

### 3 Ergebnisse

Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) wurde als erster cytosolischer Faktor identifiziert, der in eukaryontischen Zellen mit dem Ribosom und der naszierenden Polypeptidkette interagiert. NACs Funktion am Ribosom ist jedoch nur wenig verstanden. Man nimmt an, dass NAC durch die Bindung der naszierenden Polypeptidkette, diese vor unspezifischen Interaktionen und einem frühzeitigen proteolytischem Abbau schützt. Außerdem zeigten *in vitro* Studien, dass NAC die Bindung von Ribosomen und RNCs an das Translokons verhindert, unabhängig davon ob die Polypeptidkette eine Signalsequenz trägt oder nicht. Damit hat NAC wohl auch eine Funktion im Zusammenhang mit der Proteintranslokation, bei der NAC neben SRP und dem SRP-Rezeptor, als weiterer cytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung von Proteinen zum endoplasmatischen Retikulum erforderlich ist. Die genaue Lokalisation von NAC am Ribosom ist jedoch noch nicht bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Bindungsmechanismus und Kontakte zu ribosomalen Proteinen, im Hinblick auf die Funktion von NAC am Ribosom, näher charakterisiert werden.

#### 3.1 Homologe Expression von NAC in *Saccharomyces cerevisiae*

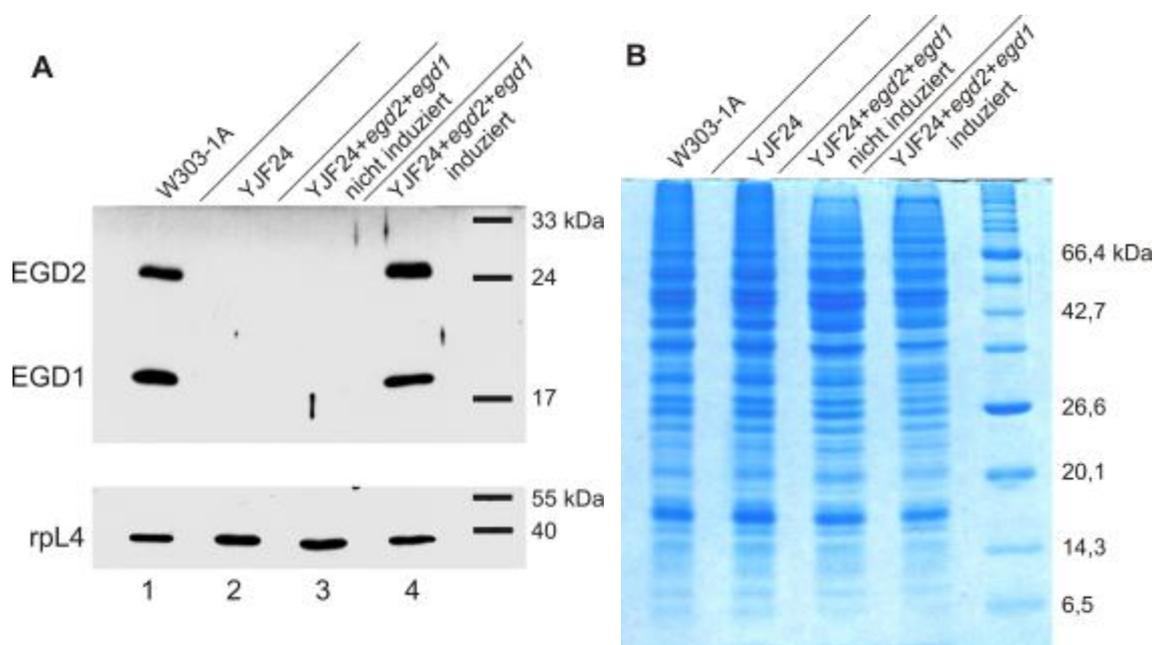
##### 3.1.1 Klonierung und Expression von *egd2* und *egd1*

In höheren Eukaryonten führen Mutationen in den Genen, die für die NAC-Untereinheiten kodieren, oder Deletionen zu einem embryonal letalen Phänotyp. Im Gegensatz dazu zeigen Deletionen der NAC Gene in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur einen schwachen Phänotyp (Franke *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 1999). Aus diesem Grund und wegen der relativ problemlosen Kultivierung der Hefe, die eine Voraussetzung für die Isolation größerer Mengen an Ribosomen ist, wählten wir *S. cerevisiae* als exemplarisches eukaryontisches System für die Charakterisierung der NAC-Bindungsstelle am Ribosom. Die relativ unkomplizierte molekularbiologische Manipulierbarkeit der Hefe ermöglicht es darüber hinaus mutierte Gene für die NAC-Untereinheiten in der Hefe zu exprimieren, um den Einfluss von einzelnen Sequenzbereichen bei der Assoziation mit Ribosomen zu studieren.

In dem verwendeten Hefe Stamm YJF24 sind alle drei für NAC kodierenden Gene (*egd2*, *egd1* und *btt1*) deletiert. Auf das  $\beta_3$ -NAC BTT1 wird aufgrund der vergleichsweise sehr geringen zellulären Konzentration (Reimann *et al.*, 1999) in den folgenden Arbeiten nicht eingegangen.

Zunächst einmal musste überprüft werden, ob Plasmid-kodiertes EGD2 ( $\alpha$ -NAC) bzw. EGD1 ( $\beta$ -NAC) in vergleichbarer Menge produziert wird, wie im Hefe Wildtyp Stamm (W303-1A) beobachtet. Die Gene *egd2* und *egd1* wurden, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, separat in Expressionsvektoren unter Kontrolle eines durch Galactose induzierbaren Promotors kloniert und in YJF24 exprimiert.

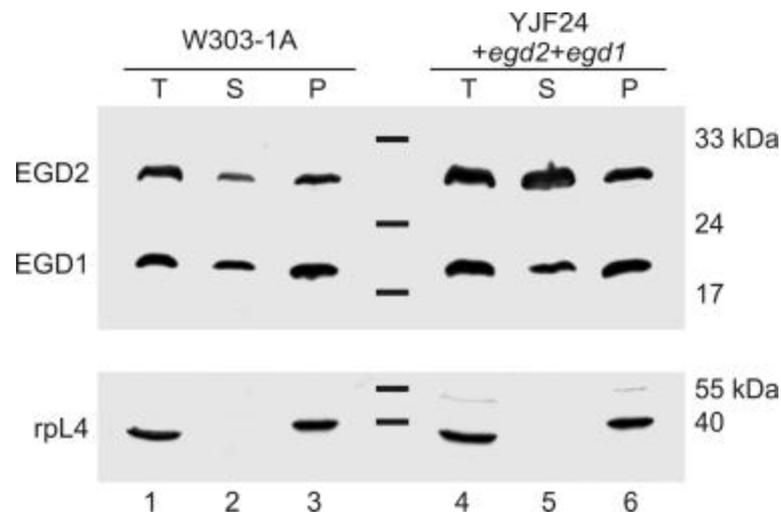
Abbildung 11 zeigt, dass das Expressionslevel von EGD2 und EGD1 im mit 2 % Galactose induzierten Stamm YJF24+*egd2*+*egd1* vergleichbar ist mit der intrazellulären NAC-Konzentration im entsprechenden Wildtyp Stamm (W303-1A) (Spuren 1 und 4).



**Abbildung 11** Vergleich des Expressionslevels von EGD2 ( $\alpha$ -NAC) und EGD1 ( $\beta$ -NAC) zwischen dem Wildtyp Stamm W303-1A und der in YJF24 exprimierten Gene. **A** Vergleich der zellulären NAC-Konzentration vom Wildtyp, der Deletionsmutante YJF24 und der nicht induzierten bzw. mit 2 % Galactose induzierten Plasmid-kodierten Gene in YJF24. Der obere Teil des Western-Blots wurde mit Antiseren gegen EGD2 und EGD1 analysiert. Der untere Teil desselben Blots wurde zur Kontrolle der aufgetragenen äquivalenten Proteinmengen mit einem Antikörper gegen das ribosomale Protein rpL4 überprüft. **B** Coomassie gefärbtes Gel desselben Probenauftrags zur Kontrolle der äquivalenten Proteinmengen.

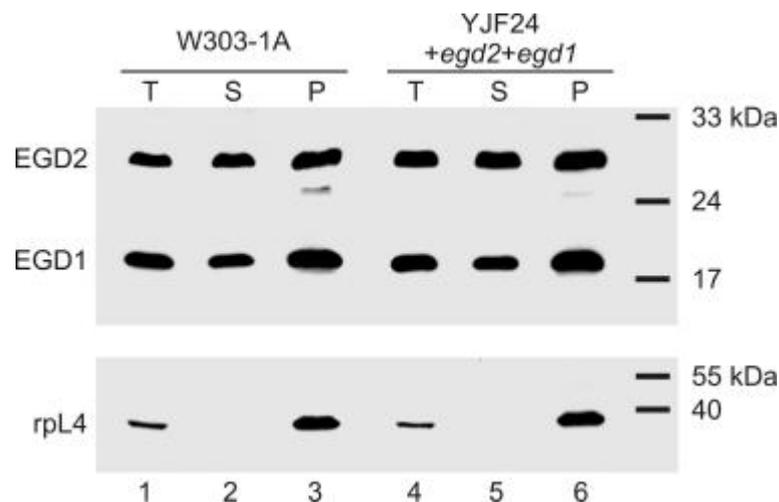
### 3.1.2 Vergleich der Assoziation mit Ribosomen

Zur funktionellen Überprüfung, ob das in YJF24 vom Plasmid aus exprimierte NAC ebenso wie NAC in einem Wildtyp-Stamm als heterodimerer Komplex mit Ribosomen assoziiert ist, wurden Anzuchten von W303-1A und YJF24+*egd2*+*egd1* in komplementiertem Minimalmedium mit Galactose durchgeführt, und ein Totalextrakt (S100) hergestellt, der frei ist von Zellkernen, Membranen und Mitochondrien (2.3.11). Der Totalextrakt (T) wurde durch Sedimentation der Ribosomen in einen cytosolischen Überstand (S) und das Ribosomen-Pellet (P) fraktioniert. Äquivalente Proben der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert (Abbildung 12). Im Falle des Wildtyp W303-1A sedimentiert, wie schon früher beschrieben, der Großteil des zellulären NAC zusammen mit Ribosomen (Spuren 1 bis 3) (Reimann *et al.*, 1999). Für das in YJF24 exprimierte NAC zeigt sich, dass vergleichbar viel NAC wie beim Wildtyp Ribosomen-assoziiert ist (Spuren 3 und 6). Die etwas größere Menge an EGD2 im cytosolischen Überstand (S) im Gegensatz zum Wildtyp (Spuren 2 und 5) ist auf die vergleichsweise stärkere Expression in diesem Experiment zurückzuführen.



