

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Materialien und Kits

Amersham Bioscience	HisTrap HP 1 ml ÄKTA basic
Beckman Coulter	Polycarbonate Centrifuge Tubes 7 x 20 mm Polycarbonate Centrifuge Tubes 13 x 51 mm SW 55 Ti Rotor TLA 100.2 Rotor TLA 100.3 Rotor Type 60 Ti Rotor Ultra-Clear™ 5 x 41 mm
BioRad	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
EquiBio	Easyject Prima Electroporation Cuvette 1 mm Electroporation Cuvette 2 mm
Invitrogen	NuPAGE™ 12 % Bis-Tris Gele XCell II™ Blot Modul XCell™ SureLock Kammer
Millipore	Durapore GV Membranfilter 0,22 µm Immobilon-PVDF Transfer Membran Millex-GS MCE Sterilfilter 0,22 µm Millex-GV PVDF Filter 0,22 µm
QIAGEN	Ni-NTA Agarose QIAGEN Plasmid Midi Kit Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit QIAquick Gel Extraction Kit QIAquick PCR Purification Kit
Schleicher & Schuell	Optitran BA-S 83 Reinforced Nitrocellulosemembran
Sigma-Aldrich	Kodak BioMax MR Filme
Sorvall	GS3 Rotor GSA Rotor SS34 Rotor

2.1.2 Proteine, Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Chemikalien besitzen Analy-
senqualität und wurden von ROTH, Sigma-Aldrich oder Merck bezogen.

Ambion	SUPERase-In™ RNase Inhibitor
Amersham Bioscience	ECL Western Blotting Detection Reagents

AppliChem	Adenin Galactose für die Zellkultur Hefeextrakt L-Histidin freie Base für die Zellkultur L-Leucin L-Lysin – Monohydrat für die Zellkultur L-Methionin für die Zellkultur L-Tryptophan für die Zellkultur Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid – TCEP Uracil
BioRad	BioRad Protein Assay bovine IgG Standard
Difco	Bacto Nutrient Broth YPD Broth
Fermentas	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
NEB (New England Biolabs)	1 kb DNA Ladder 100 bp DNA Ladder Antarctic Phosphatase BamHI EcoRI Hinfl HindIII KpnI NdeI Protein Marker Broad Range 2 – 212 kDa T4 DNA Ligase T4 Polynucleotide Kinase Vent Polymerase XhoI
Q-BIOgene	Yeast Nitrogen Base – YNB w/o Ammonium Sulfate
Roche Applied Science	DNase I Protease Inhibitor Cocktail Complete EDTA-free RNase A
ROTH	4-Nitroblautetrazoliumchlorid – NBT 5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphate – BCIP Agar-Agar Milchpulver Blotting Grade Pepton aus Casein Phenylmethylsulfonylfluorid – PMSF
Sigma-Aldrich	β-Glucuronidase (#G7770) Blocking Buffer (#B6429) Kodak, Fixer Kodak, Polymax RT developer/replenisher Sucrose, 99+% (#S0389) Thrombin
Stratagene	Pfu Turbo DNA Polymerase

2.1.3 Cross-linking Reagenzien

Alle *Cross-Linker* wurden von PIERCE Biotechnology bezogen. Das photoaktivierbare Reagenz BPIA wurde von Molecular Biosciences bezogen.

DSS – Disuccinimidyl suberate

Reaktivität: homobifunktional zwischen Aminogruppen

Spacer Arm Length: 11,4 Å

DSP – Dithiobis(succinimidylpropionate)

Reaktivität: homobifunktional zwischen Aminogruppen

Spacer Arm Length: 12 Å

Sulfo-EGS – Ethylene glycolbis(sulfosuccinimidylsuccinate)

Reaktivität: homobifunktional zwischen Aminogruppen

Spacer Arm Length: 16,1 Å

SPDP – *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate

Reaktivität: heterobifunktional zwischen Amino- und Sulfhydrylgruppe

Spacer Arm Length: 6,8 Å

AMAS – *N*-(α -Maleimidoacetoxy)succinimide ester

Reaktivität: heterobifunktional zwischen Amino- und Sulfhydrylgruppe

Spacer Arm Length: 4,4 Å

Die Maleimid-Gruppe reagiert, wenn keine Sulfhydrylgruppen vorhanden sind, bevorzugt mit Aminogruppen (bei einem pH \geq 7,5), wodurch AMAS auch als homobifunktionaler *Cross-Linker* klassifiziert werden kann (PIERCE, *Cross-Linking Reagents, Technical Handbook*).

MBS – *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester

Reaktivität: heterobifunktional zwischen Amino- und Sulfhydrylgruppe

Spacer Arm Length: 9,9 Å

SIAB – *N*-Succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate

Reaktivität: heterobifunktional zwischen Amino- und Sulfhydrylgruppe

Spacer Arm Length: 10,6 Å

BPIA – Benzophenone-4-iodoacetamide

Reaktivität: photoreaktiv zwischen Sulfhydrylgruppe und C-H Bindung

Spacer Arm Length: 10 Å

2.1.4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^f Δ M15 Tn 10 (Tet ^r)]	Stratagene
ER2566	F ⁻ λ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) 114::IS10 R(<i>mcr-73::miniTN10-TetS</i>)2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>) <i>endA1 [dcm]</i>	NEB
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
Rosetta(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) pRARE (<i>argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL</i>) (Cm ^R)	Novagen

2.1.5 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	Thomas & Rothstein (1989)
YJF24	<i>MATa Δegd2 Δegd1 Δbtt1 ade2-1 Δade3 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	J. Franke
Y06717	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YLR406c::kanMX4</i>	EUROSCARF
YSC1021	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YDL075w::kanMX4</i>	open biosystems

