnis *rrn3-8/RRN3* > 0,5 wird die Interaktion des gefundenen Proteins mit der Köderprotein als unabhängig von rRNA Neusynthese eingestuft. Bei einem Verhältnis zwischen 0,25 und 0,5 scheint die Interaktion stärker beeinflusst, während Verhältnisse unter 0,25 eine Interaktion, die stark von der Anwesenheit von rRNA Neusynthese abhängt, repräsentieren.

4.2.6.18 Immunpräzipitation von *in vitro*-exprimierten Proteinkomplexen mittels Flag-Epitop

Zur Reinigung von rekombinanten Proteinkomplexen aus SF21 Zellen mithilfe des Flag-Epitops werden die Zellen zunächst in Lysepuffer (100mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,15 % NP40, 1mM DTT) aufgeschlossen (4.2.5.7).

Das hierbei erhaltene Gesamtzellextrakt wird mit 150 – 200 µl Anti-Flag® M2 Affinity Agarose (Sigma) für 2 h bei 4°C invertierend inkubiert. Die Agarose wird anschliessend im Batch-Verfahren 5x mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wird die Agarose in 100 – 150 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 0,2 mg/ml Flag-Peptid versetzt. Nach Inkubation für 2 h bei 4°C wird die Probe abzentrifugiert und der Überstand enthält den eluierten Proteinkomplex. Alternativ kann der Komplex nach dem Waschen der Agarose mit TEV-Protease in einer entsprechenden Konzentration bei 16°C für 2h eluiert werden.

4.2.6.19 Immunpräzipitation von *in vitro*-exprimierten Proteinkomplexen mittels 6xHis-Epitop

Zur Reinigung von rekombinanten Proteinkomplexen aus SF21 Zellen mithilfe des 6xHis-Epitops werden die Zellen zunächst in Lysepuffer (100mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,15 % NP40, 1mM DTT) mit 10 mM Imidazol aufgeschlossen (4.2.5.7).

Das hierbei erhaltene Gesamtzellextrakt wird mit 150 – 200 µl Nickel-NTA-Agarose für 2 h bei 4°C invertierend inkubiert. Die Agarose wird anschliessend im Batch-Verfahren 5x mit je 1 ml Lysepuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wird die Agarose in 100 – 150 µl Lysepuffer mit 250 mM Imidazol resuspendiert. Nach Inkubation für 2 h bei 4°C wird die Probe abzentrifugiert und der Überstand enthält den eluierten Proteinkomplex.

4.2.6.20 Untersuchung der Salzstabilität von Proteinkomplexen

Zur Untersuchung der Salzstabilität von rekombinanten Proteinkomplexen aus SF21 Zellen werden die Zellen aufgeschlossen und die Proteinkomplexe an Anti-Flag[®] M2 Affinity Agarose (Sigma) gebunden (4.2.6.17).

Die Agarose wird anschliessend im Batch-Verfahren mit je 1 ml Lysepuffer mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen (0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, 1,0M) gewaschen. Die nach jedem Waschschrift jeweils noch an die Agarose gebundenen Proteine werden anschliessend im Coomassiegele analysiert.

4.2.6.21 Gelfiltrationsanalysen von Proteinkomplexen

Zur Untersuchung der Grösse von rekombinanten Proteinkomplexen aus SF21 Zellen werden die Komplexe aufgereinigt (4.2.6.17), wobei abweichend ein Lysepuffer mit 400mM NaCl verwendet wird. 50 µl des Flag-Eluats werden anschliessend auf eine im entsprechenden Puffer äquilibrierte Superose 6 PC 3.2/30-Gelfiltrationssäule (Aufreinigungsbereich 5 kDa – 5 MDa) aufgetragen. Dabei wird das SMART System mit einer Flussrate von 10 µl/min und einem Drucklimit von 1,2 MPa verwendet. Bei Verwendung einer Superose 12 PC 3.2/30-Gelfiltrationssäule (Aufreinigungsbereich 1 – 300 kDa) wird eine Flussrate von 40 µl/min und ein Drucklimit von 3,0 MPa verwendet. In beiden Fällen werden nach einem Durchflussvolumen von 0,8 ml (1/3 des Säulenvolumens) 32 Fraktionen zu je 50 µl gesammelt und gemeinsam mit dem Input im Silbergele analysiert.

4.2.6.22 *In vitro* Bindungsexperimente mit gereinigten Noc-Proteinkomplexen und Rrp5p-TAP aus Hefezellen

Um zu untersuchen, ob die in SF21 Zellen exprimierten Noc-Komplexe *in vitro* mit dem identifizierten rRNA-unabhängig assoziierten Interaktionspartner Rrp5p interagieren können, wird IgG-Sepharose mit aus Hefezellen gereinigtem Rrp5p-TAP und zur Kontrolle ein IgG-Sepharose-Ansatz, der mit Zelllysat des Hintergrundstamms BY4741 inkubiert wird (4.2.6.11), mit SF21 Zellextrakt, das die zu untersuchenden Noc-Komplexe enthält (4.2.5.7), inkubiert. Nach mehreren Waschschriften werden die dabei gebundenen Proteine und das gebundene epitopmarkierte Protein im Westernblot untersucht.

4.3 Verwendete Stämme

4.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*–Stämme

Name	Genotyp	TOY	Quelle
CG379	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52	543	(Cadwell et al., 1997)
YCC95	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8	---	(Cadwell et al., 1997)
CG379 Noc1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Noc1-TAP::TRP1	576	diese Arbeit
YCC95 Noc1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Noc1-TAP::TRP1	---	diese Arbeit
CG379 Nop7-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Nop7-TAP::TRP1	580	diese Arbeit
YCC95 Nop7-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Nop7-TAP::TRP1	544	diese Arbeit
CG379 Rio2-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Rio2-TAP::TRP1	587	diese Arbeit
YCC95 Rio2-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Rio2-TAP::TRP1	551	diese Arbeit
CG379 Rix1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Rix1-TAP::TRP1	583	diese Arbeit
YCC95 Rix1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Rix1-TAP::TRP1	547	diese Arbeit
CG379 Arx1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Arx1-TAP::TRP1	584	diese Arbeit
YCC95 Arx1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Arx1-TAP::TRP1	548	diese Arbeit
CG379 Enp1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, Enp1-TAP::TRP1	588	diese Arbeit
YCC95 Enp1-TAP	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Enp1-TAP::TRP1	552	diese Arbeit
BY4741	MAT α , his3-1, ade2-3, leu2, trp1, ura3,met15	206	Euroscarf
Rrp5-TAP	MAT α , his3-1, ade2-3, leu2, trp1, ura3,met15, Rrp5-TAP::TRP1	615	(Eppens et al., 1999)
YCC95 Rrp5-HA ₆	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Rrp5-HA ₆ ::TRP1	275	Katrin Ridinger
YCC95 Noc1-TAP Rrp5-HA ₆	MAT α , ade5, his7-2, leu2-112, trp1-289, ura3-52, rrr3-8, Noc1-TAP::URA3, Rrp5-HA ₆ ::TRP1	413	Katrin Ridinger