**Abbildung 12** Vergleich der Assoziation von NAC mit Ribosomen zwischen dem Wildtyp W303-1A und YJF24+*egd2*+*egd1*. Beim Wildtyp sedimentiert der Großteil des zellulären NAC zusammen mit den Ribosomen (Spuren 1–3). Für YJF24+*egd2*+*egd1* zeigt sich, dass vergleichbar viel NAC Ribosomen-assoziiert ist (Spuren 3 + 6). Die etwas größere Menge an EGD2 im cytosolischen Überstand (S) ist auf die vergleichsweise stärkere Expression zurückzuführen (Spuren 1 + 2 bzw. 4 + 5). Bei der SDS-PAGE wurden äquivalente Probenmengen vom Totalextrakt (T) und dem cytosolischen Überstand (S) bzw. des Ribosomen-Pellets (P) aufgetragen. Der obere Teil des Western-Blots wurde mit Antikörpern gegen EGD2 und EGD1 analysiert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Ribosomen-Sedimentation und der vergleichbaren Probenmengen wurde derselbe Blot mit einem Antikörper gegen rpL4 überprüft.

Um in den folgenden Experimenten zu gewährleisten, dass sich in den Ribosomen-Fractionen keine methodisch bedingten Verunreinigungen wie Reste von Membranen oder aggregiertes Protein befinden, welche die Quantifizierung und Vergleichbarkeit der einzelnen Ansätze beeinträchtigen könnten, wurden die Ribosomen in den folgenden Studien durch ein Saccharosekissen mit physiologischer Salzkonzentration sedimentiert (2.3.12). Da NAC nicht permanent mit dem Ribosom assoziiert ist, sondern ein stetiger Zyklus von Assoziation und Dissoziation besteht (Lauring *et al.*, 1995c), ergibt sich aus der langsameren Sedimentation der Ribosomen durch das Saccharosekissen, dass sich deutlich mehr NAC, im Vergleich zu dem vorherigen Test, in der Überstandsfraktion befindet. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurde daher für den Totalextrakt (T) und den Überstand (S) nur 1/10 des äquivalenten Volumens der Ribosomenfraktion (P) bei der SDS-PAGE aufgetragen. Der Western-Blot in Abbildung 13 zeigt, dass bei der Sedimentation der Ribosomen durch das Saccharosekissen im Vergleich zwischen dem Wildtyp W303-1A und YJF24+*egd2+egd1* identische Mengen NAC zusammen mit den Ribosomen sedimentieren (Spuren 3 und 6).



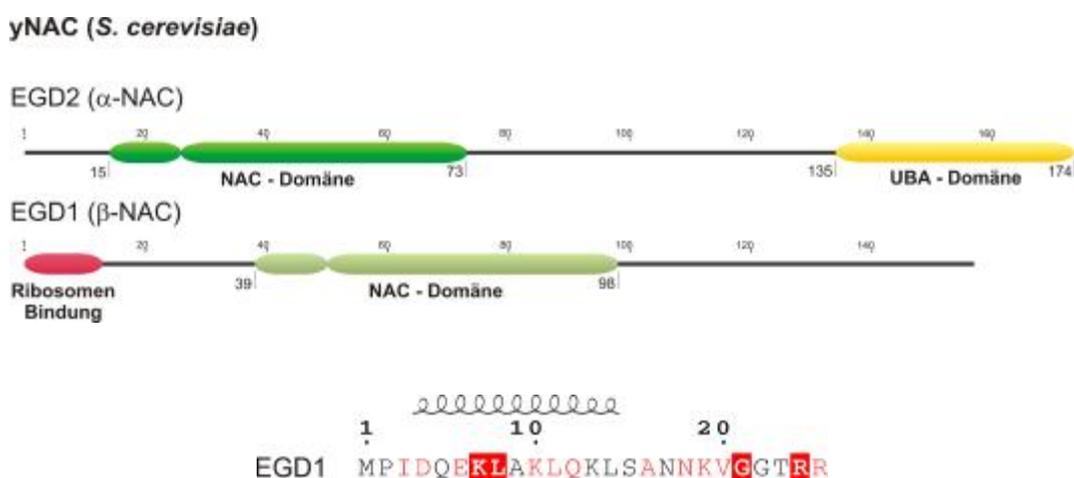
**Abbildung 13** Assoziation von NAC mit Ribosomen nach Fraktionierung der Ribosomen durch ein Saccharosekissen im Vergleich von Wildtyp W303-1A und YJF24+*egd2+egd1*. Das Ergebnis zeigt, dass beim Wildtyp und beim in YJF24 exprimiertem NAC identische Mengen zusammen mit den Ribosomen sedimentieren (Spuren 3 + 6). Von den sedimentierten Ribosomen (P) wurden bei der SDS-PAGE 0,5 AU<sub>260</sub> aufgetragen und 1/10 des äquivalenten Volumens vom Totalextrakt (T) bzw. vom Überstand (S). Die obere Hälfte des Western-Blots wurde mit Antiseren gegen EGD2 und EGD1 analysiert. Zur Kontrolle der vergleichbaren Probenmengen wurde derselbe Blot mit einem Antikörper gegen rpL4 überprüft.

Die Vollständigkeit der Ribosomen-Sedimentation wurde in einer separaten SDS-PAGE überprüft, bei der vom Überstand (S) ein äquivalentes Volumen des Ribosomen-Pellets aufgetragen und der Western-Blot mit einem Antikörper gegen rpl4 analysiert wurde (Abbildung nicht gezeigt).

Aufgrund der vergleichbaren Assoziation von NAC mit Ribosomen im Wildtyp Stamm W303-1A und des in YJF24 exprimierten NAC wurde in den weiteren Studien, anstatt W303-1A, der Stamm YJF24+*egd2+egd1* als Kontrolle verwendet.

### 3.2 Funktion der N-terminalen Sequenz von $\beta$ -NAC bei der Assoziation mit Ribosomen

Franke *et al.* zeigten bereits 2001, dass durch die Deletion der ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus von EGD1 ( $\beta$ -NAC) die Assoziation mit Ribosomen stark verringert bzw. verhindert wird (Franke *et al.*, 2001). Daher wurde zunächst überprüft, ob wir mit unserem System diese Ergebnisse reproduzieren können. Hierfür wurde eine EGD1 Variante kloniert, bei der die ersten 11 Aminosäuren deletiert sind, und zusammen mit Plasmid-kodiertem EGD2 ( $\alpha$ -NAC) in YJF24 exprimiert. Die Analyse der pelletierten Ribosomen zeigte tatsächlich, dass auch in unserem System diese NAC Deletionsmutante nicht mehr mit Ribosomen zusammen sedimentiert (siehe Abbildung 15A, Spur 9).