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Charakteristika/Beschreibung	Referenz
pET-28a(+)	Expressionsvektor mit N- oder C-terminalem His ₆ -tag – T7 Promotor, <i>lacI</i> , Kan ^r	Novagen
pET-20b(+)	Expressionsvektor mit C-terminalem His ₆ -tag T7 Promotor, <i>peIB</i> , <i>bla</i>	Novagen
pYES2	2μ-Vektor für Expression in Hefe GAL1 Promotor, URA3-Marker, <i>bla</i>	Invitrogen
pRS425-GAL	2μ-Vektor für Expression in Hefe GAL1 Promotor (aus pYES2), LEU2-Marker, <i>bla</i>	R. Beckmann
pET28-egd2	<i>egd2</i> kloniert über NdeI und BamHI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His-tag und Thrombin-Schnittstelle	B. Beatrix
pET28-egd1	<i>egd1</i> kloniert über NdeI und BamHI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His-tag und Thrombin-Schnittstelle	B. Beatrix
pET28-yNAC	<i>egd1</i> kloniert über EcoRI und XhoI in pET28-egd2 zur Koexpression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His-tag und Thrombin-Schnittstelle an EGD2 (siehe Abbildung 9 für die Plasmidkarte)	diese Arbeit
pET28-yNAC βΔ1-11	wie pET28-yNAC ohne die Codons für die ersten 11 Aminosäuren von EGD1	diese Arbeit
pET20-yNAC	<i>egd2</i> und <i>egd1</i> ausgehend von pET28-yNAC umkloniert über NdeI und XhoI in pET20b zur Koexpression in <i>E. coli</i> mit C-terminalem His-tag an EGD1	diese Arbeit
pET28-yNAC N-Strep α	Gen für EGD2 mit N-terminalem Strep-tag über NdeI und BamHI ausgetauscht gegen <i>egd2</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC C-Strep α	Gen für EGD2 mit C-terminalem Strep-tag über NdeI und BamHI ausgetauscht gegen <i>egd2</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC C-c-myc α	Gen für EGD2 mit C-terminalem c-myc tag über NdeI und BamHI ausgetauscht gegen <i>egd2</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika/Beschreibung	Referenz
pET28-yNAC C-Protein C α	Gen für EGD2 mit C-terminalem Protein C- <i>tag</i> über NdeI und BamHI ausgetauscht gegen <i>egd2</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC C-Strep β	Gen für EGD1 mit C-terminalem Strep- <i>tag</i> über EcoRI und XhoI ausgetauscht gegen <i>egd1</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC C-c-myc β	Gen für EGD1 mit C-terminalem c-myc <i>tag</i> über EcoRI und XhoI ausgetauscht gegen <i>egd1</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC C-Protein C β	Gen für EGD1 mit C-terminalem Protein C- <i>tag</i> über EcoRI und XhoI ausgetauscht gegen <i>egd1</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC β I3C	wie pET28-yNAC – Codon für Ile ³ bei <i>egd1</i> mutiert zu Cys	diese Arbeit
pET28-yNAC β Q5C	wie pET28-yNAC – Codon für Gln ⁵ bei <i>egd1</i> mutiert zu Cys	diese Arbeit
pET28-yNAC β K7C	wie pET28-yNAC – Codon für Lys ⁷ bei <i>egd1</i> mutiert zu Cys	diese Arbeit
pET28-yNAC β A9C	wie pET28-yNAC – Codon für Ala ⁹ bei <i>egd1</i> mutiert zu Cys	diese Arbeit
pET28-yNAC β L11C	wie pET28-yNAC – Codon für Leu ¹¹ bei <i>egd1</i> mutiert zu Cys	diese Arbeit
pET28-yNAC α -BCCP	C-terminale Fusion von <i>egd2</i> mit der Biotinylierungs-Domäne von BCCP über NdeI und EcoRI ausgetauscht gegen <i>egd2</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-yNAC β -BCCP	C-terminale Fusion von <i>egd1</i> mit der Biotinylierungs-Domäne von BCCP über EcoRI und XhoI ausgetauscht gegen <i>egd1</i> in pET28-yNAC	diese Arbeit
pET28-rpL25	Gen für rpL25 nach Deletion der Intronsequenz kloniert über NdeI und BamHI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His- <i>tag</i> und Thrombin-Schnittstelle	diese Arbeit
pET28-rpL35	Gen für rpL35 kloniert über NdeI und BamHI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His- <i>tag</i> und Thrombin-Schnittstelle	diese Arbeit
pET28-rpL19	Gen für rpL19 kloniert über NdeI und BamHI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His- <i>tag</i> und Thrombin-Schnittstelle	diese Arbeit
pET28-rpL17	Gen für rpL17 kloniert über NdeI und EcoRI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His- <i>tag</i> und Thrombin-Schnittstelle	diese Arbeit
pET28-rpL4	Gen für rpL4 kloniert über NdeI und XhoI in pET28a zur Expression in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His- <i>tag</i> und Thrombin-Schnittstelle	diese Arbeit
pYES-y α WT	<i>egd2</i> mit Kozak-Sequenz kloniert über KpnI und EcoRI in pYES2 zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS425-y β WT	<i>egd1</i> mit Kozak-Sequenz kloniert über HindIII und XhoI in pRS425-GAL zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS425-y β Δ 1-11	wie pRS425-y β WT ohne die Codons für die ersten 11 Aminosäuren	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika/Beschreibung	Referenz
pRS425-y β EKL/AAA	wie pRS425-y β WT – Codons für Glu ⁶ , Lys ⁷ und Leu ⁸ mutiert zu Ala	diese Arbeit
pRS425-y β KLQ/AAA	wie pRS425-y β WT – Codons für Lys ¹⁰ , Leu ¹¹ und Gln ¹² mutiert zu Ala	diese Arbeit
pYES HA-rpL31	Gen für rpL31 mit N-terminalem HA- <i>tag</i> und Kozak-Sequenz kloniert über HindIII und EcoRI in pYES2 zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pYES rpL31-HA	Gen für rpL31 mit C-terminalem HA- <i>tag</i> und Kozak-Sequenz kloniert über HindIII und EcoRI in pYES2 zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pYES MBP	Gen für MBP kloniert mit Kozak-Sequenz über HindIII und XhoI in pYES2 zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pYES EGD1 ¹⁻¹⁴ -MBP	N-terminale Fusion der Codons für die ersten 14 Aminosäuren von EGD1 plus Linker mit MBP kloniert mit Kozak-Sequenz über HindIII und XhoI in pYES2 zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pYES EGD1 ¹⁻²³ -MBP	wie pYES EGD1 ¹⁻¹⁴ -MBP – Codons für die ersten 23 Aminosäuren von EGD1	diese Arbeit
pYES EGD1 ¹⁻³⁹ -MBP	wie pYES EGD1 ¹⁻¹⁴ -MBP – Codons für die ersten 39 Aminosäuren von EGD1	diese Arbeit

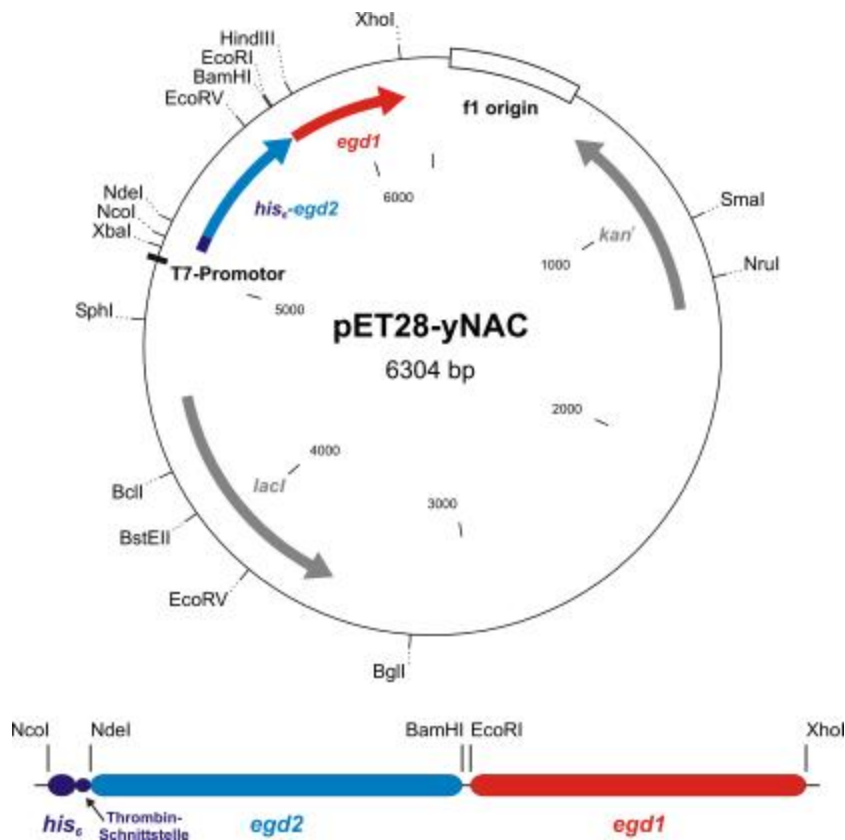


Abbildung 9 Plasmidkarte von pET28-yNAC. Zur besseren Veranschaulichung sind die klonierten Gene *egd2* und *egd1* mit der für den His-*tag* und die Thrombin-Schnittstelle kodierenden Region darunter schematisch illustriert.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Dr. W. Schröder synthetisiert oder von der Firma BioTez Berlin-Buch GmbH bezogen. Die Konzentration der Gebrauchslösungen wurde auf 25 μ M eingestellt. Für Klonierungen wurden die gewünschten Restriktionsstellen am 5'-Ende der Oligonukleotide eingefügt (für eine detaillierte Auflistung der Oligonukleotid-Sequenzen siehe 7.1).