4.3.2 *Escherichia coli*–Stämme

Name	Genotyp	Quelle
XL1blue	recA1, endA1, gyrA96 thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene

BW23473	$\Delta(\text{argF-lac})169$, $\Delta\text{idA3::pir}^+$, recA1 , rpoS396(Am) , $\text{endA9(del-ins)::FRT}$, rph-1 , hsdR514 , rob-1 , creC510	Imre Berger
DH10Bac-eYFP	pMON7124 (bom^+ , tra^- , mob^-), bMON14272 – eYFP, F– mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 lacX74 recA1 endA1 araD139 (ara , leu)7697 galU galK – rpsL nupG	Imre Berger

4.3.3 SF21 Insektenzellen

Die verwendete SF21 Zelllinie wurde aus ovarialem Gewebe der etwa 1 cm langen, durchsichtigen Larven der *Heerwurmtrauermücke* *Spodoptera frugiperda* gewonnen (Vaughn et al., 1977). Diese Zelllinie eignet sich sehr gut für Infektionen mit dem *Autographa californica* Nuclear–Polyhedrosis–Virus (AcNPV Baculovirus) und hat den Vorteil, dass eukaryotische Proteine löslich und in grosser Menge in diesen Zellen rekombinant exprimiert werden können.

4.4 Verwendete Vektoren

4.4.1 Template zur Epitopmarkierung in *S. cerevisiae*

Nr	Name	Zweck/ Klonierungsstrategie	Selektion	Quelle
132	pBS1479	Matrize für PCR zur genomischen Markierung von Zielgenen mit dem TAP-Epitop	Ampicillin / Tryptophan	(Puig et al., 2001)

4.4.2 Templates für In vitro – Transkriptionen

Nr	Name	Zweck/ Klonierungsstrategie	Selektion	Quelle
1193	pGEMT-5,8S-rev	PCR mit Oligos #1882 + #1883 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1194	pGEMT-7S-rev	PCR mit Oligos #1882 + #1884 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1195	pGEMT-25SDomI-for	PCR mit Oligos #1885 + #1886 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1196	pGEMT-25SDomII-for	PCR mit Oligos #1887 + #1888 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1197	pGEMT-25SDomIII-for	PCR mit Oligos #1889 + #1890 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1198	pGEMT-25SDomIV-for	PCR mit Oligos #1891 + #1892 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit

1199	pGEMT-25SSDomV-rev	PCR mit Oligos #1893 + #1894 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1200	pGEMT-25SSDomVI-rev	PCR mit Oligos #1895 + #1896 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1201	pGEMT-ITS2 short-rev	PCR mit Oligos #1897 + #1898 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1202	pGEMT-ITS2 long-rev	PCR mit Oligos #1882 + #1886 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1203	pGEMT-tRNA-Ile-for	PCR mit Oligos #1899 + #1900 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1204	pGEMT-18SSDomI-for	PCR mit Oligos #1952 + #1953 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1205	pGEMT-18SSDomII-rev	PCR mit Oligos #1954 + #1955 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1206	pGEMT-18SSDomIII-for	PCR mit Oligos #1956 + #1957 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1207	pGEMT-18SSDomIII+A2-for	PCR mit Oligos #1956 + #1958 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1208	pGEMT-18SSDomIII+A3-for	PCR mit Oligos #1956 + #1959 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1209	pGEMT-ITS1-rev	PCR mit Oligos #1960 + #1961 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit
1210	pGEMT-5S-rev	PCR mit Oligos #1962 + #1963 (genomische DNA als Matrize), Ligation in pGEMT	Ampicillin	diese Arbeit

4.4.3 Plasmide zur Expression von Proteinkomplexen in SF21 Zellen

Nr	Name	Strategie	Selektion	Quelle
1127	pUCDM	Multibac-Vektor	Chloramphenicol	Richmond, ETH Zürich
1129	pSPL	Multibac-Vektor	Spectinomycin	Richmond, ETH Zürich
1130	pFL	Multibac-Vektor	Ampicillin / Gentamycin	Richmond, ETH Zürich
1211	pSPL-6xHis	Multibac-Vektor mit 6x His-Tag in MCS2; durch Primer-Annealing von Oligos #1966 + #1967, Ligation in Plasmid #1129	Spectinomycin	diese Arbeit

1212	pFL-Flag-TEV	Multibac-Vektor mit Flag-Tag in MCS2; durch Primer-Annealing von Oligos #1964 + #1965, Ligation in Plasmid #1130	Ampicillin / Gentamycin	diese Arbeit
1213	pFL-Flag-TEV-Noc2	PCR von Noc2 mit Primer #1968 + #1969, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1212	Ampicillin / Gentamycin	diese Arbeit
1218	pSPL-Noc3	PCR von Noc3 mit Primer #1970 + #1971, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1129	Spectinomycin	diese Arbeit
1230	pUCDM-Noc1	PCR von Noc1 mit Primer #1974 + #1975, Sall/XbaI – Verdau, Ligation in Plasmid #1127	Chloramphenicol	diese Arbeit
1259	pSPL-6xHis-Rrp5	PCR von Rrp5 mit Primer #1972 + #1973, BamHI/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1211	Spectinomycin	diese Arbeit
1215	pFL-Flag-TEV-Rio2	PCR von Rio2 mit Primer #1978 + #1979, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1212	Ampicillin / Gentamycin	diese Arbeit
1234	pSPL-Ltv1	PCR von Ltv1 mit Primer #1980 + #1981, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1129	Spectinomycin	diese Arbeit
1216	pSPL-Tsr1	PCR von Tsr1 mit Primer #1982 + #1983, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1129	Spectinomycin	diese Arbeit
1231	pSPL-6xHis-Enp1	PCR von Enp1 mit Primer #1984 + #1985, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1211	Spectinomycin	diese Arbeit
1217	pSPL-Hrr25	PCR von Hrr25 mit Primer #1986 + #1987, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1129	Spectinomycin	diese Arbeit
1219	pUCDM-Dim1	PCR von Dim1 mit Primer #1988 + #1989, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1127	Chloramphenicol	diese Arbeit
1221	pUCDM-Krr1	PCR von Krr1 mit Primer #1990 + #1991, Sall/PstI – Verdau, Ligation in Plasmid #1127	Chloramphenicol	diese Arbeit
1232	pFL-Flag-TEV-Noc2-pUCDM-Noc1	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1230 und #1213	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol	diese Arbeit
1233	pFL-Flag-TEV-Noc2-pSPL-Noc3	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1218 und #1213	Ampicillin / Gentamycin / Spectinomycin	diese Arbeit
1260	pFL-Flag-TEV-Noc2-pUCDM-Noc1-pSPL-Noc3	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1230 und #1213 und #1218	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol / Spectinomycin	diese Arbeit
1261	pFL-Flag-TEV-Rio2-pUCDM-Dim1-pSPL-Tsr1	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1215 und #1216 und #1219	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol / Spectinomycin	diese Arbeit
1262	pSPL-Ltv1-	PmeI/AvrII – Verdau von #1216, 3,4kB-Fragment Ligation in NruI/Spel – verdautes	Spectinomycin	diese Arbeit