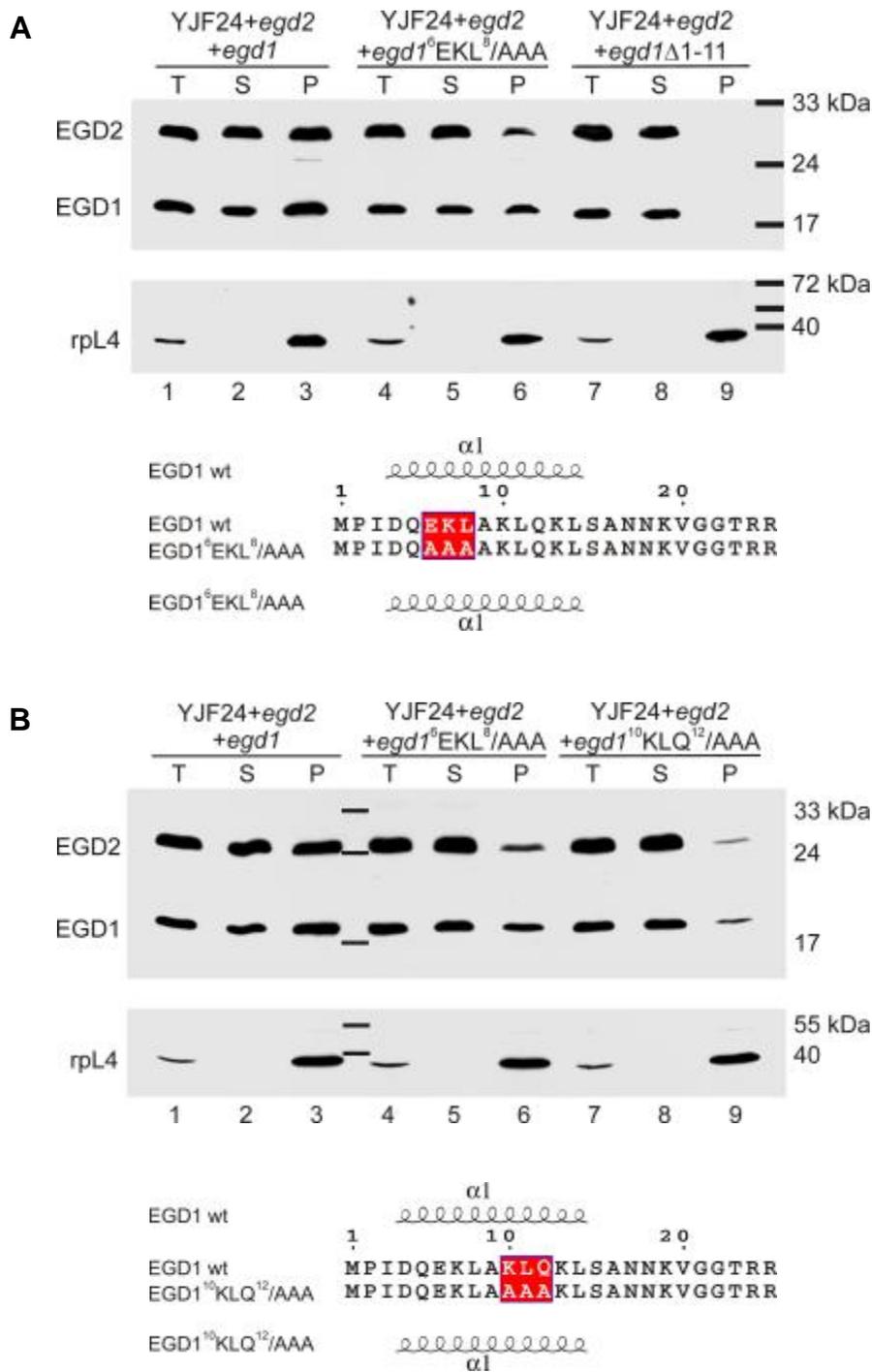
**Abbildung 14** Schematische Darstellung der konservierten Domänenstruktur von NAC aus *Saccharomyces cerevisiae*. Darunter ist die N-terminale Sequenz von EGD1 illustriert. Die in allen Organismen konservierten Aminosäuren sind mit rotem Hintergrund, konservierte Aminosäureaustausche in Rot auf Weiß dargestellt (siehe auch Abbildung 6B). Darüber ist die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur der Aminosäuresequenz illustriert.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, wurde nach konservierten Eigenschaften in dieser N-terminalen Aminosäuresequenz gesucht. Interessanterweise wird für diesen Bereich aller  $\beta$ -NAC Homologe eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur vorhergesagt. Darüber hinaus findet sich hier ein hoch konserviertes Sequenzmotiv:  ${}^6\text{EKLXKLQ}^{12}$ . Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 14 die konservierte Domänenstruktur von Hefe NAC und die N-terminale Sequenz von EGD1 dargestellt.

Um die Annahme zu überprüfen, dass dieses Sequenzmotiv für die Assoziation mit Ribosomen entscheidend ist, wurden gezielte Aminosäureaustausche vorgenommen. Wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, wurden bei einer Mutante die Aminosäuren  ${}^6\text{EKL}^8$  gegen Alanine ausgetauscht ( $\text{egd1}^6\text{EKL}^8/\text{AAA}$ ). Bei einer zweiten Mutante wurden die Aminosäuren  ${}^{10}\text{KLQ}^{12}$  gegen Alanine ausgetauscht ( $\text{egd1}^{10}\text{KLQ}^{12}/\text{AAA}$ ). Dabei wurde darauf geachtet, dass durch die ausgewählten Mutationen keine Veränderung der Sekundärstruktur hervorgerufen wird. Eine Überprüfung der veränderten Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms PHD (Rost and Sander, 1993) ergab für die Vorhersage, dass der Bereich, in dem die Mutationen eingeführt wurden, weiterhin eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur ausbildet (siehe Abbildung 15A und B).

Die  $\beta$ -NAC Mutanten ( $\text{egd1}^6\text{EKL}^8/\text{AAA}$ ,  $\text{egd1}^{10}\text{KLQ}^{12}/\text{AAA}$  und  $\text{egd}\Delta 1-11$ ) wurden zusammen mit Plasmid-kodiertem  $\text{egd2}$  ( $\alpha$ -NAC) jeweils in YJF24 exprimiert. Dabei zeigten die neuen Konstrukte ein vergleichbares Expressionslevel wie das Wildtyp  $\text{egd1}$  (Abb. 15A und B; Spuren 1, 4 und 7). Aus parallelen Anzuchten von YJF24+ $\text{egd2}$  in Kombination mit  $\text{egd1}$ ,  $\text{egd1}^6\text{EKL}^8/\text{AAA}$ ,  $\text{egd1}^{10}\text{KLQ}^{12}/\text{AAA}$  und  $\text{egd1}\Delta 1-11$  wurden S100 Totalextrakte hergestellt (2.3.11), aus denen die Ribosomen durch ein Saccharosekissen sedimentiert wurden (2.3.12). Die Analyse der Ribosomen Fraktionen und 1/10 des äquivalenten Volumens vom Totalextrakt und des Überstandes erfolgte nach SDS-PAGE mittels Western-Blot (Abbildung 15A und B).

Die Analyse der sedimentierten Ribosomen zeigt für die NAC-Deletionsmutante (EGD1 $\Delta$ 1-11), dass sie nicht mit den Ribosomen zusammen sedimentiert (Abb. 15A; Spur 9). Für die beiden EGD1-Alanin-Mutanten wurde ein differenzierteres Resultat festgestellt. Beim Austausch der Aminosäuren  ${}^6\text{EKL}^8$  in EGD1 zu Alaninen lässt sich NAC zwar noch gut in der Ribosomen-

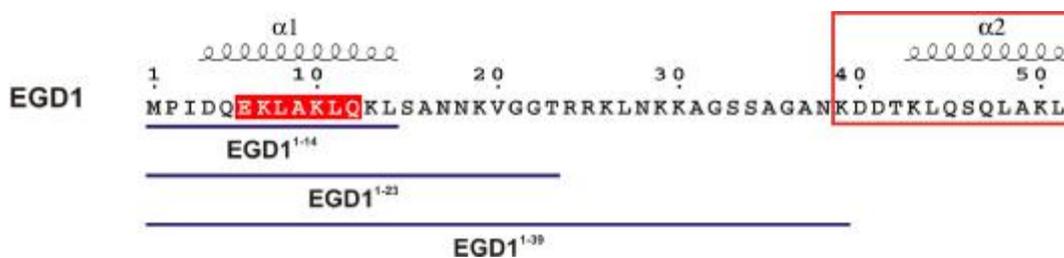


**Abbildung 15** Vergleich der Assoziation der NAC-Mutanten mit Ribosomen. Dargestellt ist in **A** die Gegenüberstellung der sedimentierten Ribosomen aus YJF24+*egd2* in Kombination mit *egd1*<sup>6</sup>EKL<sup>8</sup>/AAA und *egd1*Δ1-11 im Vergleich zu *egd1*, welches den Wildtyp repräsentiert, und in **B** aus YJF24+*egd2* in Kombination mit *egd1*<sup>6</sup>EKL<sup>8</sup>/AAA und *egd1*<sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup>/AAA. Die Analyse zeigt eine deutlich verringerte Assoziation der EGD1-Alanin-Mutanten mit Ribosomen, insbesondere für EGD1<sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup>/AAA (B; Spuren 6 + 9). Die NAC-Deletionsmutante (EGD1Δ1-11) ist hingegen nicht mehr im Ribosomen-Pellet (P) nachzuweisen (A; Spur 9). Von den sedimentierten Ribosomen (P) wurden bei der SDS-PAGE 0,5 AU<sub>260</sub> aufgetragen und 1/10 des äquivalenten Volumens vom Totalextrakt (T) bzw. vom Überstand (S). Die obere Hälfte der Western-Blots wurde jeweils mit Antikörpern gegen EGD2 und EGD1 analysiert. Der untere Teil desselben Blots wurde zur Kontrolle der vergleichbaren Probenmengen mit einem Antikörper gegen rpL4 entwickelt. Die illustrierten Sequenzen zeigen die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagten Sekundärstrukturen der EGD1-Alanin-Mutanten im Vergleich zur Wildtypsequenz. Die ausgetauschten Aminosäuren sind in Weiß auf Rot dargestellt. **A** EGD1<sup>6</sup>EKL<sup>8</sup>/AAA **B** EGD1<sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup>/AAA.

Fraktion (P) nachweisen, der Komplex zeigt aber schon eine deutlich geringere Assoziation als wt NAC (Abb. 15A bzw. B; Spuren 3 und 6). Im Vergleich dazu ist die Mutante EGD2+EGD1<sup>8</sup>KLQ<sup>10</sup>/AAA extrem schwächer mit Ribosomen assoziiert, so dass sich der Komplex nur noch in sehr geringen Mengen im Ribosomen-Pellet (P) nachweisen lässt (Abb. 15B; Spur 9). Daraus kann man folgern, dass das konservierte Sequenzmotiv <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> in der N-terminalen  $\alpha$ -Helix der  $\beta$ -NAC Untereinheit eine wichtige Funktion bei der Assoziation mit dem Ribosom hat.