2.1.8 Antikörper

Für Western Blots gegen EGD2 wurde humanes α NAC Antiserum, welches mit EGD2 kreuzreagiert, in der Verdünnung 1:5.000 verwendet. Das Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. Martin Wiedmann bereitgestellt. Das Antiserum gegen EGD1 wurde von B. Beatrix zur Verfügung gestellt und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Peptidsequenzen gegen die die Antikörper gerichtet sind befinden sich am C-Terminus der Proteine und sind nachfolgend aufgeführt.

Antikörper	Peptidsequenz
anti- α NAC	RALKNNSNDIVNAIMELT
anti-EGD1	ELVEGQTFDADVE

Für die Antikörper gegen die ribosomalen Hefe Proteine rpL25, rpL35 und rpL4 wurden von der Firma Davids Biotechnologie Hühner, mit den zur Verfügung gestellten gereinigten Proteinen, immunisiert und die IgYs gereinigt. Die Antikörper wurden in den Verdünnungen rpL25 1:1.000, rpL35 1:5.000 und rpL4 1:1.000 verwendet.

Weitere Antikörper wurden von Firmen bezogen:

dianova	Goat anti-Rabbit-HRP Rabbit anti-Chicken-HRP
NEB (New England Biolabs)	anti-MBP
Novagen	anti-His ₆
Santa Cruz Biotechnology	anti-HA Goat anti-Mouse-HRP
Sigma-Aldrich	Goat anti-Biotin-HRP Goat anti-Rabbit-AP Rabbit anti-Chicken-AP

HRP: konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.
 AP: konjugiert mit alkalischer Phosphatase.

Die Antikörper gegen die ribosomalen *E. coli* Proteine rpL2 und rpL22 wie auch Rabbit anti-Sheep-HRP wurden freundlicherweise von Dr. Knud Nierhaus zur Verfügung gestellt.

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Generelle molekularbiologische Methoden

Wenn nicht speziell aufgeführt, wurden allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden nach Protokollen von Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt.

2.2.2 Anzucht von Zellen und Stammkonservierung

Escherichia coli

LB-Medium	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
YENB-Medium	0,8 %	Bacto Nutrient Broth
	0,75 %	Hefeextrakt

E. coli Zellen wurden meistens bei 37°C in LB-Medium angezogen. Bei Amplifikation von Plasmiden wurden entsprechende Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) zugegeben. Für das Wachstum auf Festmedium wurde LB-Medium plus 1,6 % Agar verwendet. Zur dauerhaften Stammhaltung wurden *E. coli* Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase mit 15 % Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Saccharomyces cerevisiae

SD-Medium (<i>Synthetic Defined</i>)	0,17 %	YNB w/o Ammoniumsulfat
	0,5 %	Ammoniumsulfat
	2 %	Glucose oder Galactose
Aminosäuremix	40 mg/l	Adenin
	50 mg/l	Histidin
	100 mg/l	Leucin
	100 mg/l	Lysin
	50 mg/l	Methionin
	100 mg/l	Tryptophan
	20 mg/l	Uracil

YPD-Medium (Difco)	enthält	2 %	Pepton
		1 %	Hefeextrakt
		2 %	Glucose

S. cerevisiae Zellen wurden in YPD-Medium bei 30°C kultiviert. Plasmidhaltige Hefezellen wurden in SD-Medium mit dem jeweiligen Aminosäuremix angezogen. Die Konzentration der Aminosäuren wurden nach Herstellerangaben des „Brent – bzw. Hollenberg Supplement Mixture“ (Q-BIOgene) zugegeben. Abhängig von dem genutzten Auxotrophiemarker wurde ein Aminosäuremix verwendet, dem die entsprechende Aminosäure fehlt. Festmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar. Zur dauerhaften Stammhaltung wurden Hefezellen in 15 % Glycerol resuspendiert und direkt bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

E. coli Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine 500 ml Kultur in YENB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 bei 37°C angezogen. Nach Abkühlen der Kultur im Eis/Wasserbad wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6.000 xg (6.000 rpm, GSA Rotor), 4°C für 15 min sedimentiert. Dann wurden die Zellen mehrfach mit eiskaltem sterilen ddH₂O und zweimal mit Glycerol (10 %) gewaschen. *E. coli* Zellen wurden in 10 %igem Glycerol resuspendiert und die Suspension auf eine OD₆₀₀ von ~100 eingestellt. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Elektroporation erfolgte bei 1.800 V in einer Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 500 µl LB-Medium aufgenommen, bei 37°C für etwa 45 min geschüttelt und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.4 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine 500 ml Kultur in YPD-Medium bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 1,0 bei 30°C angezogen. Nach Abkühlen der Kultur im Eis/Wasserbad wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8.000 xg (7.000 rpm, GSA Rotor), 4°C für 7 min sedimentiert. Die Zellen wurden mehrmals mit eiskaltem sterilem ddH₂O und einmal mit 1 M Sorbitol gewaschen. Die

Hefe Zellen wurden in 1 M Sorbitol resuspendiert und die Suspension auf eine OD₆₀₀ von ~300 eingestellt. 100 µl Aliquots wurden direkt bei -80°C eingefroren und gelagert.

Die Elektroporation erfolgte bei 1.800 V in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 500 µl YPD-Medium aufgenommen und für 60 bis 90 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden kurz durch Zentrifugation sedimentiert, in sterilem ddH₂O resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.5 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR-Reaktionen wurden nach Newton und Graham (1997) angesetzt. Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler nach folgendem Grundprogramm durchgeführt:

Denaturierung	95°C / 5 min	
Denaturierung	95°C / 1 min	
Primer-Anlagerung	variabel	25 Zyklen
Primer-Extension	72°C / 1 – 2,5 min	
Extension	72°C / 5 min	

Die Anlagerungstemperatur und -zeit wurde basierend auf dem T_m-Wert und GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide variiert. Der T_m-Wert wurde mittels des *Oligonucleotide Properties Calculator* ermittelt.

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

2.2.6 Positions-spezifische Mutagenese

Die Punktmutationen für die Konstrukte pET28-yNAC β I3C, - β Q5C, - β K7C, - β A9C und - β L11C wurden in Anlehnung an das Protokoll des Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt.

2.2.7 Restriktion von DNA

Die Restriktionsverdau wurden nach Angaben des Enzymherstellers in den mitgelieferten Puffern unter Einhaltung der jeweiligen Temperaturoptima mit 2 bis 5 U der benötigten Restriktionsendonuklease pro µg DNA durchgeführt. Präparative Ansätze für Klonierungen wurden dabei über Nacht inkubiert, analytische Restriktionsverdau für durchschnittlich 3 Stunden.

2.2.8 DNA-Ligation

Nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Fragmentisolierung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wurde die geschnittene DNA in die Ligation eingesetzt.

Die Ligationsansätze wurden nach Angaben des Enzymherstellers durchgeführt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die ligierte DNA wurde zur Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen eingesetzt.

2.2.9 Präparation von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation der genomischen DNA aus Hefe wurde eine 100 ml Kultur in YPD-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 bei 30°C angezogen. Die Zellen aus 60 ml Kultur wurden durch Zentrifugation bei 3.000 xg für 10 min sedimentiert und in insgesamt 6 ml ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 1,5 ml aufgeteilt und die Hefezellen wieder sedimentiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 200 µl Lösung A aufgenommen und die Ansätze nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform plus 0,3 g steriler Glaskügelchen für 2 min gevortext. Nach Zugabe von 200 µl TE wurden die Ansätze zur Phasentrennung bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge) und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit 1 ml Ethanol gefällt und bei 13.000 rpm für 2 min sedimentiert. Das Pellet wurde zum Abbau der enthaltenen RNA in 400 µl TE plus 30 µg RNase A aufgenommen und für 10 min bei 37°C inkubiert. Zum Fällern der DNA wurden 18 µl 5 M NH₄-Acetat und 1 ml Ethanol zugefügt und die Ansätze über Nacht bei -20°C gelagert. Die DNA wurde dann bei 14.000 rpm, 4°C für 10 min pelletiert und nach Trocknen in 25 – 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen (modifiziert nach Amberg Lab Protocols).