	Tsr1	Plasmid #1234		
---	pFL-Flag-TEV-Noc2-pUCDM-Noc1-pSPL-6xHis-Rrp5	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1230 und #1213 und #1259	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol / Spectinomycin	diese Arbeit
---	pFL-Flag-TEV-Rio2-pUCDM-Krr1-pSPL-Tsr1-Ltv1	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1215 und #1262 und #1221	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol / Spectinomycin	diese Arbeit
---	pFL-Flag-TEV-Rio2-pUCDM-Dim1-pSPL-6xHis-Enp1	In vitro Cre Fusion der Plasmide #1215 und #1231 und #1219	Ampicillin / Gentamycin / Chloramphenicol / Spectinomycin	diese Arbeit

5 Literaturverzeichnis

5.1 Allgemeine Literatur

- Adams, C. C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J. L. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *RNA* 8, 150-65.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell. Sci* 113 (Pt 10), 1651-1659.
- Baker, D. L., Youssef, O. A., Chastkofsky, M. I. R., Dy, D. A., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2005). RNA-guided RNA modification: functional organization of the archaeal H/ACA RNP. *Genes Dev* 19, 1238-1248.
- Baliga, B. S., Pronczuk, A. W., and Munro, H. N. (1969). Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *J. Biol. Chem* 244, 4480-4489.
- 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.
- Beckmann, R., Spahn, C. M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107, 361-372.
- Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J* 14, 4350-4356.
- Benelli, D., Marzi, S., Mancone, C., Alonzi, T., la Teana, A., and Londei, P. (2009). Function and ribosomal localization of aIF6, a translational regulator shared by archaea and eukarya. *Nucleic Acids Res* 37, 256-267.
- Berger, I., Fitzgerald, D. J., and Richmond, T. J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat. Biotechnol* 22, 1583-1587.
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E. G., Mitchell, B. M., Granneman, S., and Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic Cell* 3, 1619-1626.
- Bernstein, K. A., Granneman, S., Lee, A. V., Manickam, S., and Baserga, S. J. (2006). Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases involved in large ribosomal subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol* 26, 1195-1208.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S. E., Conner, M. E., and Estes, M. K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21, 3885-3900.
- Beven, A. F., Lee, R., Razaz, M., Leader, D. J., Brown, J. W., and Shaw, P. J. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J. Cell. Sci* 109 (Pt 6), 1241-1251.

- Bier, M., Fath, S., and Tschochner, H. (2004). The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett* 564, 41-46.
- Bleichert, F., Gagnon, K. T., Brown, B. A., Maxwell, E. S., Leschziner, A. E., Unger, V. M., and Baserga, S. J. (2009). A dimeric structure for archaeal box C/D small ribonucleoproteins. *Science* 325, 1384-1387.
- de Boer, P., Vos, H. R., Faber, A. W., Vos, J. C., and Raué, H. A. (2006). Rrp5p, a trans-acting factor in yeast ribosome biogenesis, is an RNA-binding protein with a pronounced preference for U-rich sequences. *RNA* 12, 263-71.
- Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., et al. (2007). Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Mol. Cell* 27, 767-779.
- 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.
- Briggs, M. W., Burkard, K. T., and Butler, J. S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem* 273, 13255-13263.
- Brodersen, D. E., and Nissen, P. (2005). The social life of ribosomal proteins. *FEBS J* 272, 2098-2108.
- Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Carter, A. P., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2002). Crystal structure of the 30 s ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 s RNA. *Journal of Molecular Biology* 316, 725-768.
- Cadwell, C., Yoon, H. J., Zebarjadian, Y., and Carbon, J. (1997). The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol* 17, 6175-83.
- Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L. V., Müller, K. M., et al. (2002). The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3, 2.
- Cavanaugh, A. H., Hirschler-Laszkiwicz, I., Hu, Q., Dundr, M., Smink, T., Misteli, T., and Rothblum, L. I. (2002). Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J. Biol. Chem* 277, 27423-27432.
- Cech, T. R. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* 289, 878-879.
- Chandramouli, P., Topf, M., Ménétret, J., Eswar, N., Cannone, J. J., Gutell, R. R., Sali, A., and Akey, C. W. (2008). Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution. *Structure* 16, 535-548.
- Charpentier, B., Muller, S., and Branlant, C. (2005). Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation. *Nucleic Acids Res* 33, 3133-3144.

- Chen, W., Bucaria, J., Band, D. A., Sutton, A., and Sternglanz, R. (2003). Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic Acids Res* 31, 690-699.
- Chu, S., Archer, R. H., Zengel, J. M., and Lindahl, L. (1994). The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 659-663.
- Claypool, J. A., French, S. L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J. A., Beyer, A. L., and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol. Biol. Cell* 15, 946-956.
- Conti, E., Müller, C. W., and Stewart, M. (2006). Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol* 16, 237-244.
- Culver, G. M., and Noller, H. F. (2000). In vitro reconstitution of 30S ribosomal subunits using complete set of recombinant proteins. *Meth. Enzymol* 318, 446-460.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331-2338.
- Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2003). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J. Biol. Chem* 278, 695-698.
- Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci* 27, 344-351.
- Demoinet, E., Jacquier, A., Lutfalla, G., and Fromont-Racine, M. (2007). The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 13, 1570-1581.
- Dlakić, M., and Tollervey, D. (2004). The Noc proteins involved in ribosome synthesis and export contain divergent HEAT repeats. *RNA* 10, 351-4.
- Dosil, M., and Bustelo, X. R. (2004). Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle. *J. Biol. Chem* 279, 37385-37397.
- Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., et al. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-70.
- Duan, J., Li, L., Lu, J., Wang, W., and Ye, K. (2009). Structural mechanism of substrate RNA recruitment in H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. *Mol. Cell* 34, 427-439.
- El Hage, A., Koper, M., Kufel, J., and Tollervey, D. (2008). Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev* 22, 1069-1081.
- Eppens, N. A., Rensen, S., Granneman, S., Raué, H. A., and Venema, J. (1999). The roles of Rrp5p in the synthesis of yeast 18S and 5.8S rRNA can be functionally and physically separated. *RNA* 5, 779-93.