### 3.3 $\beta$ -NACs Assoziation mit Ribosomen ist übertragbar

Für die stabile Assoziation von NAC mit dem Ribosom ist das hoch konservierte Sequenzmotiv <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> am N-Terminus von  $\beta$ -NAC erforderlich. Diese Sequenz liegt in einer für alle  $\beta$ -NAC Homologe vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur. Im folgenden Versuch sollte ermittelt werden, inwiefern die N-terminale Helix allein die Assoziation mit Ribosomen vermitteln kann. Als Reporter-Protein wurde Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* ausgewählt, das als lösliches Protein in keiner Weise mit Ribosomen assoziiert ist. Drei N-terminale Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge von EGD1 ( $\beta$ -NAC) wurden über eine *Linker*-Sequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> mit MBP fusioniert (2.1.6): EGD1<sup>1-14</sup>-MBP, EGD1<sup>1-23</sup>-MBP und EGD1<sup>1-39</sup>-MBP (siehe Abbildung 16 für die Peptidsequenzen).

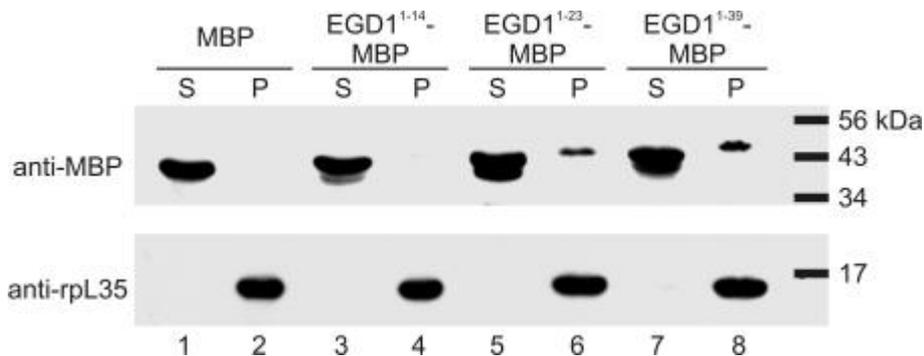


**Abbildung 16** Schematische Illustration der Peptidsequenzen von EGD1 ( $\beta$ -NAC) für die Fusionen mit MBP. Das identifizierte konservierte Sequenzmotiv <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> ist in der Aminosäuresequenz in Weiß auf Rot dargestellt. Der Sequenzbeginn der konservierten NAC-Domäne ist mit einem roten Kasten umrahmt.

Die Expression der Fusionsproteine und von MBP erfolgte in dem Hefe-Stamm YJF24 ( $\Delta$ egd2,  $\Delta$ egd1,  $\Delta$ btt1). Nach Sedimentation der Ribosomen aus einem S100 Totalextrakt bei physiologischer Salzkonzentration wurden äqui-

valente Probenmengen der Überstände (S) und der Ribosomen-Pellets (P) nach SDS-PAGE mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 17).

Wie erwartet findet man des Reporterprotein MBP ausschließlich im Überstand (Spuren 1 und 2). Das Ergebnis zeigt aber, dass EGD1<sup>1-14</sup>-MBP, bei dem nur die N-terminale Helix von EGD1 mit MBP fusioniert ist, noch nicht zusammen mit den Ribosomen sedimentiert (Spuren 3 und 4). Die beiden anderen Fusionsproteine, EGD1<sup>1-23</sup>-MBP und EGD1<sup>1-39</sup>-MBP, sedimentieren hingegen sehr deutlich mit Ribosomen. Dabei zeigt sich, dass die Fusion der längeren Peptidsequenz (EGD1<sup>1-39</sup>) zu einer stärkeren Assoziation mit Ribosomen führt (Spuren 6 und 8). Da die Kontrolle (MBP) ausschließlich im Überstand nachzuweisen ist, wird bestätigt, dass die Bindung an die Ribosomen spezifisch über die fusionierten Peptidsequenzen von EGD1 vermittelt wird. Dies zeigt sich auch dadurch, dass die bei den Fusionsproteinen durch proteolytischen Abbau auftretende zweite Bande nur im Überstand nachzuweisen ist. Offensichtlich betrifft der Abbau nur das fusionierte EGD1-Peptid.



**Abbildung 17** Vergleich der Assoziation der Fusionsproteine EGD1<sup>1-14</sup>-MBP, EGD1<sup>1-23</sup>-MBP und EGD1<sup>1-39</sup>-MBP mit Ribosomen. Die Fusionsvarianten wurden in YJF24 exprimiert und die Ribosomen aus einem S100 Totalextrakt sedimentiert. Die Analyse mit einem Antikörper gegen MBP zeigt, dass die ersten 14 Aminosäuren von EGD1 noch nicht ausreichen, um das Fusionsprotein zusammen mit den Ribosomen zu sedimentieren (Spuren 3 + 4). Die beiden Varianten EGD1<sup>1-23</sup>-MBP und EGD1<sup>1-39</sup>-MBP sind hingegen deutlich im Ribosomen-Pellet nachzuweisen (Spuren 6 + 8). Die MBP Kontrolle ist ausschließlich im Überstand nachzuweisen (Spuren 1 + 2). Die untere Hälfte derselben Membran wurde zur Kontrolle der Vollständigkeit der sedimentierten Ribosomen mit einem Antikörper gegen das ribosomale Protein rpL35 überprüft.

Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass das konservierte Sequenzmotiv <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> am N-Terminus von  $\beta$ -NAC für die stabile Assoziation mit Ribosomen erforderlich ist. Die Bindung eines Reporter-Proteins (MBP) an Ribosomen kann aber nicht alleine durch die N-terminale Helix vermittelt werden. Erst die Fusion etwas längerer Peptidsequenzen von EGD1 ermöglicht die Bindung von

MBP an Ribosomen. Die Tatsache, dass der N-terminale Bereich von EGD1 aber nur zu einer vergleichsweise schwachen Assoziation von MBP mit Ribosomen führt, legt den Schluss nahe, dass für die Assoziation von NAC mit Ribosomen mehrere Kontaktstellen verantwortlich sind.

### **3.4 Heterologe Expression von Hefe NAC in *E. coli***

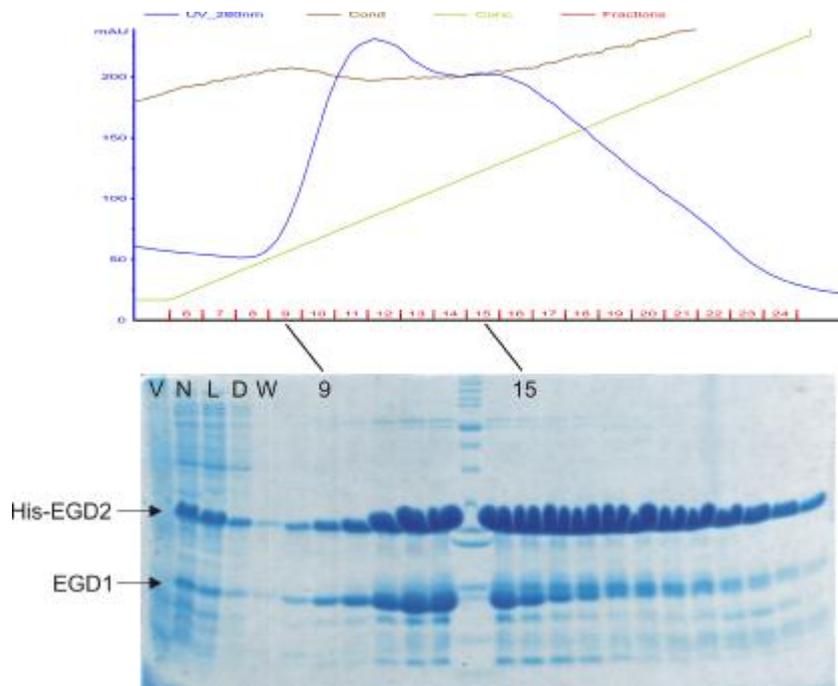
#### **3.4.1 Klonierung und Expression von *egd2* und *egd1***

Für *in vitro* Studien und die Identifizierung der Bindungsstelle am Ribosom wurde das heterodimere wt NAC aus *S. cerevisiae* rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Ausgangspunkt für die Klonierung war ein Konstrukt von B. Beatrix, bei dem *egd2* ( $\alpha$ -NAC) in dem Vektor pET28a (Novagen) kloniert vorlag, so dass es einen N-terminalen His-*tag* gefolgt von einer Thrombin Protease-Schnittstelle trägt. *egd1* ( $\beta$ -NAC) wurde wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben in dieses Plasmid direkt hinter *egd2* kloniert (ohne eine weitere Ribosomen-Bindungsstelle), was zu einem besseren molaren Verhältnis von EGD2 zu EGD1 bei der Expression führte, gegenüber einem früheren Konstrukt von B. Beatrix, bei dem sich noch eine zusätzliche Shine-Dalgarno Sequenz zwischen den beiden Genen befindet. Die Expression erfolgte in dem *E. coli* Stamm ER2566 (NEB).