(http://www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/yeast_genomic_DNA.html)

Lösung A	10 % Triton X-100	2 ml
	10 % SDS	1 ml
	5 M NaCl	200 µl
	1 M Tris-HCl pH 8,0	100 µl
	0,5 M EDTA	20 µl
	ddH ₂ O	ad 10 ml
TE	1 M Tris-HCl pH 8,0	100 µl
	0,5 M EDTA	20 µl
	ddH ₂ O	ad 10 ml

2.2.10 Herstellung einer genomischen Deletionsmutante in *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Deletion von Genen in Hefe wird das chromosomale Gen durch Rekombination durch ein Marker-Gen ersetzt (Abbildung 10). Hierfür wird das Marker-Gen mittels PCR amplifiziert. Bei der PCR wird der 5'- und 3'-Bereich des Ziel-Gens angefügt (A). Nach Transformation des PCR-Fragments in einen haploiden Hefestamm kann das Marker-Gen über die angefügten, zur chromosomalen DNA homologen, Bereiche ins Genom integrieren (B) und das Ziel-Gen ersetzen (C). Die Selektion erfolgt über den verwendeten Marker.

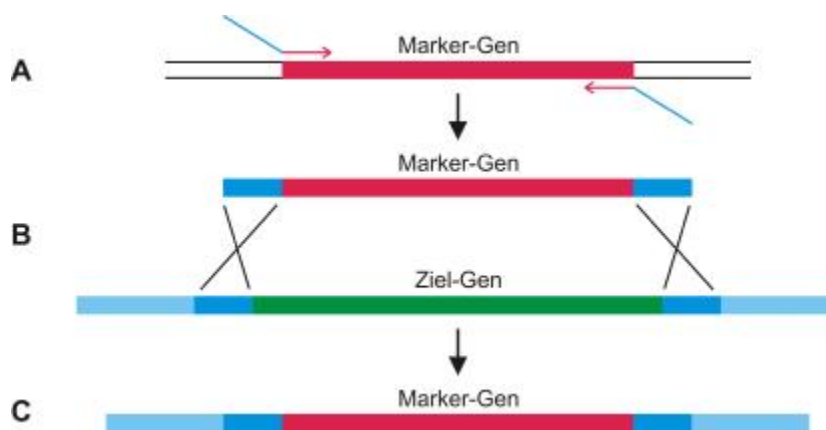


Abbildung 10 Schematische Illustration der Herstellung einer genomischen Deletion in *S. cerevisiae*. Das Ziel-Gen wird durch ein Marker-Gen mittels Rekombination über angefügte homologe Sequenzbereiche ersetzt.

Grundlage für die Herstellung einer *rpL31*-Nullmutante ist die Methode nach Schneider *et al.* (1996). Ziel war die Deletion des Gens *rpL31a* in dem Hefestamm Y06717 ($\Delta rpL31b$). Verwendet wurde das Plasmid pRS313 (Sikorski and Hieter, 1989), welches die Sequenz des Auxotrophiemarkers *HIS3* enthält. Das Gen wurde einschließlich der regulatorischen Sequenzbereiche mittels PCR amplifiziert. Bei der PCR wurden über die Oligonukleotide ca. 70 Nukleotide des 5'- und des 3'-nichttranslatierenden Bereichs von *rpL31a* angefügt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mittels Ethanol-Präzipitation ankonzentriert und in den Hefestamm Y06717 transformiert. Die Selektion erfolgte auf SD-Agar (komplementiert mit Leu, Met und Ura) bei 30°C. Die erhaltenen Kolonien wurden nach Präparation der genomischen DNA mittels PCR auf eine erfolgreiche Deletion hin überprüft (für die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide siehe 7.1.2).

2.2.11 *Mating, Sporulation und Tetraden-Analyse von S. cerevisiae*

Zur Analyse des möglicherweise letalen Phänotyps einer *rpL31*-Nullmutante in Hefe wurde eine Tetraden-Analyse eines heterozygoten Hefestamms (*rpL31a/ΔrpL31a; ΔrpL31b/rpL31b*) durchgeführt.

Zunächst wurden Zellen der beiden haploiden Stämme (Y06717 und YSC 1021) auf YPD-Agar gemischt und für 6 h bei 30°C inkubiert. Dies resultiert in diploiden Zellen, welche auf SD-Agar (komplementiert mit His, Leu und Ura) selektioniert wurden. Für die Sporulation des diploiden Stamms wurden 5 ml Pre-Sporulations-Medium mit Zellen (ca. 100 Kolonien) einer frisch ausgestrichenen Platte inokuliert und für 5 bis 6 h schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Hefe Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und einmal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl ddH₂O resuspendiert und gleichmäßig auf zwei Sporulations-Agar Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei RT für ca. 9 Tage (abhängig vom Fortschritt der Sporulation).

Für die Tetraden-Analyse wurde eine Impföse Zellen/Sporen in 50 µl sterilem ddH₂O resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 µl Glucoronidase für 5 min bei 30°C inkubiert (die Inkubationszeit kann je nach Aktivität des Enzyms variieren). Die Sporen wurden durch Zentrifugation kurz pelletiert und einmal mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl ddH₂O resuspendiert. Die Vereinzelung der Sporen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Udo Schmidt (Institut für Mikrobiologie und Genetik, TU Berlin) mit Hilfe eines Mikro-manipulators (Singer Instruments) auf YE-Agar Platten durchgeführt. Die Platten wurden bei 30°C für 4 Tage zum Auskeimen der Sporen inkubiert. Die Charakterisierung des Genotyps der ausgekeimten Sporen, im Hinblick auf *rpL31a* und *rpL31b*, erfolgte nach Präparation der genomischen DNA mittels PCR (für die verwendeten Oligonukleotide siehe 7.1.3).

Pre-Sporulations-Medium	5 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Glucose
	5 g/l	Ammoniumsulfat
	2 g/l	KH ₂ PO ₄
Sporulations-Agar	2,5 g/l	Hefeextrakt
	1 g/l	Glucose
	8,2 g/l	Kaliumacetat
	1,9 g/l	KCl
	0,35 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	15 g/l	Agar
	pH 6,5	

YE-Agar	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Glucose
	30 g/l	Agar

2.2.12 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Für Plamid-Mini- bzw. Midipräparationen aus *E. coli* wurden Kits von QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte DNA wurde bei -20°C oder nach Fällen mit 1/10 Volumen 3 M NH₄-Acetat pH 5,3 plus 3 Volumen 100 % Ethanol bei -80°C gelagert.

2.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungen, der in dieser Arbeit neu klonierten Konstrukte, wurden von der Firma GATC (Konstanz) und MWG-Biotech AG unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Didesoxynukleotide durchgeführt (modifiziert nach Sanger *et al.*, 1977).

2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.3.1 Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) mittels des BioRad Protein-Assay bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Proteinstandard wurde für Hefe NAC bovines IgG (Immunglobulin G) eingesetzt.

Ribosomenkonzentration

Die Konzentration der Ribosomen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die molare Konzentration wurde festgelegt: 1 AU₂₆₀ = 20 pmol/ml 80S Ribosomen (persönliche Auskunft Prof. R. Beckmann).

2.3.2 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese – SDS-PAGE

Die bei der SDS-PAGE verwendeten Gele und der Elektrophorese-Puffer wurden hergestellt nach Laemmli, 1970. Die Elektrophorese erfolgte in Multigelkammern von Biometra bei konstant 170 V für 1 h. Der für die Probenvorbe-

reinigung benötigte SDS-Probenpuffer wurde hergestellt nach Sambrook *et al.*, 1989. Alle Proben wurden vor dem Beladen des Gels für 2 – 5 min bei 95°C erhitzt.