- Faber, A. W., Van Dijk, M., Raué, H. A., and Vos, J. C. (2002). Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 8, 1095-1101.
- Fath, S., Milkereit, P., Peyroche, G., Riva, M., Carles, C., and Tschochner, H. (2001). Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14334-9.
- Fatica, A., Tollervey, D., and Dlakić, M. (2004). PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA* 10, 1698-1701.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol* 23, 1798-1807.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol* 14, 313-318.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20, 263-75.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol Cell* 28, 446-57.
- Fitzgerald, D. J., Berger, P., Schaffitzel, C., Yamada, K., Richmond, T. J., and Berger, I. (2006). Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nat. Methods* 3, 1021-1032.
- Fitzgerald, D. J., Schaffitzel, C., Berger, P., Wellinger, R., Bieniossek, C., Richmond, T. J., and Berger, I. (2007). Multiprotein expression strategy for structural biology of eukaryotic complexes. *Structure* 15, 275-279.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Fribourg, S., and Conti, E. (2003). Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO Rep* 4, 699-703.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Fuentes, J. L., Datta, K., Sullivan, S. M., Walker, A., and Maddock, J. R. (2007). In vivo functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* 60S biogenesis GTPase Nog1. *Mol. Genet. Genomics* 278, 105-123.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol* 21, 3405-3415.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., and Thuriaux, P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J* 21, 5498-5507.
- Galani, K., Nissan, T. A., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2004). Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J Biol Chem* 279, 55411-8.

- Gallagher, J. E. G., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* 18, 2506-2517.
- Gandin, V., Miluzio, A., Barbieri, A. M., Beugnet, A., Kiyokawa, H., Marchisio, P. C., and Biffo, S. (2008). Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature* 455, 684-688.
- Garrett, R. A., and Wooley, P. (1982). Identifying the peptidyl transferase centre. *Trends in Biochemical Sciences* 7, 385-386.
- Gavin, A., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., et al. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Geerlings, T. H., Vos, J. C., and Raué, H. A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* 6, 1698-1703.
- Geerlings, T. H., Faber, A. W., Bister, M. D., Vos, J. C., and Raué, H. A. (2003). Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 278, 22537-22545.
- Geiduschek, E. P., and Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol* 310, 1-26.
- Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., and Lemmon, S. K. (2001). Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA* 7, 1268-1283.
- Gerber, J., Reiter, A., Steinbauer, R., Jakob, S., Kuhn, C., Cramer, P., Griesenbeck, J., Milkereit, P., and Tschochner, H. (2008). Site specific phosphorylation of yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 36, 793-802.
- Glitz, C., and Brimacombe, R. (1980). An experimentally-derived model for the secondary structure of the 16S ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 8, 2377-2395.
- Görlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 15, 607-660.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervy, D., et al. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10, 105-115.
- Granneman, S., Gallagher, J. E. G., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W. J., Baserga, S. J., and Pruijn, G. J. M. (2003). The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res* 31, 1877-1887.
- Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., and Tollervy, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482942> [Accessed June 9, 2009].

- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol* 17, 994-999.
- Hage, A. E., and Tollervey, D. (2004). A surfeit of factors: why is ribosome assembly so much more complicated in eukaryotes than bacteria? *RNA Biol* 1, 10-15.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol* 15, 116-125.
- Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M. R., Wild, K., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006). Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle. *Nature* 444, 507-511.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., et al. (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* 8, 505-15.
- Hedges, J., Chen, Y., West, M., Bussiere, C., and Johnson, A. W. (2006). Mapping the functional domains of yeast NMD3, the nuclear export adapter for the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem* 281, 36579-36587.
- Hedges, J., West, M., and Johnson, A. W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J* 24, 567-579.
- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., and Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J. Biol. Chem* 249, 3103-3111.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalski, E., Kearsey, S., and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J* 13, 2452-2463.
- Herold, M., and Nierhaus, K. H. (1987). Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem* 262, 8826-8833.
- Ho, J. H., and Johnson, A. W. (1999). NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 19, 2389-2399.
- Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W. (2000a). Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *RNA* 6, 1625-1634.
- Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W. (2000b). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol* 151, 1057-1066.
- Hofer, A., Bussiere, C., and Johnson, A. W. (2007). Mutational analysis of the ribosomal protein Rpl10 from yeast. *J. Biol. Chem* 282, 32630-32639.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* 19, 1357-1365.

- Huet, J., Manaud, N., Dieci, G., Peyroche, G., Conesa, C., Lefebvre, O., Ruet, A., Riva, M., and Sentenac, A. (1996). RNA polymerase III and class III transcription factors from *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol* 273, 249-267.
- Hughes, J. M., and Ares, M. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J* 10, 4231-4239.
- Hung, N., and Johnson, A. W. (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 26, 3718-3727.
- Hung, N., Lo, K., Patel, S. S., Helmke, K., and Johnson, A. W. (2008). Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 735-744.
- Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., and Maddock, J. R. (2007). Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques. *J. Bacteriol* 189, 3434-3444.
- Johnson, A. W., Lund, E., and Dahlberg, J. (2002). Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci* 27, 580-585.
- Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., André, B., Ansorge, W., Benes, V., Brückner, M., Delius, H., Dubois, E., et al. (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature* 387, 87-90.
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., and Pütz, J. (2009). tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 37, D159-162.
- Kauffmann, A. D., Campagna, R. J., Bartels, C. B., and Childs-Disney, J. L. (2009). Improvement of RNA secondary structure prediction using RNase H cleavage and randomized oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596816> [Accessed September 15, 2009].
- Kempers-Veenstra, A. E., Oliemans, J., Offenberg, H., Dekker, A. F., Piper, P. W., Planta, R. J., and Klootwijk, J. (1986). 3'-End formation of transcripts from the yeast rRNA operon. *EMBO J* 5, 2703-2710.
- Keys, D. A., Vu, L., Steffan, J. S., Dodd, J. A., Yamamoto, R. T., Nogi, Y., and Nomura, M. (1994). RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2349-2362.
- King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., and Fournier, M. J. (2003). Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Mol. Cell* 11, 425-435.
- Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145-148.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J. P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.