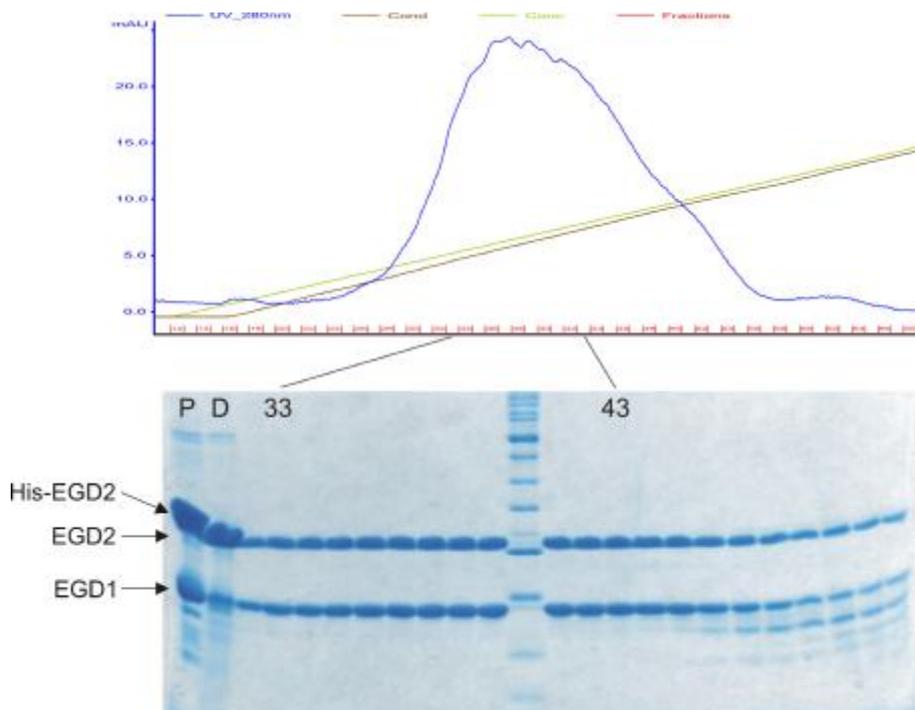
#### **3.4.2 Reinigung des rekombinanten Hefe wt NAC**

Der koexprimierte Komplex wurde im ersten Schritt über eine Ni-Affinitätschromatographie gereinigt und die vereinigten Fraktionen über Nacht bei 4°C mit Thrombin verdaut. Daran schlossen sich für die weitere Reinigung eine Heparin-Affinitätschromatographie und eine Anionen-Austausch Chromatographie an (Für das detaillierte Reinigungsprotokoll siehe Abschnitt 2.3.8). In Abbildung 18 sind exemplarisch die Chromatogramme und dazugehörigen SDS-PAGE für die Reinigung von rekombinatem Hefe wt NAC aus *E. coli* dargestellt.

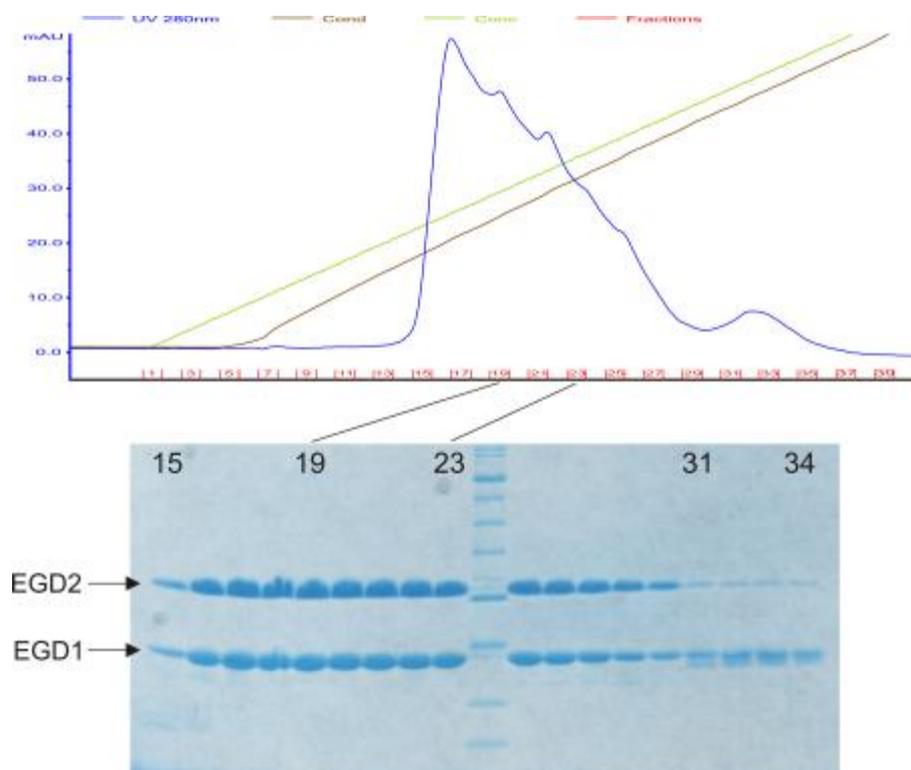
Die Reinigungen der verschiedenen NAC-Varianten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erfolgten nach demselben Protokoll und zeigten keinerlei bemerkenswerte Unterschiede gegenüber dem wt NAC.



**Abbildung 18A** Ni-Affinitätschromatographie: Die Abbildung zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. Deutlich zu erkennen ist, dass EGD1 in Komplex mit His-EGD2 bei der Chromatographie gereinigt wird. Ebenso ist ein Überschuss an EGD2 in Folge der stärkeren Expression gegenüber EGD1 ersichtlich. In den Spuren links der SDS-PAGE sind die Proben vor (V) und nach der Induktion (N) der Expression gezeigt, wie auch vom Probenauflage (L), dem Durchlauf (D) und der letzten Waschfraktion (W) vor der Elution. Die Fraktionen 9 – 15 wurden für den proteolytischen Verdau mit Thrombin vereinigt.



**Abbildung 18B** Heparin-Affinitätschromatographie: Dargestellt ist das Chromatogramm und die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. In der ersten Spur ist eine Probe der vereinigten Fraktionen von der Ni-Affinitätschromatographie vor der Proteolyse (P) und daneben der Durchlauf vom Probenauflage der Heparin-Affinitätschromatographie (D) gezeigt. Nicht mit EGD1 komplexiertes EGD2 befindet sich vollständig im Durchlauf (D), so dass EGD2 und EGD1 in einem 1:1 Verhältnis eluieren. Die Fraktionen 33 – 43 wurden für die weitere Reinigung vereinigt.



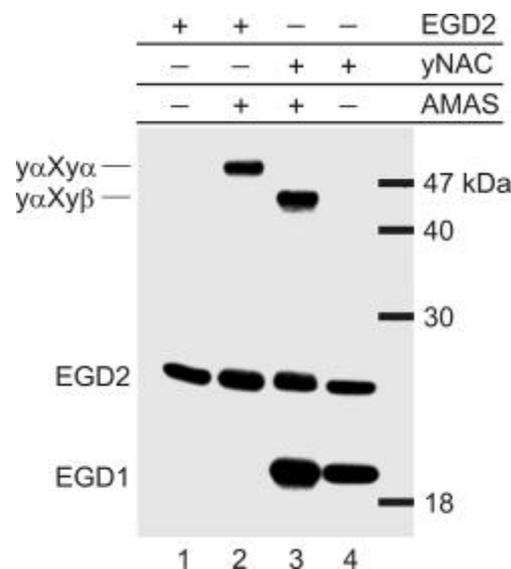
**Abbildung 18C** Anionen-Austausch-Chromatographie: Die Abbildung zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. In diesem letzten Chromatographie-Schritt werden restliche Verunreinigungen gut abgetrennt (31 – 34). Die Fraktionen 19 – 23 wurden vereinigt und für die weiteren Arbeiten verwendet.

Die Heparin-Affinitätschromatographie hat bei der Reinigung die besondere Funktion, dass sich nicht mit EGD1 ( $\beta$ -NAC) komplexiertes EGD2 ( $\alpha$ -NAC) sehr gut abtrennen lässt und vollständig im Proben-Durchlauf vorliegt. Dadurch eluierten EGD2 und EGD1 in einem Verhältnis von 1:1 (siehe Abbildung 18B). Die Bedeutung liegt darin, dass EGD2, welches nicht mit EGD1 komplexiert ist, ein Homodimer bildet, ebenso wie das archaebakterielle aeNAC. In Archaeobakterien gibt es nur ein  $\alpha$ -NAC Homolog (siehe 1.3.4 für die Kristallstruktur des aeNAC). In den folgenden *Cross-linking* Studien zu ribosomalen Proteinen würde dieses unkomplexierte EGD2 zu einem weiteren *Cross-Link* Produkt führen, welches in der Analyse zuzuordnen ist. Am besten lässt sich dies in einem *Cross-linking* Experiment mit dem heterodimeren Hefe wt NAC im Vergleich zu gereinigtem EGD2 veranschaulichen.

In parallelen Ansätzen wurden 40 pmol Hefe wt NAC (yNAC) bzw. EGD2 mit 2 nmol des *Cross-Linkers* AMAS in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz (20mM HEPES-KOH pH 7,5; 150 mM Kalium-Acetat; 20 mM Magnesium-Acetat; Protease-Inhibitor-Cocktail Complete) inkubiert (für detaillierte Informationen zu

AMAS siehe 3.5.1). Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ansätze mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot mit Antisera gegen EGD2 und EGD1 (Abbildung 19).