Elektrophorese mit NuPAGE Bis-Tris Gelen

Für besser reproduzierbare und miteinander vergleichbare Gele wurden die Proben aus *Cross-linking* Ansätzen über kommerziell erhältliche NuPAGE Bis-Tris Gele getrennt. Die Elektrophorese wurde in einer XCell™ SureLock Kammer (Invitrogen) unter Verwendung von MES-SDS Puffer (50 mM MES; 50 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS) durchgeführt. Im Allgemeinen erfolgte die Elektrophorese der Proben aus den *Cross-linking* Ansätzen bei konstant 40 mA oder 45 mA für 2,5 bis 4 h.

2.3.3 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) bei 1,9 mA pro cm² Gel für 1 h. Der Protein-Transfer wurde in einem kontinuierlichen Puffersystem durchgeführt.

Transferpuffer: 50 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,04 % SDS; 20 % Methanol

Tank-Blotting

Die auf NuPAGE Bis-Tris Gelen augetrennten Proteine wurden im Gegensatz zum Semi-Dry-Verfahren in einer Tank-Blotting Apparatur (XCell II™ Blot Modul, Invitrogen) auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte ebenfalls in einem kontinuierlichen Puffersystem bei konstant 30 V für 1 h.

Transferpuffer: 25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, 20 % Methanol

2.3.4 Immunreaktion und Detektion von Antikörpern

Nach dem Western-Blot wurde die Nitrocellulose-Membran für 15 – 30 min bei RT mit PBS-Milchpulver-Puffer geblockt. Anschließend wurde die Membran mit PBS-Milchpulver-Puffer plus dem ersten Antikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist, über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert.

Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween-Puffer für je 15 min entfernt. Die Membran wurde in PBS-Milchpulver-Puffer plus sekundärem Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und war entweder mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Nach erneutem Waschen wurden die Antikörper detektiert.

PBS-Puffer (*Phosphate-buffered Saline*)

NaCl	8 g / l
KCl	0,2 g / l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g / l
KH ₂ PO ₄	0,24 g / l
pH-Wert	7,4

PBS-Milchpulver-Puffer: PBS plus 5 % Milchpulver

PBS-Tween-Puffer: PBS plus 0,05 % Tween 20

Detektion von alkalischer Phosphatase – Konjugat

Die Membran wurde 2 min im Entwicklungs-Puffer äquilibriert und anschließend in der Färbelösung inkubiert, bis die Banden klar zu sehen waren. Die Farbentwicklung wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O und Überführen der Membran in den Stopp-Puffer abgebrochen.

Entwicklungs-Puffer		Färbelösung	
100 mM	Tris-HCl pH 9,5	7,5 ml	Entwicklungs-Puffer
100 mM	NaCl	33 µl	NBT-Lösung
50 mM	MgCl ₂	25 µl	BCIP-Lösung

Stopp-Puffer

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
500 mM	Na ₂ EDTA

NBT-Lösung: 75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumchlorid in 70 % Dimethylformamid

BCIP-Lösung: 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphate
in 100 % Dimethylformamid

Detektion von Meerrettich Peroxidase - Konjugat

Die Detektion der Peroxidase-konjugierten Antikörper erfolgte über das ECL-System – *enhanced chemiluminescence* (Whitehaed *et al.*, 1979). Die Membran wurde mit der Detektions-Reagenz überschichtet und für 1 min inkubiert. Die Peroxidase oxidiert dabei das in dem Reagenz enthaltene Luminol,

was zu einer Lichtemission von maximal 428 nm führt, welche mittels Exposition auf BioMax MR Filme und Entwicklung die Banden sichtbar werden lässt. Die Expositionszeiten variierten je nach Menge der zu detektierenden Proteine zwischen 5 sek und 30 min.

2.3.5 TCA-Präzipitation von Proteinen

Die Probe wird mit ddH₂O auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl 0,15 % Natriumdeoxycholat und 100 µl 72 % TCA (Trichloroessigsäure) wird der Ansatz durchmischt (Vortex) und 20 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine werden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C für 15 min pelletiert (Eppendorfszentrifuge). Das Pellet wird einmal mit 500 µl Aceton (-20°C) gewaschen (kurz vortexen) und erneut für 5 min zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets an der Luft wird es in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Zum besseren Wiederaufnehmen kann das Proteinpellet erst in 100 mM NaOH (50 % des Endvolumens) resuspendiert und dann mit 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt werden.

2.3.6 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Zur Kultivierung der Plasmid-haltigen *E. coli* Zellen wurden zunächst 100 ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie einer frisch transformierten Bakterienkultur angeimpft und diese Vorkultur schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Die präparative Anzucht erfolgte im 8 x 1 l Maßstab. Das LB-Medium wurde mit 10 ml/l der Vorkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 (logarithmische Wachstumsphase) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM in der Kultur induziert. Nach weiterer Inkubation für 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 11.000 xg (8.000 rpm, GS3 Rotor), 4°C für 8 min geerntet und im etwa dreifachen Volumen des Zellgewichts mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden entweder direkt aufgeschlossen oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.7 Zellaufschluss von *E. coli*

Vor dem Zellaufschluss wurde zu der Bakteriensuspension (2.3.6) Protease-Inhibitor-Cocktail Complete (eine Tablette pro 50 ml) gegeben und zum Abbau der DNA während des Aufschlusses 2 µl DNase I (500 U). Die Zellen wurden zweimal in einer French[®] Press-Druckentspannungs-Anlage bei 4°C mit einem Druck von ungefähr 75 bar aufgeschlossen. Zum Abtrennen von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zelltrümmern und Membranen wurde das Zelllysat bei 120.000 xg (35.000 rpm, Type 60 Ti Rotor), 4°C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt für die Proteinreinigung eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.8 Proteinreinigung durch chromatographische Methoden

Nickel-Affinitätschromatographie

Da alle NAC-Konstrukte aufgrund der durchgeführten Klonierungen in pET28a bzw. pET20b mit einem N- oder C-terminalem His-*tag* exprimiert werden, wurde als erster Aufreinigungsschritt die Ni-Affinitätschromatographie ausgewählt. Die Chromatographie erfolgte mit einer 1 ml HisTrap HP Säule (Amersham Bioscience) an der ÄKTA Chromatographie-Anlage. Ausgehend von einer präparativen 8 l Anzucht wurden drei Säulen-Läufe mit je einem Drittel des von Zelltrümmern und Membrane geklärten Proteinextrakts (2.3.7), welcher zuvor filtriert wurde, als Probenaufrag durchgeführt. Im Anschluss an den Probenaufrag wurde mit 50 CV (Säulenvolumen) 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0 mM bis 300 mM Imidazol über 20 CV im selben Puffer. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 1 ml (siehe Abschnitt 3.4.2 Abb. 18A für ein exemplarisches Chromatogramm und SDS-PAGE der Elution). Die vereinigten Fraktionen wurden zur proteolytischen Entfernung des His-*tags* nach Zugabe von Thrombin über Nacht bei 4°C gegen 20 mM HEPES-KOH pH 7,5; 150 mM KCl; 2 mM CaCl₂ dialysiert. Die Menge an eingesetztem Thrombin wurde je nach Konstrukt geringfügig variiert (etwa 0,2 U Thrombin pro 1 mg zu schneidendes Protein der vereinigten Elutionsfraktionen der Ni-Affinitätschromatographie).

Heparin-Affinitätschromatographie

Als zweiter Aufreinigungsschritt wurde eine weitere Affinitätschromatographie durchgeführt. Das verwendete Material Heparin (20HE, POROS) eignet sich dabei besonders für Proteine, die an Nukleinsäuren binden. Verwendet wurde eine Säule mit einem Volumen von 6,7 ml. Die dialysierte Probe aus der Ni-Affinitätschromatographie wurde zur Inaktivierung des Thrombins mit PMSF bis zu einer Endkonzentration von 100 μ M versetzt und filtriert. Im Anschluss an den Probenauftrag wurde die Säule mit 12 CV 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 50 mM KCl gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 50 mM bis 700 mM KCl in 20 mM Hepes-KOH pH 7,5 über 25 CV. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 2 ml (siehe Abschnitt 3.4.2 Abb. 18B für ein exemplarisches Chromatogramm und SDS-PAGE der Elution). Die ausgewählten Fraktionen wurden für den nächsten Aufreinigungsschritt vereinigt.