- Kiss-László, Z., Henry, Y., and Kiss, T. (1998). Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J* 17, 797-807.
- Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwülbecke, 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.
- Kressler, D., Linder, P., and Cruz, J. D. L. (1999). Protein trans-Acting Factors Involved in Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19, 7897–7912.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Krogan, N. J., Peng, W., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., et al. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol. Cell* 13, 225-239.
- Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* 5, 909-917.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A. L., Desgrès, J., and Vandenhoute, J. (1994). The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J. Mol. Biol* 241, 492-497.
- Lafontaine, D., Vandenhoute, J., and Tollervey, D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev* 9, 2470-2481.
- Lafontaine, D. L., Preiss, T., and Tollervey, D. (1998). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol. Cell. Biol* 18, 2360-2370.
- Lafontaine, D. L., and Tollervey, D. (1998). Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends Biochem. Sci* 23, 383-388.
- Lake, J. A. (1976). Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *Journal of Molecular Biology* 105, 131-159.
- Lalo, D., Steffan, J. S., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *J. Biol. Chem* 271, 21062-21067.
- Lebreton, A., Rousselle, J., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Fromont-Racine, M., and Saveanu, C. (2008). 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res* 36, 4988-4999.
- Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Rain, J., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J. Cell Biol* 173, 349-360.

- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 108, 103-113.
- Li, L., and Ye, K. (2006). Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature* 443, 302-307.
- Liang, X., Liu, Q., and Fournier, M. J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* 15, 1716-1728.
- Lin, C. W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K., and Reeder, R. H. (1996). A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 16, 6436-6443.
- Lo, K., and Johnson, A. W. (2009). Reengineering ribosome export. *Mol. Biol. Cell* 20, 1545-1554.
- Loar, J. W., Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Sagerson, H. J., Ilias, N., Zobel-Thropp, P., Craig, E. A., and Lycan, D. E. (2004). Genetic and biochemical interactions among Yar1, Ltv1 and Rps3 define novel links between environmental stress and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 168, 1877-1889.
- Londei, P., Teixidò, J., Acca, M., Cammarano, P., and Amils, R. (1986). Total reconstitution of active large ribosomal subunits of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res* 14, 2269-2285.
- Long, E. O., and Dawid, I. B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem* 49, 727-764.
- Luria, S. E., Delbrück, M., and Anderson, T. F. (1943). Electron Microscope Studies of Bacterial Viruses. *J. Bacteriol* 46, 57-77.
- Maki, J. A., Schnobrich, D. J., and Culver, G. M. (2002). The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Mol. Cell* 10, 129-138.
- Mangiarotti, G., and Chiaberge, S. (1997). Reconstitution of functional eukaryotic ribosomes from *Dictyostelium discoideum* ribosomal proteins and RNA. *J. Biol. Chem* 272, 19682-19687.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., and Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 37, 790-796, 798-802.
- Miles, T. D., Jakovljevic, J., Horsey, E. W., Harnpicharnchai, P., Tang, L., and Woolford, J. L. (2005). Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes. *Mol Cell Biol* 25, 10419-32.
- Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105, 499-509.
- Milkereit, P., and Tschochner, H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *EMBO J* 17, 3692-703.

- Milkereit, P., Kühn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res* 31, 799-804.
- Milkereit, P., Strauss, D., Bassler, J., Gadal, O., Kühn, H., Schütz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E., and Tschochner, H. (2003). A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *J Biol Chem* 278, 4072-81.
- Miluzio, A., Beugnet, A., Volta, V., and Biffo, S. (2009). Eukaryotic initiation factor 6 mediates a continuum between 60S ribosome biogenesis and translation. *EMBO Rep* 10, 459-465.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-466.
- Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1996). The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev* 10, 502-513.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol. Cell. Biol* 23, 6982-6992.
- Mizushima, S., and Nomura, M. (1970). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature* 226, 1214.
- Monie, T. P., Perrin, A. J., Birtley, J. R., Sweeney, T. R., Karakasiliotis, I., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., Matthews, S., Goodfellow, I. G., and Curry, S. (2007). Structural insights into the transcriptional and translational roles of Ebp1. *EMBO J.* 26, 3936–3944.
- Monro, R. E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol* 26, 147-151.
- Moore, M. S., and Blobel, G. (1994). A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem. Sci* 19, 211-216.
- Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418, 229-235.
- Morrissey, J. P., and Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol* 13, 2469-2477.
- Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 210-217.
- Moss, T., and Stefanovsky, V. Y. (2002). At the center of eukaryotic life. *Cell* 109, 545-548.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* 7, 1609-1619.
- Moy, T. I., and Silver, P. A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* 13, 2118-2133.

- Moy, T. I., and Silver, P. A. (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J. Cell. Sci* 115, 2985-2995.
- Mueller, D. R., Voshol, H., Waldt, A., Wiedmann, B., and Van Oostrum, J. (2007). LC-MALDI MS and MS/MS--an efficient tool in proteome analysis. *Subcell. Biochem* 43, 355-380.
- Musters, W., Boon, K., van der Sande, C. A., van Heerikhuizen, H., and Planta, R. J. (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO J* 9, 3989-3996.
- Nazar, R. N. (1991). Higher order structure of the ribosomal 5 S RNA. *J. Biol. Chem* 266, 4562-4567.
- Ni, J., Tien, A. L., and Fournier, M. J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* 89, 565-573.
- Nierhaus, K. H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie* 73, 739-755.
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 21, 5539-47.
- Nissan, T. A., Galani, K., Maco, B., Tollervey, D., Aebi, U., and Hurt, E. (2004). A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits. *Mol Cell* 15, 295-301.
- 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.
- Noller, H. F., Hoffarth, V., and Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256, 1416-1419.
- Noller, H. F., and Woese, C. R. (1981). Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 212, 403-411.
- Nomura, M., and Erdmann, V. A. (1970). Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature* 228, 744-748.
- van Nues, R. W., Rientjes, J. M., van der Sande, C. A., Zerp, S. F., Sluiter, C., Venema, J., Planta, R. J., and Raué, H. A. (1994). Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. *Nucleic Acids Res* 22, 912-919.
- Nureki, O., Niimi, T., Muramatsu, T., Kanno, H., Kohno, T., Florentz, C., Giegé, R., and Yokoyama, S. (1994). Molecular Recognition of the Identity-determinant Set of Isoleucine Transfer RNA from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 236, 710-724.
- Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev* 18, 196-209.
- Oeffinger, M., Leung, A., Lamond, A., Tollervey, D., and Lueng, A. (2002). Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis. *RNA* 8, 626-36.