Die Analyse zeigt deutlich in den Ansätzen mit AMAS jeweils eine zusätzliche Bande (Spuren 2 und 3). Die Molekulargewichts-Verschiebung des jeweiligen *Cross-Link* Produkts entspricht einer Verknüpfung von zwei  $\alpha$ -NAC Untereinheiten ( $\gamma\alpha Xy\alpha$ ) bzw. des heterodimeren NAC ( $\gamma\alpha Xy\beta$ ). Die Verknüpfung von nicht mit EGD1 komplexiertem EGD2 zueinander ist dabei unabhängig von der Proteinkonzentration oder der Konzentration des *Cross-linking* Reagenz in dem Ansatz. Dies zeigt, dass  $\alpha$ -NAC in Abwesenheit von  $\beta$ -NAC als Homodimer vorliegt. Das *Cross-linking* Experiment ist im Zusammenhang mit der Reinigung des heterodimeren Hefe NAC eine gute Kontrolle, ob nicht mit EGD1 komplexiertes EGD2 vollständig abgetrennt wurde.



**Abbildung 19** *Cross-linking* Experiment im Vergleich von gereinigtem, heterodimerem Hefe NAC und EGD2. In den Proben, die mit dem *Cross-linking* Reagenz AMAS inkubiert wurden ist deutlich jeweils eine zusätzliche Bande zu detektieren (Spuren 2 + 3). Das jeweilige Molekulargewicht entspricht einer Verknüpfung von zwei  $\alpha$ -NAC Untereinheiten ( $\gamma\alpha Xy\alpha$ ) bzw. des heterodimeren Komplex ( $\gamma\alpha Xy\beta$ ) zueinander. Dies zeigt, dass nicht mit EGD1 komplexiertes EGD2 als Homodimer vorliegt. Der Western-Blot wurde mit Antisera gegen EGD2 und EGD1 analysiert.

### 3.4.3 Funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Hefe NAC

Zur Charakterisierung der beschriebenen funktionellen Eigenschaften von eukaryontischem NAC (Beatrix *et al.*, 2000), wurden für das rekombinante wt NAC aus Hefe zwei Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurde in Zusam-

menarbeit mit B. Beatrix die Quervernetzung zu der an das Ribosom gebundenen Polypeptidkette analysiert und zum anderen die Assoziation mit Ribosomen *in vitro* mittels Rückbindung an Hochsalz-gereinigte 80S Ribosomen aus Hefe untersucht.

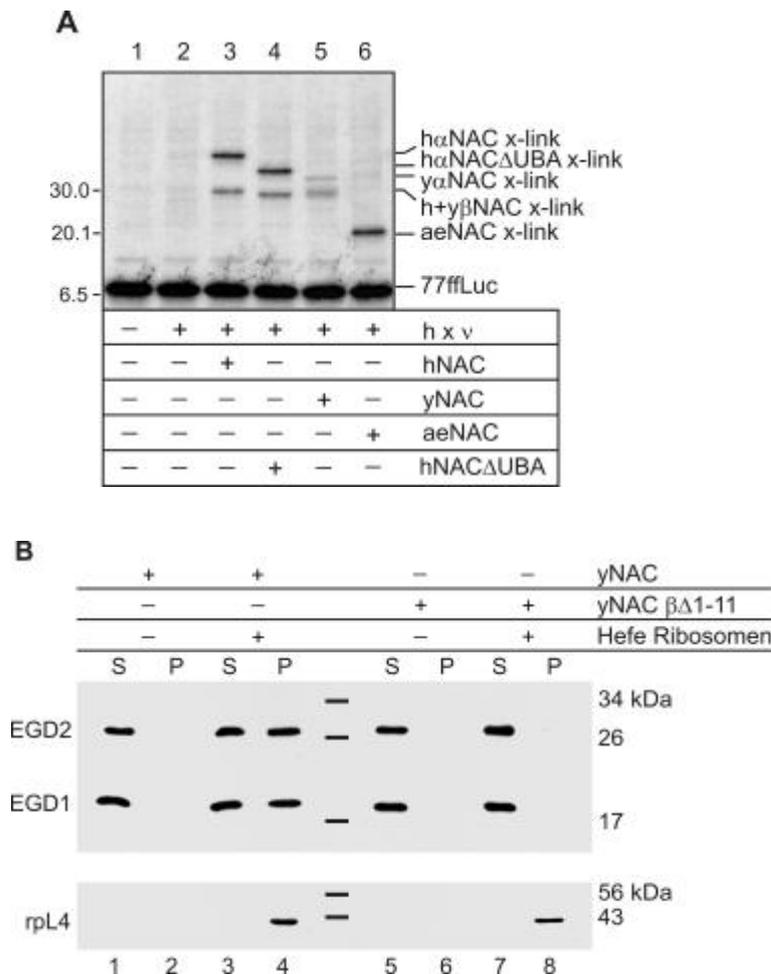
Für den Photo-*Cross-linking* Nachweis wurden Hochsalz-gereinigte RNCs, die die ersten 77 Aminosäuren der *Firefly-Luciferase* (77aaffLuc) tragen, in einem Kaninchen Retikulozyten-Lysat hergestellt (2.3.16). Nach Inkubation der 77aaffLuc RNCs mit NAC wurde das photoaktivierbare Lysinanalogon durch UV-Bestrahlung aktiviert (2.4.1). Die *Cross-Link* Produkte wurden durch die mit radioaktivem Methionin markierte Polypeptidkette nach SDS-PAGE über Autoradiographie analysiert (Abbildung 20A).

In Analogie zu früheren Arbeiten wurden im Ribosomen-Rückbindungstest und den folgenden *Cross-linking* Studien Hochsalz-gereinigte 80S Ribosomen aus dem Hefe Stamm YJF24 ( $\Delta egd2$ ,  $\Delta egd1$ ,  $\Delta btt1$ ) eingesetzt (Beckmann *et al.*, 2001; Pool *et al.*, 2002; Terzi *et al.*, 2004; Beatrix *et al.*, 2000). Durch die Hochsalzreinigung mit 500 mM Kalium-Acetat werden Ribosomen-assoziierte Faktoren entfernt, welche im Rückbindungstest mit NAC um Kontaktstellen konkurrieren könnten. Insbesondere bei den im Anschluss durchgeführten *Cross-linking* Studien muss sichergestellt sein, dass man nur Verknüpfungen zu ribosomalen Proteinen erhält.

Das rekombinante Hefe wt NAC (yNAC) wurde zusammen mit den Hochsalz-gereinigten 80S Ribosomen in einem molaren Verhältnis von 2:1 inkubiert. Die Ribosomen wurden anschließend durch ein Saccharosekissen mit physiologischer Salzkonzentration sedimentiert (2.3.13). Parallel wurde zum Vergleich ein Ansatz mit der NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ), bei der die ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus von EGD1 fehlen, durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte nach SDS-PAGE mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen EGD2 und EGD1 (Abbildung 20B).

Das Ergebnis des Photo-*Cross-linking* Nachweis zeigt, dass beide Untereinheiten vom rekombinanten Hefe NAC (yNAC) mit der naszierenden Polypeptidkette interagieren (Abb. 20A; Spur 5), wenn auch die Intensität der *Cross-Link* Produkte nicht so stark ist wie für das humane NAC (hNAC) oder das archaebakterielle  $\alpha$ -NAC Homolog (aeNAC) (Abb. 20A; Spuren 3 und 6). Eine mögliche Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Verwendung von

Kaninchen Retikulozyten-Lysat bei der Herstellung der 77aaffLuc RNCs (persönliche Mitteilung M. Wiedmann).



**Abbildung 20** **A** Rekombinantes Hefe wt NAC (yNAC) interagiert mit der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom. 77aaffLuc RNCs wurden wie beschrieben mit einem photoaktivierbaren Lysinanalogen in der naszierenden Polypeptidkette hergestellt (2.3.16) und zusammen mit humanem NAC (hNAC), Hefe NAC (yNAC), humanem NAC bei dem die UBA-Domäne vom  $\alpha$ -NAC nach Position Glu<sup>173</sup> deletiert wurde (hNAC $\Delta$ UBA) oder dem archaeobakteriellem  $\alpha$ -NAC Homolog (aeNAC) inkubiert. Die Proben wurden mit UV-Licht aktiviert (hxv) und nach SDS-PAGE auf Radioaktivität getestet. Die detektierten Banden entsprechen den Quervernetzungs-Produkten der jeweiligen NAC-Konstrukte mit der naszierenden Polypeptidkette. **B** Rekombinantes Hefe NAC assoziiert *in vitro* mit Ribosomen. Hefe wt NAC (yNAC) und die NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta$ 1-11) wurden alleine oder zusammen mit Hefe Ribosomen inkubiert und die Ribosomen durch ein Saccharosekissen mit physiologischer Salzkonzentration sedimentiert. yNAC sedimentiert zusammen mit den Ribosomen (Spur 4), im Gegensatz zu yNAC  $\beta\Delta$ 1-11 (Spur 8). Von Überstand (S) und Pellet (P) wurden äquivalente Mengen nach SDS-PAGE mittels Western-Blot mit Antiseren gegen EGD2 und EGD1 analysiert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Ribosomen-Sedimentation wurde derselbe Blot mit einem Antikörper gegen rpL4 analysiert.