Anionen-Austausch-Chromatographie

Im letzten Aufreinigungsschritt wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie (20HQ, POROS) durchgeführt. Das Säulenvolumen betrug 1,7 ml. Die von der Heparin-Affinitätschromatographie vereinigten Fraktionen wurden mit dem zweifachen Volumen 20 mM Hepes-KOH pH 7,5 verdünnt. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 12 CV 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 50 mM KCl gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 50 mM bis 1000 mM KCl über 30 CV. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 1 ml (siehe Abschnitt 3.4.2 Abb. 18C für ein exemplarisches Chromatogramm und SDS-PAGE der Elution). Die ausgewählten sauberen Fraktionen wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.9 Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die in *E. coli* exprimierten ribosomalen Hefe Proteine rpL25, rpL35 und rpL4 lagen in den Zellen vollständig in *inclusion bodies* vor. Daher wurde ein Protokoll zur Reinigung von Proteinen aus *inclusion bodies* unter denaturierenden Bedingungen verwendet.

Die präparativen Anzuchten und der Zellaufschluss erfolgten wie in 2.3.6 und 2.3.7 beschrieben. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde das in *inclusion bodies* vorliegende Protein durch Zentrifugation bei 10.500 $\times g$ (9.500 rpm, SS34

Rotor), 4°C für 20 min sedimentiert. Das Pellet wurde zum Waschen des Proteins ein- bis zweimal in 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05 % CHAPS; 0,05 % Triton X-100 resuspendiert. Im Anschluss wurden die *inclusion bodies* in 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 8 M Harnstoff gelöst. Gegebenenfalls wurden nicht gelöste Bestandteile durch Zentrifugation bei 120.000 xg (35.000 rpm, Type 60 Ti Rotor), 4°C für 1 h abgetrennt.

Zur Aufreinigung wurde die Ni-Affinitätschromatographie aufgrund des N-terminalen His-*tags* an den rekombinanten ribosomalen Proteinen ausgewählt. Die Chromatographie wurde mit Ni-NTA Agarose (QIAGEN) im *batch* Verfahren durchgeführt, da in der Probe weitestgehend nur das ursprünglich in *inclusion bodies* vorliegende Protein enthalten sein sollte und unspezifische Interaktionen mit dem Material unter denaturierenden Bedingungen nahezu vollständig unterbunden werden. Die filtrierten Proben wurden für 1 h mit Ni-NTA Agarose schüttelnd bei 4°C inkubiert. Dann wurde das Material nach Entfernen des Durchlaufs 10-mal mit je 10 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 6 M Harnstoff; 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte durch sechsmalige Inkubation der Ni-NTA Agarose mit je 2 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 6 M Harnstoff; 500 mM Imidazol. Die gereinigten Proteine wurden zur Immunisierung von Hühnern verwendet (2.1.8).

2.3.10 Protein-Totalextrakt aus Hefe

Die Zellen von 1 ml einer über Nacht inkubierten Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert und das Pellet in 150 µl 1,85 M NaOH; 7,4 % β-Mercaptoethanol; 1 % PMSF resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 150 µl 50 % TCA (Trichloressigsäure) zum Fällern der Proteine zugegeben und der Ansatz weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C für 2 min sedimentiert (Eppendorfzentrifuge) und das Pellet einmal mit 1 ml Aceton (-20°C) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und zum Lösen zunächst in 50 µl 100 mM NaOH resuspendiert und dann mit 50 µl 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt (modifiziert nach Yaffe and Schatz, 1984).

2.3.11 Präparation von 80S Ribosomen aus *S. cerevisiae*

Zur Kultivierung der Hefezellen wurden zunächst 150 ml YPD-Medium (SD-Medium mit Aminosäuremix bei Plasmid-haltigen Hefezellen) mit einer Einzelkolonie einer frisch ausgestrichenen Platte (2 bis 3 Tage inkubiert) inokuliert und bei 30°C über Nacht schüttelnd inkubiert.

Die Anzucht für die Präparation von 80S Ribosomen erfolgte im 8 x 1 l Maßstab. Das YPD-Medium (oder SD-Medium mit 2 % Galactose anstatt Glucose) wurde mit einer gewünschten Start OD₆₀₀, welche anhand der Verdopplungszeit des Hefestamms ermittelt wurde, von der Vorkultur inokuliert und bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 1,0 bis maximal 1,5 durch Zentrifugation bei 7.000 xg (6.000 rpm, GS3 Rotor), 4°C für 6 min gerentet und einmal mit eiskaltem ddH₂O und einmal mit eiskaltem 1 % KCl gewaschen. Anschließend wurden die Hefezellen in 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM DTT resuspendiert und für 15 bis 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen wurde das Pellet in Lysispuffer in einem Gesamtvolumen von 60 – 70 ml aufgenommen.

Die resuspendierten Zellen wurden in drei Durchgängen bei 4°C mit dem EmulsiFlex-C5 High Pressure Homogenizer bei ungefähr 1.400 bar aufgeschlossen. Zum Abtrennen von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden die Ansätze bei 16.000 xg (15.500 rpm, SS34 Rotor), 4°C für 15 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in neue Zentrifugenröhrchen überführt und bei 100.000 xg (35.700 rpm, Type 60 Ti Rotor), 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Lipidphase oder loses Material am Boden des Zentrifugenröhrchens mit aufzunehmen. Dieser Extrakt, der frei ist von Zellkernen, Mitochondrien und Membranen, wird als S100 bezeichnet. Der S100 wurde in 5 – 10 ml Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Präparation Hochsalz-gereinigter Ribosomen wurde der S100 mit Kalium-Acetat auf eine Endkonzentration von 500 mM eingestellt (falls notwendig 700 mM) und 30 min auf Eis inkubiert. 1 ml Hochsalz-Saccharosekissen wurde mit 2 ml dieses S100 überschichtet und die Ribosomen durch Zentrifugation bei 540.000 xg (100.000 rpm, TLA-100.3 Rotor), 4°C für 1 h sedimentiert. Der Überstand wurde Vorsichtig von Oben her abgenommen und das Pellet in Ribosomen-Puffer resuspendiert. Zum schonenden Wiederaufnehmen der

Ribosomen wurde dabei das Pellet nur mit dem Puffer überschichtet und die Zentrifugenröhrchen auf Eis gestellt (gegebenenfalls über Nacht).

Lysispuffer		Hochsalz-Saccharosekissen	
20 mM	Hepes-KOH pH 7,5	20 mM	Hepes-KOH pH 7,5
100 mM	Kalium-Acetat pH 7,5	500 mM	Kalium-Acetat pH 7,5
20 mM	Magnesium-Acetat	20 mM	Magnesium-Acetat
4 mM	DTT	1 mM	DTT
150 mM	Saccharose	1 M	Saccharose
500 µM	PMSF	100 µM	PMSF
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete	1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete
Ribosomen-Puffer			
20 mM	Hepes-KOH pH 7,5		
100 mM	Kalium-Acetat pH 7,5		
20 mM	Magnesium-Acetat		
1 mM	DTT		
500 µM	PMSF		
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete		

2.3.12 Analytische Sedimentation von 80S Ribosomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Charakterisierung der Assoziation der in YJF24 exprimierten unterschiedlichen NAC-Varianten mit Ribosomen wurden die 80S Ribosomen unter physiologischen Salzkonzentrationen sedimentiert.