- Ofengand, J. (2002). Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* 514, 17-25.
- Omer, A. D., Ziesche, S., Ebhardt, H., and Dennis, P. P. (2002). In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 5289-5294.
- Ong, S., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Ong, S., and Mann, M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol* 1, 252-262.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Osheim, Y. N., French, S. L., Keck, K. M., Champion, E. A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S. J., and Beyer, A. L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 16, 943-954.
- Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 59-68.
- Pederson, T. (1998). The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26, 3871-3876.
- Pederson, T., and Tsai, R. Y. L. (2009). In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation. *J. Cell Biol* 184, 771-776.
- Penman, S., Smith, I., and Holtzman, E. (1966). Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus. *Science* 154, 786-789.
- Pérez-Fernández, J., Román, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X. R., and Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol. Cell. Biol* 27, 5414-5429.
- Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebming, E., Nobis, B., Kappel, L., van der Klei, I., et al. (2007). Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol. Cell. Biol* 27, 6581-6592.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20S to 18S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801658> [Accessed October 13, 2009].
- Pestov, D. G., Stockelman, M. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001). ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3621-3630.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. (2000). The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *EMBO J* 19, 5473-5482.

- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* *14*, 2028-2045.
- Planta, R. J., and Mager, W. H. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 471-477.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* *24*, 218-29.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* *108*, 557-572.
- Raska, I., Koberna, K., Malínský, J., Fidlerová, H., and Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell* *96*, 579-594.
- Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biology* *18*, 325-334.
- Reboud, A. M., Buisson, M., Amoros, M. J., and Reboud, J. P. (1972). Partial in vitro reconstitution of active 40S ribosomal subunits from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *46*, 2012-2018.
- Reeder, R. H., Guevara, P., and Roan, J. G. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol. Cell. Biol* *19*, 7369-7376.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R., and Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res* *35*, 1452-1464.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol* *17*, 1030-1032.
- Ripmaster, T. L., Vaughn, G. P., and Woolford, J. L. (1992). A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *89*, 11131-11135.
- Ripmaster, T. L., Vaughn, G. P., and Woolford, J. L. (1993). DRS1 to DRS7, novel genes required for ribosome assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* *13*, 7901-7912.
- Ritossa, F. M., and Spiegelman, S. (1965). Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster* MELANOGASTER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *53*, 737-745.
- Röhl, R., and Nierhaus, K. H. (1982). Assembly map of the large subunit (50S) of *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *79*, 729-733.
- Rosado, I. V., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2007). Functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein Rpl3p in ribosome synthesis. *Nucleic Acids Res* *35*, 4203-4213.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein

- quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-69.
- Rout, M. P., and Aitchison, J. D. (2000). Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem* 36, 75-88.
- Rout, M. P., and Aitchison, J. D. (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem* 276, 16593-16596.
- Roy, P. (2004). Baculovirus solves a complex problem. *Nat. Biotechnol* 22, 1527-1528.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sanchez, M. E., Ureña, D., Amils, R., and Londei, P. (1990). In vitro reassembly of active large ribosomal subunits of the halophilic archaebacterium *Haloferax mediterranei*. *Biochemistry* 29, 9256-9261.
- Sánchez, M. E., Londei, P., and Amils, R. (1996). Total reconstitution of active small ribosomal subunits of the extreme halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochim. Biophys. Acta* 1292, 140-144.
- van der Sande, C. A., Kwa, M., van Nues, R. W., van Heerikhuizen, H., Raué, H. A., and Planta, R. J. (1992). Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *J. Mol. Biol* 223, 899-910.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., and Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol. Cell. Biol* 18, 6826-6838.
- Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P., Lebreton, A., Rousselle, J., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol. Cell. Biol* 23, 4449-4460.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 441, 651-5.
- Schäfer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J* 22, 1370-80.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., et al. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102, 615-623.
- Schmidt, C., and Urlaub, H. (2009). iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. *Methods Mol. Biol* 564, 207-226.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. D. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310, 827-834.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R., and Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J* 16, 3256-3271.

- Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Wollam, B. J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M. D., and Lycan, D. E. (2006). Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *174*, 679-691.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* *313*, 1935-1942.
- Senger, B., Lafontaine, D. L., Graindorge, J. S., Gadai, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J. M., Breitenbach, M., Hurt, E., and Fasiolo, F. (2001). The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol. Cell* *8*, 1363-1373.
- Si, K., and Maitra, U. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol. Cell. Biol* *19*, 1416-1426.
- Silvian, L. F., Wang, J., and Steitz, T. A. (1999). Insights into Editing from an Ile-tRNA Synthetase Structure with tRNA^{Ile} and Mupirocin. *Science* *285*, 1074-1077.
- 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.
- Squatrito, M., Mancino, M., Sala, L., and Draetta, G. F. (2006). Ebp1 is a dsRNA-binding protein associated with ribosomes that modulates eIF2 α phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *344*, 859-868.
- Steffan, J. S., Keys, D. A., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev* *10*, 2551-2563.
- Steffan, J. S., Keys, D. A., Vu, L., and Nomura, M. (1998). Interaction of TATA-binding protein with upstream activation factor is required for activated transcription of ribosomal DNA by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Mol. Cell. Biol* *18*, 3752-3761.
- Stevens, A., Hsu, C. L., Isham, K. R., and Larimer, F. W. (1991). Fragments of the internal transcribed spacer 1 of pre-rRNA accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* lacking 5'----3' exoribonuclease 1. *J. Bacteriol* *173*, 7024-7028.
- Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A., and Barciszewski, J. (2002). 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res* *30*, 176-178.
- Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E., and Woolford, J. L. (2008). Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Mol Biol Cell* *19*, 2844-56.
- Thomas, F., and Kutay, U. (2003). Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J. Cell. Sci* *116*, 2409-2419.
- Tissieres, A., and Watson, J. D. (1958). Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. *Nature* *182*, 778-780.