Der Ribosomen-Rückbindungstest zeigt, dass rekombinantes, in *E. coli* hergestelltes Hefe wt NAC (yNAC) als Ribosomen-assoziiertes Komplex zusammen mit den Ribosomen sedimentiert. Demgegenüber ist von der NAC-

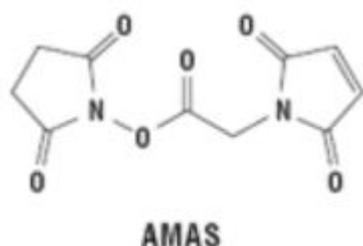
Deletionsmutante ( $\gamma$ NAC  $\beta\Delta 1-11$ ) weder EGD2 noch EGD1 in der Probe vom Ribosomen-Pellet nachweisbar ist (Abb. 20B; Spuren 4 und 8).

Zusammenfassend resultiert aus den funktionellen Untersuchungen, dass das in *E. coli* exprimierte und gereinigte Hefe NAC die beschriebenen charakteristischen Eigenschaften (i) Assoziation mit Ribosomen und (ii) Interaktion mit der naszierenden Polypeptidkette erfüllt, und somit für die folgenden Studien, der Identifizierung der Bindungsstelle am Ribosom, verwendet werden kann.

### 3.5 Charakterisierung der Bindung von NAC am Ribosom

#### 3.5.1 *Cross-linking* Studien mit rekombinantem Hefe wt NAC

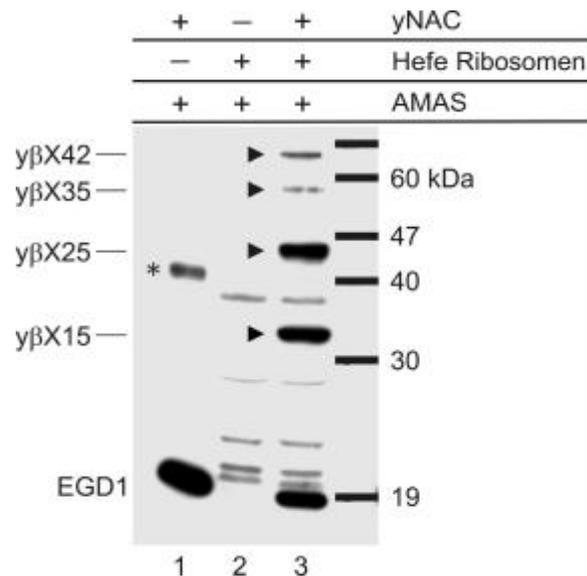
Zur genauen Lokalisation der Bindungsstelle von NAC am Ribosom wurden *Cross-linking* Experimente durchgeführt. In den ersten Studien wurden dabei sieben verschiedene *Cross-Linker* in parallelen Ansätzen getestet, deren Hauptunterschied der Abstand der reaktiven chemischen Gruppen zueinander ist, die aber auch zum Teil verschiedene reaktive Gruppen besitzen (für eine detaillierte Auflistung der verwendeten *Cross-Linker* und ihrer charakteristischen Eigenschaften siehe Abschnitt 2.1.3). Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die besten Ergebnisse mit dem *Cross-linking* Reagenz *N*-( $\alpha$ -Maleimidoacetoxy)succinimide ester (AMAS) erzielt. AMAS reagiert unter den gewählten Reaktionsbedingungen bevorzugt mit  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten. Bemerkenswert an AMAS ist der geringe Abstand zwischen den reaktiven Gruppen, welcher nur 4,4 Å beträgt. Dies impliziert, dass durch AMAS miteinander verknüpfte Proteine sich in einem sehr engen Kontakt zueinander befinden. Im Vergleich dazu beträgt bei *Cross-Linkern*, die häufiger in der Literatur erwähnt werden, wie z.B. DSS (Disuccinimidyl suberate) und BS<sup>3</sup> (*Bis*(sulfosuccinimidyl)suberate), der Abstand der reaktiven Gruppen zwischen 11 Å und 12 Å (Terzi *et al.*, 2004; Pool *et al.*, 2002; Gautschi *et al.*, 2002).



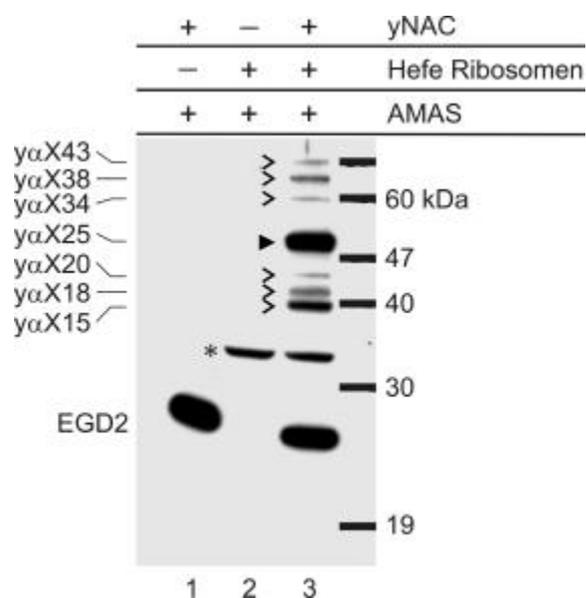
**Abbildung 21** Strukturformel von *N*-( $\alpha$ -Maleimidoacetoxy)succinimide ester (AMAS). Die reaktiven Gruppen reagieren primär mit  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen. Der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen beträgt 4,4 Å.

Für die *Cross-linking* Studien wurde das gereinigte Hefe NAC (yNAC) zusammen mit Hochsalz-gereinigten 80S Ribosomen aus dem Stamm YJF24 ( $\Delta egd2$ ,  $\Delta egd1$ ,  $\Delta btt1$ ) und AMAS inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion, wurden die Ribosomen unter Hochsalzbedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert, um nicht mit den Ribosomen verknüpftes NAC zu entfernen. Parallel wurde eine Kontrolle ohne Ribosomen durchgeführt, bei der die Sedimentation entfiel (2.4.2). Um bei den Studien für einen genaueren Vergleich der Analysen reproduzierbare apparente Molekulargewichte der *Cross-Link* Produkte zu erhalten, wurden die Proben von den Ribosomen-Pellets bzw. der NAC-Kontrolle über kommerziell erhältliche NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) und Western-Blot analysiert. Die Ansätze wurden sowohl mit einem Antikörper gegen EGD1 (Abbildung 22) als auch gegen EGD2 überprüft (Abbildung 23).

Das Ergebnis der Analyse zeigt sowohl für EGD1 ( $\beta$ -NAC) als auch für EGD2 ( $\alpha$ -NAC) multiple *Cross-Link* Produkte unterschiedlicher Intensität. Besonders auffallend sind dabei  $y\beta X15$  und  $y\beta X25$  für EGD1 (Abb. 22; Spur 3) und  $y\alpha X25$  für EGD2 (Abb. 23; Spur 3).



**Abbildung 22** Analyse des *Cross-linking* Ansatzes mit AMAS zwischen Hefe wt NAC (yNAC) und 80S Ribosomen. Der Western-Blot wurde mit einem Antiserum gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. Das Ergebnis zeigt in Spur 3 vier *Cross-Link* Produkte zu ribosomalen Proteinen, die entsprechend der Zunahme des Molekulargewichts von EGD1 in kDa mit  $y\beta X15$ , -25, -35 und -42 bezeichnet sind. Als besonders dominant stechen die *Cross-Link* Produkte  $y\beta X15$  und  $y\beta X25$  hervor. Die Ribosomen-Kontrolle in Spur 2 zeigt einige Kreuzreaktionen des Antikörpers zu ribosomalen Proteinen, die daher bei der Beurteilung der Spur 3 nicht weiter berücksichtigt wurden. In der NAC-Kontrolle (Spur 1) zeigt sich eine Bande (mit \* gekennzeichnet), die von der Größe ein *Cross-Link* zwischen den NAC-Untereinheiten sein kann.



**Abbildung 23** Analyse des *Cross-linking* Ansatzes mit AMAS zwischen Hefe NAC (yNAC) und 80S Ribosomen. Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) analysiert. Das Ergebnis zeigt in Spur 3 sieben *Cross-Link* Produkte unterschiedlicher Intensität zu ribosomalen Proteinen, die entsprechend der Zunahme des Molekulargewichts von EGD2 in kDa mit  $y\alpha$ X15, -18, -20, -25, -34, -38 und -43 bezeichnet sind. Das *Cross-Link* Produkt  $y\alpha$ X25 sticht dabei als besonders dominant hervor. In Spur 2 zeigt sich für den Ribosomen Kontrollansatz eine Kreuzreaktion des Antikörpers zu einem ribosomalen Protein (mit \* gekennzeichnet).

Bemerkenswert ist die teilweise identische Molekulargewichts-Verschiebung von EGD1 bzw. EGD2 (z.B. X15,  $y\beta$ X42/ $y\alpha$ X43) insbesondere für das bei beiden NAC-Untereinheiten dominant auftretende *Cross-Link* Produkt X25. Dieses kann darauf hindeuten, dass es sich um Verknüpfungen zu den gleichen ribosomalen Proteinen handelt.