Die Kultivierung der verschiedenen Hefeklone erfolgte in SD-Medium mit dem entsprechenden Aminosäuremix. Die Anzucht wurde im 3 x 1 l Maßstab in SD-Medium mit 2 % Galactose (anstatt Glucose) durchgeführt. Die Gene für EGD2 bzw. EGD1 liegen auf den Plasmiden pYES2 bzw. pRS425-GAL unter Kontrolle eines GAL1 Promotors vor, der durch Glucose reprimiert und durch Galactose induziert wird. Die Zellernte und weitere Aufarbeitung der Proben bis zum S100 erfolgte wie in 2.3.11 beschrieben.

Für die Sedimentation wurde 1 ml Niedrigsalz-Saccharosekissen mit 1 ml S100 überschichtet und die Ribosomen durch Zentrifugation bei 540.000 xg (100.000 rpm, TLA-100.3 Rotor), 4°C für 1 h pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig von Oben her abgenommen und die Ribosomen in Ribosomen-Puffer (2.3.11) wieder resuspendiert. Zur Bestimmung der exakten Menge an Ribosomen aus 1 ml S100 wurden das genaue Volumen der resuspendierten Ribo-

somen und die Konzentration ermittelt. Somit konnten in der späteren Analyse von den verschiedenen Präparationen äquivalente Probenmengen eingesetzt werden.

Niedrigsalz-Saccharosekissen

20 mM	Hepes-KOH pH 7,5
100 mM	Kalium-Acetat pH 7,5
20 mM	Magnesium-Acetat
1 mM	DTT
1 M	Saccharose
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete

2.3.13 Ribosomen-Rückbindungstest

Zur funktionellen Charakterisierung der gereinigten rekombinanten NAC-Varianten wurde die Assoziation mit Hefe Ribosomen in Rückbindungsstudien analysiert. 40 pmol Hochsalz-gereinigte 80S Ribosomen aus YJF24 wurden zusammen mit 80 pmol NAC in 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 150 mM Kalium-Acetat pH 7,5; 20 mM Magnesium-Acetat; 1 mM DTT; Protease-Inhibitor-Cocktail Complete (Gesamtvolumen 20 µl) für 2 min bei 26°C und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz der jeweiligen NAC Präparation ohne Ribosomen durchgeführt. Nach Inkubation wurden 100 µl Niedrigsalz-Saccharosekissen (2.3.12) mit dem Ansatz überschichtet und die Ribosomen bei 355.000 xg (100.000 rpm, TLA-100.2 Rotor), 4°C für 1 h sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das verbliebene NAC TCA-präzipitiert (2.3.5). Das Pellet und die Ribosomen wurden in gleichen Volumina SDS-Probenpuffer aufgenommen (modifiziert nach Beatrix *et al.*, 2000).

2.3.14 Sedimentation über Saccharose-Stufengradient

Eine alternative Methode zum Pelletieren der Ribosomen beim Rückbindungstest ist die Sedimentation durch einen Saccharose-Stufengradienten. Die Lösungen der einzelnen Stufen (jeweils 125 µl) werden dabei vorsichtig im Zentrifugenröhrchen nacheinander überschichtet, beginnend mit 45 % Saccharose. Der Rückbindungsansatz (2.3.13) wurde nach Inkubation auf den Stufengradienten gegeben und die Ribosomen bei 76.000 xg (25.000 rpm, SW 55 Ti

Rotor), 4°C für 5 h sedimentiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient vorsichtig von Oben her in 50 µl Aliquots fraktioniert und die einzelnen Proben TCA-präzipitiert (2.3.5). Die Pellets wurden in gleichen Volumina SDS-Probenpuffer aufgenommen. Ein Ribosomen-Pellet erhält man bei dieser Zentrifugation nicht, da die Ribosomen während der Sedimentation nur den Übergang von 25 % nach 35 % Saccharose erreichen (siehe Abschnitt 3.6.2 Abb. 32).

Saccharosekissen für Stufengradienten

20 mM	Hepes-KOH pH 7,5
100 mM	Kalium-Acetat pH 7,5
20 mM	Magnesium-Acetat
1 mM	DTT
X %	Saccharose
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete

Die Saccharosekonzentration betrug entsprechend der verschiedenen Stufen 5 %, 15 %, 25 %, 35 % und 45 %.

2.3.15 *In vitro* Transkription

Das Plasmid pffLuc enthält das Gen für die peroxisomale *Firefly-Luciferase* unter Kontrolle eines SP6 Promotors. Für die Produktion der mRNA wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease Hinfl verdaut und das Fragment, das die ersten 77 Aminosäuren der *Firefly-Luciferase* kodiert *in vitro* mit einer SP6 RNA Polymerase transkribiert (Gilmore *et al.*, 1991).

2.3.16 *In vitro* Translation und Isolation von *Ribosome Nascent Chain Complexes* (RNCs)

Die bei der *in vitro* Translation eingesetzte mRNA kodiert die ersten 77 Aminosäuren der *Firefly-Luciferase* (77aaffLuc) und wurde ohne Stopp-Codon synthetisiert (2.3.15). Die Translation wurde wie beschrieben (Jackson and Hunt, 1983) in einem zellfreien Kaninchen Retikulozyten-Lysat (Promega) in Gegenwart von L-[³⁵S]-Methionin durchgeführt. Für den späteren Photo-Cross-linking Nachweis wurde im Translationsansatz Lysyl-tRNA eingesetzt, bei der die ε-Aminogruppe des Lysins mit TDBA (4-(3-trifluoromethyl-diazirino) benzoic acid) markiert ist (Görlich *et al.*, 1991). Die mRNA wurde für 20 min bei 26°C translatiert und der Ansatz sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1/10

Volumen 5 M Kalium-Acetat pH 7,5 und das 3-fache Volumen Hochsalz-Verdünnungspuffer hinzugegeben und die RNCs mittels Zentrifugation bei 540.000 xg (100.000 rpm, TLA-100.3 Rotor), 4°C für 45 min durch ein 1,5 ml Hochsalz-Saccharosekissen pelletiert. Die RNCs wurden 2-fach konzentriert in Ribosomenbindungs-Puffer wieder aufgenommen und zum Entfernen von unlöslichem Material kurz bei 14.000 rpm, 4°C für 3 min zentrifugiert.

Hochsalz-Verdünnungspuffer		Hochsalz-Saccharosekissen	
50 mM	Hepes-KOH pH 7,5	50 mM	Hepes-KOH pH 7,5
500 mM	Kalium-Acetat pH 7,5	50 mM	Kalium-Acetat pH 7,5
5 mM	Magnesium-Acetat	5 mM	Magnesium-Acetat
2 mM	DTT	2 mM	DTT
0,8 U/µl	SUPERase-In	500 mM	Saccharose
		0,8 U/µl	SUPERase-In
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete	1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete
Ribosomenbindungs-Puffer			
50 mM	Hepes-KOH pH 7,5		
50 mM	Kalium-Acetat pH 7,5		
5 mM	Magnesium-Acetat		
2 mM	DTT		
0,8 U/µl	SUPERase-In		
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete		

2.4 Cross-linking

2.4.1 Photo-Cross-linking Nachweis

Für die funktionelle Charakterisierung der Interaktion von rekombinantem NAC mit der naszierenden Polypeptidkette wurden 2 µl der in Ribosomenbindungs-Puffer aufgenommenen RNCs (2.3.16) zusammen mit 0,5 bis 1 µg NAC in 40 mM Hepes-KOH pH 7,5; 100 mM Kalium-Acetat; 5 mM Mg-Acetat; 2 mM DTT für 2 min bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion des TDBA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (320 nm) für 10 min auf Eis aktiviert. Zum Abbau von ³⁵S markierter Met-tRNA^{Met} wurden die Ansätze nach Zugabe von 10 µg RNase A für 10 min bei 26°C inkubiert und anschließend mit dem 2-fachen Volumen SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die

Proben wurden nach SDS-PAGE mittels Autoradiographie analysiert (Görlich *et al.*, 1991).