- Tollervey, D., and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol* 9, 337-342.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72, 443-457.
- Tone, Y., and Toh-E, A. (2002). Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 16, 3142-3157.
- Trapman, J., and Planta, R. J. (1976). Maturation of ribosomes in yeast. I Kinetic analysis by labelling of high molecular weight rRNA species. *Biochim. Biophys. Acta* 442, 265-274.
- Trapman, J., Planta, R. J., and Raué, H. A. (1976). Maturation of ribosomes in yeast. II. Position of the low molecular weight rRNA species in the maturation process. *Biochim. Biophys. Acta* 442, 275-284.
- Traub, P., and Nomura, M. (1968). Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 59, 777-784.
- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., et al. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol* 183, 223-239.
- Trotta, C. R., Lund, E., Kahan, L., Johnson, A. W., and Dahlberg, J. E. (2003). Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J* 22, 2841-2851.
- Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P. E., Teulières, F., and Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol. Biol. Cell* 11, 2175-2189.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-63.
- Turner, A. J., Knox, A. A., Prieto, J., McStay, B., and Watkins, N. J. (2009). A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol. Cell. Biol* 29, 3007-3017.
- Udem, S. A., and Warner, J. R. (1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J. Biol. Chem* 248, 1412-1416.
- Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell* 138, 911-922.
- Vanrobays, E., Gelugne, J., Gleizes, P., and Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 23, 2083-2095.
- Vanrobays, E., Gélugne, J., Caizergues-Ferrer, M., and Lafontaine, D. L. J. (2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *RNA* 10, 645-656.

- Vanrobays, E., Leplus, A., Osheim, Y. N., Beyer, A. L., Wacheul, L., and Lafontaine, D. L. (2008). TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *RNA* 14, 2061–2073.
- Vaughn, J. C., Sperbeck, S. J., Ramsey, W. J., and Lawrence, C. B. (1984). A universal model for the secondary structure of 5.8S ribosomal RNA molecules, their contact sites with 28S ribosomal RNAs, and their prokaryotic equivalent. *Nucleic Acids Res* 12, 7479-7502.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet* 33, 261-311.
- Vioque, A., and Palacián, E. (1985). Partial reconstitution of 60S ribosomal subunits from yeast. *Mol. Cell. Biochem* 66, 55-60.
- Warner, J. R. (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol* 2, 521-527.
- Watkins, N. J., Ségault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Lührmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457-466.
- Wehner, K. A., Gallagher, J. E. G., and Baserga, S. J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Mol. Cell. Biol* 22, 7258-7267.
- Wery, M., Ruidant, S., Schillewaert, S., Leporé, N., and Lafontaine, D. L. (2009). The nuclear poly(A) polymerase and Exosome cofactor Trf5 is recruited cotranscriptionally to nucleolar surveillance. *RNA* 15, 406–419.
- West, M., Hedges, J. B., Chen, A., and Johnson, A. W. (2005). Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Mol. Cell. Biol* 25, 3802-3813.
- Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2003). The ribosome through the looking glass. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 42, 3464-3486.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327-339.
- Wittekind, M., Kolb, J. M., Dodd, J., Yamagishi, M., Mémet, S., Buhler, J. M., and Nomura, M. (1990). Conditional expression of RPA190, the gene encoding the largest subunit of yeast RNA polymerase I: effects of decreased rRNA synthesis on ribosomal protein synthesis. *Mol. Cell. Biol* 10, 2049-2059.
- Wolffe, A. P. (1991). RNA polymerase III transcription. *Curr. Opin. Cell Biol* 3, 461-466.

- Yamamoto, R. T., Nogi, Y., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1996). RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *EMBO J* 15, 3964-3973.
- Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* 1, 223-234.
- Yao, W., Lutzmann, M., and Hurt, E. (2008). A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J* 27, 6-16.
- Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell* 26, 51-62.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-896.
- Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M. J., Clarke, L., and Carbon, J. (1999). Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell. Biol* 19, 7461-7472.
- Zemp, I., Wild, T., O'Donohue, M., Wandrey, F., Widmann, B., Gleizes, P., and Kutay, U. (2009). Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J. Cell Biol* 185, 1167-1180.

5.2 Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

- Merl, J.[#], Jakob, S.[#], Ridinger, K., Hierlmeier, T., Deutzmann, R., Milkereit, P., and Tschochner, H. Analysis of ribosome biogenesis factor-modules in yeast cells depleted from pre-ribosomes (eingereicht)

[#] gleichberechtigte Autoren

6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Ac	Acetat
Ade	Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Core Element
CF	Core-Faktor
CHX	Cycloheximid
c-terminal	carboxy-terminal
cpm	counts per minute (Zerfälle in der Minute)
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DFC	Dense fibrillar component
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(b-aminoethylether),N,N,N',N'-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EMSA	Electro mobility shift assay
ETS	Extern transkribierter Spacer
FC	Fibrillar centre
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GC	Granular component
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HMG	High mobility group
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochauflösungsflüssig-chromatographie)
ICAT	Isotope-coded affinity tags
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantitation = isobares Epitop zur relativen und absoluten Quantifizierung
ITS	Intern transkribierter Spacer
kB	Kilobase(n)

kD	KiloDalton
l	Liter
leu	Leucin
LB	Luria Bertani
LSU	grosse ribosomale Untereinheit
M	molar
MALDI-MS	Matrix–unterstützte Laserdesorptions/Ionisations–Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mg	Milligramm
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MRP	mitochondrial RNA processing
MW	Molekulargewicht in Dalton
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NB	Northernblot
NES	Kernexportsequenz
NLS	Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
Noc	„nucleolar complex“
NOR	Nucleolus Organisationsregion
NPC	Kernporenkomplex
n–terminal	amino-terminal
NTS	Non-transcribed spacer
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
Pol I	RNA–Polymerase I
Pol II	RNA–Polymerase II
Pol III	RNA–Polymerase III
Prä-rRNA	Vorläufer-rRNA
qMS	quantitative Massenspektrometrie
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein
rpL	Protein der 60S – Untereinheit
rpS	Protein der 40S-Untereinheit

RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SF	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SILAC	Stable isotope labelling with amino acids in cell culture
snoRNA	kleine nukleoläre RNA
snoRNP	kleines nukleoläres RNP
SRP	Signal recognition particle
SSU	kleine ribosomale Untereinheit
Strep	Streptomycin
TAP	tandem affinity purificaton
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Bindeprotein
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	tobacco etch virus (Tabakmosaikvirus)
TOF	time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
U	Unit
UAF	upstream activating factor
UE	upstream element
upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
ÜN	über Nacht
Vgl.	vergleiche
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro-

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

7 Zusammenfassung

Zur Synthese eukaryotischer Ribosomen werden mehr als 150 Ribosomenbiogenesefaktoren benötigt, die vorübergehend bei der Bildung neusynthetisierter Untereinheiten mit präribosomalen Partikeln interagieren. Während der letzten Jahre konnten verschiedenste präribosomale Zwischenstufen identifiziert werden, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung und ihrem jeweiligen (prä-) rRNA-Gehalt unterscheiden.