2.4.2 Chemisches *Cross-linking*

Die Reaktionsansätze wurden auf der Grundlage des Rückbindungstests (2.3.13), Protokollen des Herstellers der Reagenzien und verschiedener Literaturangaben optimiert.

Hochsalz-gereinigte 80S Ribosomen (4 μ M) aus YJF24 wurden zusammen mit rekombinantem Hefe NAC (8 μ M) in 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 150 mM Kalium-Acetat; 20 mM Magnesium-Acetat; Protease-Inhibitor-Cocktail Complete für 2 min bei 26°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe einer frisch in DMSO hergestellten Lösung der *Cross-linking* Reagenz (Endkonzentration im Ansatz 1,6 mM) wurden die Reaktionen für 2 h bei 4°C inkubiert. Zum Abstoppen der chemischen Reaktion wurde ein 50-facher Überschuss an Glycin bzw. Cystein (entsprechend der reaktiven Gruppen des *Cross-Linkers*) hinzugefügt. Nach Inkubation für 30 min bei RT wurden die Ansätze mit Kalium-Acetat auf eine Endkonzentration von 500 mM eingestellt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Zum Entfernen von nicht mit ribosomalen Proteinen verknüpftem NAC wurden die Ribosomen durch ein 100 μ l Hochsalz-Saccharosekissen bei 355.000 xg (100.000 rpm, TLA-100.2 Rotor), 4°C für 1 h sedimentiert. Das Pellet wurde in RNase-Puffer aufgenommen. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C wurden die Ansätze mit 2-fach SDS-Probenpuffer (je nach *Cross-linking* Reagenz ohne DTT) gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Parallel zu den beschriebenen Reaktionsansätzen wurden Kontrollen ohne NAC bzw. ohne Ribosomen durchgeführt. Im Fall des Kontrollansatzes, der nur Hefe NAC enthält, entfällt der Zentrifugationsschritt.

Hochsalz-Saccharosekissen		RNase-Puffer	
20 mM	Hepes-KOH pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
500 mM	Kalium-Acetat pH 7,5	500 mM	NaCl
20 mM	Magnesium-Acetat	2 mM	EDTA
0,5 M	Saccharose	0,5 mg/ml	RNase A
1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete	1x	Protease-Inhibitor-Cocktail Complete

2.4.3 Positions-spezifisches *Cross-linking*

Die Reaktionsansätze für das *Cross-linking* der N-terminalen Cystein-Mutanten von EGD1 wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Laufen *et al.* (1999) durchgeführt. 6 μM NAC in 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 150 mM Kalium-Acetat; 20 mM Magnesium-Acetat; 5 mM TCEP; Protease-Inhibitor-Cocktail Complete wurden für 30 min bei 30°C zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken inkubiert. TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin) hat dabei gegenüber DTT oder β -Mercaptoethanol den Vorteil, dass es keine Sulfhydrylgruppen hat und man es nicht durch Dialyse wieder entfernen muss (Rhee and Burke, 2004). Zum Markieren der Cysteinreste wurde BPIA (Benzophenone-4-iodoacetamide) frisch gelöst in Dimethylformamid in einer Endkonzentration von 12 μM im Ansatz zugegeben und die Reaktion für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe eines 5-fachen Überschuss an DTT und weiterer Inkubation für 15 min. Zu dem mit BPIA markierten NAC wurden Hochsalz-gereinigte 80S Ribosomen aus YJF24 in einer Endkonzentration von 3 μM gegeben und die Proben für 2 min bei 26°C und 5 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion der photoreaktiven Gruppe wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (320 nm) für 5 min auf Eis aktiviert. Die Ansätze wurden dann mit Kalium-Acetat auf eine Endkonzentration von 500 mM eingestellt, für 30 min auf Eis inkubiert und die Ribosomen mittels Zentrifugation bei 355.000 $\times g$ (100.000 rpm, TLA-100.2 Rotor), 4°C für 1 h durch ein 100 μl Hochsalz-Saccharosekissen (2.4.2) sedimentiert. Die Pellets wurden in RNase-Puffer (2.4.2) aufgenommen, für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2-fach SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

2.4.4 Präparative *Cross-linking* Ansätze und Reinigung

Die Reinigung von *Cross-Link* Produkten erfolgte aus präparativen Reaktionsansätzen unter Verwendung der NAC-Konstrukte mit N-terminalem His-*tag* an EGD2 bzw. C-terminalem His-*tag* an EGD1. Die Reaktionen wurden in Aliquots von 100 μl mit 6 μM Hochsalz-gereinigten 80S Ribosomen aus YJF24 und 12 μM NAC in 20 mM Hepes-KOH pH 7,5; 150 mM Kalium-Acetat; 20 mM Magnesium-Acetat; Protease-Inhibitor-Cocktail Complete wie in 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Für die chemische Verknüpfung wurde das *Cross-linking* Reagenz AMAS (*N*-(α -Maleimidoacetoxy) succinimide ester) in einer Endkon-

zentration von 2,4 mM in der Reaktion eingesetzt. Nach Inkubation der pelletierten Ribosomen in RNase-Puffer plus 4 mM DTT wurden die Ansätze zur Solubilisierung der ribosomalen Proteine mit dem 30-fachen Volumen Ni-NTA-Bindungs-Puffer verdünnt. Die *Cross-Link* Produkte wurden über eine Ni-Affinitätschromatographie (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) im *batch*-Verfahren gereinigt. Nach Beladen wurde das Säulenmaterial zehnmal mit je 10 ml Ni-NTA-Bindungs-Puffer ohne Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte durch mehrfaches inkubieren der Ni-NTA Agarose für 10 min in jeweils 1 ml Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen wurden durch TCA-Präzipitation (2.3.5) vereinigt.

Ni-NTA-Bindungs-Puffer		Elutionspuffer	
50 mM	Tris-HCl pH 8,0	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
500 mM	NaCl	500 mM	NaCl
6 M	Harnstoff	6 M	Harnstoff
20 mM	Imidazol	500 mM	Imidazol

2.5 Synthese und Analyse einer Zellulose-gebundenen Peptid-Bibliothek von rpL31

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Volkmer-Engert am Institut für medizinische Immunologie der Charite wurde eine Zellulose-basierte Peptid-Bibliothek von rpL31 aus *S. cerevisiae* mittels automatischer Spot-Synthese an einem AMS Spot-Roboter hergestellt (Frank, 1992; Wenschuh *et al.*, 2000). Dabei wurden 15 Aminosäuren lange Peptide synthetisiert, die die gesamte Polypeptidsequenz von rpL31 repräsentieren. Benachbarte Peptide waren dabei um jeweils 2 Aminosäuren versetzt.

1. Peptid: MAGLKDVVTREY TIN
2. Peptid: GLKDVVTREY TINLH
3. Peptid: KDVVTREY TINLHKR
4. Peptid: VVTREY TINLHKRLH usw.

Vor der Verwendung wurde die Peptid-Bibliothek 10 min mit Methanol und anschließend 3 x für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Dann wurde sie mit Blocking-Puffer für 3 h geblockt. Die Inkubation mit den Hefe NAC-Varianten (220 µg/ml in Blocking-Puffer) erfolgte bei 4°C über Nacht. Ungebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-Puffer entfernt. Zum Nach-

weis von EGD1 wurde die Peptid-Bibliothek für 3 h mit einem Antiserum gegen EGD1 (1:1.000 in Blocking-Puffer) bei RT inkubiert. Nach Waschen der Peptid-Bibliothek mit TBS-Puffer (3 x 10 min) erfolgte die Detektion mittels eines Goat anti-Rabbit-HRP Antikörper.

TBS-Puffer (*Tris-buffered Saline*)

50 mM	Tris-HCl
137 mM	NaCl
27 mM	KCl
pH-Wert	8,0

Blocking-Puffer

10 %	Blocking Buffer (Sigma)
5 %	Saccharose
in	TBS-Puffer