Bei diesem hoch dynamischen und komplexen Vorgang stellt sich grundsätzlich die Frage, in welcher Form die zahlreichen beschriebenen Ribosomenbiogenesefaktoren an präribosomale Partikel assoziieren. Dabei besteht die Möglichkeit der Bindung einzelner Proteine an unabhängigen Bindungsstellen der (prä-) rRNA, der sequenziellen Assoziation einzelner Proteine an bereits gebundene ribosomale Proteine und Biogenesefaktoren oder auch der Assoziation vorgeformter prä-rRNA unabhängiger Proteinmodule. Weiterhin ist bisher auch unklar, ob diese Proteine als Einzelproteine oder im Komplex mit anderen Faktoren im Laufe der Ribosomenreifung von präribosomalen Partikeln abdissoziieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine systematische Methode etabliert werden, die es ermöglicht, die Existenz prä-rRNA freier Proteinkomplexe von Ribosomenbiogenesefaktoren im Modellorganismus *S. cerevisiae* *in vivo* zu analysieren. Dazu wurden die Biogenesefaktoren Noc1p, Nop7p, Rio2p, Enp1p, Rix1p und Arx1p in Abwesenheit von rRNA-Neusynthese affinitätsgereinigt. Die Zusammensetzung assoziierter, ohne prä-rRNA vorliegender Zusammenschlüsse wurde mittels semiquantitativer Massenspektrometrie mit dem jeweiligen Aufbau von präribosomalen Partikeln verglichen, die in Anwesenheit von rRNA-Synthese gereinigt wurden.

Im Zuge dieser Untersuchung konnten die Zusammensetzungen bereits beschriebener rRNA freier Proteinkomplexe bestätigt werden. Dabei handelt es sich um den Rix1p-Ipi1p-Ipi3p-Komplex, den Nop7p-Erb1p-Ytm1p-Komplex und das potentielle Dimer der beiden Proteine Noc1p und Noc2p. Weiterhin konnten in fast allen Fällen neue Komponenten dieser Komplexe identifiziert werden. So scheint Rrp5p, eine Komponente des SSU-Prozessoms, prä-rRNA unabhängig mit dem Noc1p-Noc2p-Komplex zu interagieren und die DEXD/H Box RNA-Helikase Drs1p Teil des Nop7p-Erb1p-Ytm1p-Komplexes zu sein. Diese Komplexe aus LSU-Biogenesefaktoren könnten vermutlich funktionelle Blöcke in der Bildung von prä-60S Partikeln darstellen.

Weiterhin scheint nach Abschalten der rRNA-Synthese *in vivo* ein Rio2p-Enp1p-Modul mit bis zu fünf weiteren Komponenten zu existieren. Dabei handelt es sich wahrscheinlich eher um einen Komplex, der im Laufe der Ribosomenreifung im Ganzen vom 40S Präribosom abdissoziiert und in Abwesenheit von rRNA-Synthese als reiner Proteinkomplex erhalten bleibt.

Bei dem hier gewählten Ansatz war es im Gegensatz zu vorangegangenen Analysen unwahrscheinlich, dass sich diese Proteinmodule durch ein Zerfallen präribosomaler Partikel ausgebildet hatten. Vielmehr lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass sie *in vivo* unabhängig von ablaufender Ribosomenbiosynthese existieren und als funktionelle Einheiten mit präribosomalen Partikeln interagieren können oder im Laufe der Ribosomenreifung aus präribosomalen Partikeln als Proteinkomplexe freigesetzt werden.

Zusätzlich zu diesen prä-rRNA unabhängigen Proteinmodulen konnten mehrere Ribosomenbiogenesefaktoren identifiziert werden, die nicht nur an neusynthetisierte große ribosomale Untereinheiten gebunden vorliegen. Arx1p, Tif6p/eIF6, Nmd3p und möglicherweise zusätzlich Rei1p, Alb1p und Lsg1p scheinen auch Assoziation an reife 60S Untereinheiten zu zeigen, die möglicherweise durch Termination der Transkription aus Polysomen freigesetzt werden. Dies lässt vermuten, dass sie eine doppelte Funktion in der Biogenese der großen Untereinheit und deren Stabilität und Recycling während der Translation ausfüllen könnten.

Durch anschließende heterologe Expression der jeweiligen Komponenten der Proteinkomplexe in Insektenzellen konnten die prä-rRNA unabhängigen Interaktionen innerhalb der Noc1p-Noc2p-Rrp5p Proteinkomplexe bestätigt und genauer charakterisiert werden. Auch innerhalb des Rio2p-Enp1p-Moduls konnten direkte Wechselwirkungen identifiziert werden, die jedoch noch genauer untersucht werden müssen. Prinzipiell scheinen Proteinmodule von Ribosomenbiogenesefaktoren mit dieser Methode in der nötigen Menge und Reinheit für anschließende funktionelle und strukturelle Untersuchungen exprimiert und gereinigt werden zu können.

Anfängliche Bindungstests dieser *in vitro* rekonstituierten Proteinkomplexe an kurze definierte rRNA-Fragmente waren nicht erfolgreich. Somit konnte nicht ermittelt werden, ob und, wenn ja, an welcher Stelle die identifizierten Proteinmodule in der Hefezelle mit präribosomalen Partikeln als vorgeformte Komplexe interagieren können. Da in der Vergangenheit zumindest für Rrp5p bereits eine Bindung an definierte Abschnitte der prä-rRNA nachgewiesen werden konnte, müssen in diesem Zusammenhang gegebenenfalls die Bindungsbedingungen entsprechend angepasst werden.

Grundsätzlich konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Grundlagen zu weiterführenden Analysen der Architektur von Proteinkomplexen von Ribosomenbiogenesefaktoren und zur Untersuchung deren *in vitro* Bindung an präribosomale Partikel geschaffen werden, um langfristig einen Einblick in die funktionelle Architektur präribosomaler Partikel zu gewinnen.