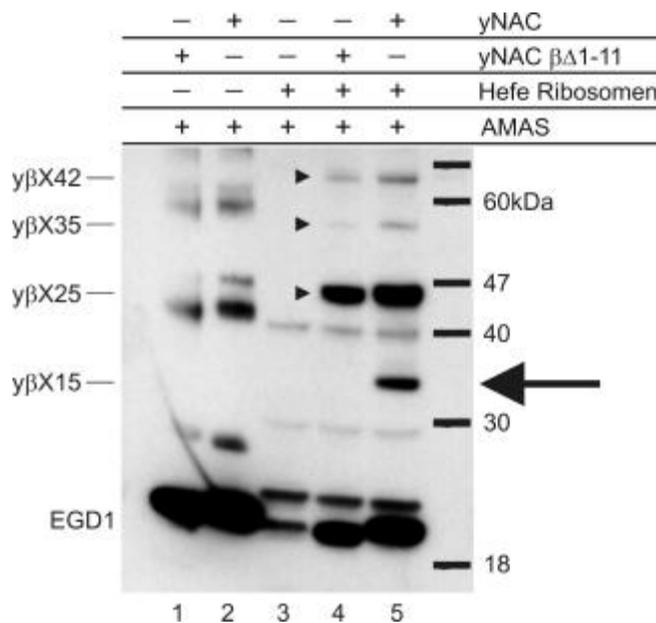
### 3.5.2 *Cross-linking* Studien mit Hefe NAC EGD1D1-11

Die Charakterisierung des N-terminalen Sequenzmotivs  ${}^6\text{EKLXKLQ}^{12}$  von  $\beta$ -NAC, wie auch die Deletion der ersten 11 Aminosäuren haben gezeigt, dass dieser Bereich eine wichtige Funktion bei der Assoziation mit dem Ribosom hat (siehe 3.2). In den dafür durchgeführten Experimenten, auch mit der NAC-Deletionsmutante, war die Assoziation von NAC in Sedimentationsstudien getestet worden. Unklar blieb dabei, ob die Deletion des N-Terminus von EGD1 die Assoziation mit Ribosomen abschwächt oder komplett verhindert. Um zu überprüfen, ob die NAC-Deletionsmutante über weitere Kontaktstellen mit dem

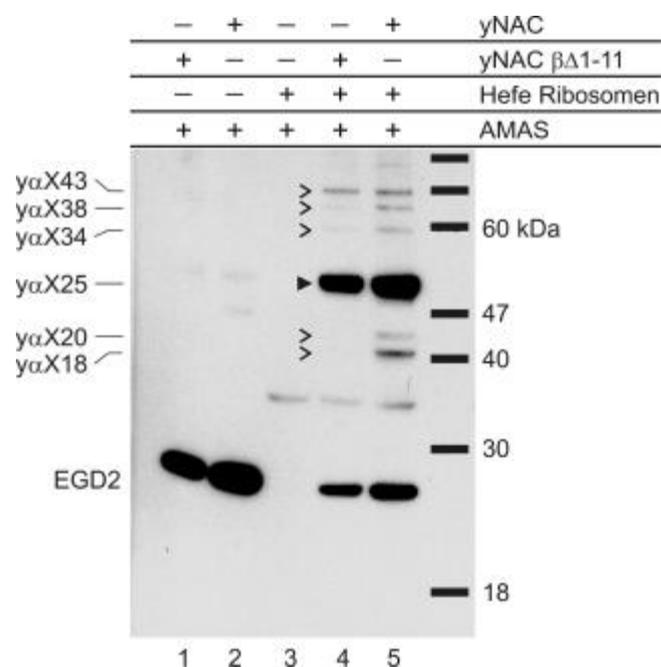
Ribosom assoziiert, wurden *Cross-linking* Experimente vor und nach der Sedimentation der Ribosomen-NAC Komplexe verglichen.

Zunächst wurde überprüft, inwiefern sich das Ergebnis der *Cross-linking* Studien mit Hefe Wildtyp NAC für die NAC-Deletionsmutante verändert oder reproduzieren lässt. In parallelen Ansätzen wurden rekombinantes Hefe wt NAC (yNAC) bzw. die NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) zusammen mit 80S Ribosomen aus YJF24 und AMAS inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ribosomen unter Hochsalzbedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Proben der Ribosomen-Pellets bzw. der Kontrollansätze wurden über NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) und Western-Blot mit Antiseren gegen zum einen EGD1 (Abbildung 24) und zum anderen EGD2 (Abbildung 25) analysiert.

Die Analyse der Ansätze zeigte entgegen den Sedimentations-Studien das überraschende Ergebnis, dass Hefe NAC bei dem am N-Terminus von EGD1 die ersten 11 Aminosäuren deletiert sind *in vitro* ebenso wie wt NAC mit Ribosomen assoziiert und genauso spezifisch zu den ribosomalen Bindungspartnern verknüpft wird (Abb. 24 und 25; Spuren 4 und 5).



**Abbildung 24** Analyse der *Cross-linking* Ansätze mit AMAS vor Sedimentation der Ribosomen zwischen Hefe wt NAC (yNAC) bzw. der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) und 80S Ribosomen. Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. Wie in Abbildung 22 zeigt der Ansatz mit yNAC und Hefe Ribosomen vier *Cross-Link* Produkte die entsprechend der Molekulargewichtszunahme von EGD1 in kDa mit y $\beta$ X15, -25, -35 und -42 bezeichnet sind (Spur 5). Der Ansatz mit yNAC  $\beta\Delta 1-11$  und Ribosomen zeigt überraschender Weise drei der *Cross-Link* Produkte in abgeschwächter Intensität, wohingegen y $\beta$ X15 (Pfeil) überhaupt nicht nachzuweisen ist (Spur 4).

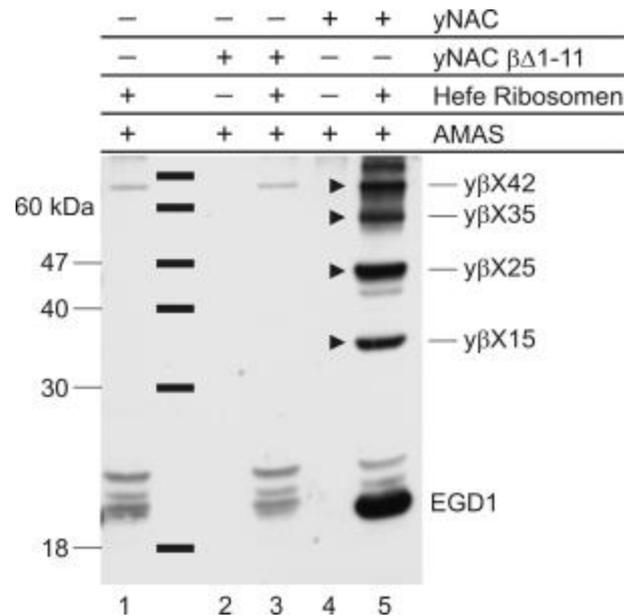


**Abbildung 25** Analyse der *Cross-linking* Ansätze mit AMAS vor Sedimentation der Ribosomen zwischen Hefe wt NAC (yNAC) bzw. der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) und 80S Ribosomen. Der Western-Blot wurde mit einem Antiserum gegen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) analysiert. Wie in Abbildung 23 zeigt der Ansatz mit yNAC und Hefe Ribosomen multiple *Cross-Link* Produkte zu ribosomalen Proteinen (Spur 5), die entsprechend der Zunahme des Molekulargewichts von EGD2 in kDa bezeichnet sind. In Spur 4 wurden für den Ansatz mit yNAC  $\beta\Delta 1-11$  und Ribosomen alle *Cross-Link* Produkte in zum Teil sehr geringer Intensität detektiert. yaX18 und yaX20 sind im Original schwach zu sehen, aber leider nicht in der Abbildung.

Besonders interessant dabei ist, dass das eigentlich dominante *Cross-Link* Produkt  $y\beta X15$  bei der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 überhaupt nicht nachgewiesen werden kann (Abb. 24; Spur 4). Die geringere Intensität der *Cross-Link* Produkte zwischen yNAC  $\beta\Delta 1-11$  und 80S Ribosomen im Vergleich zum wt NAC, könnte ein Indiz für eine insgesamt schwächere Assoziation mit Ribosomen sein.

Im zweiten Ansatz wurden zunächst Hefe NAC (yNAC) und die Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) zusammen mit Hochsalz-gereinigten 80S Ribosomen aus YJF24 ohne das *Cross-linking* Reagenz AMAS inkubiert. Nach Sedimentation der Ribosomen durch ein Saccharosekissen mit physiologischer Salzkonzentration (2.3.13) wurden die wieder resuspendierten Ribosomen mit dem *Cross-Linker* AMAS zusammen inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ribosomen erneut durch ein Saccharosekissen, nun unter Hochsalzbedingungen, sedimentiert (2.4.2). Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurden diesmal alle Ansätze, inklusive der NAC-Kontrollen ohne

Ribosomen, gleich behandelt, einschließlich der beiden Sedimentationen. Die Proben der Ribosomen-Pellets bzw. der „Pellets“ der NAC-Kontrollen wurden über NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) und Western-Blot mit einem Antikörper gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert (Abbildung 26).



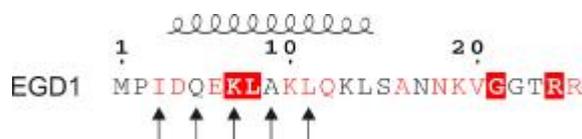
**Abbildung 26** Analyse der *Cross-linking* Reaktion mit AMAS nach Sedimentation der Ribosomen zwischen Hefe wt NAC (yNAC) bzw. der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) und 80S Ribosomen. Der Western-Blot wurde mit einem Antiserum gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. Das Ergebnis zeigt für Hefe NAC (yNAC) mit 80S Ribosomen die erwarteten vier *Cross-Link* Produkte y $\beta$ X15, -X25, -X35 und -X42 (Spur 5). Im Ansatz von NAC bei dem die ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus von EGD1 deletiert sind (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) mit Hefe Ribosomen sind nur die Kreuzreaktionen des Antikörpers zu ribosomalen Proteinen zu sehen (Spuren 1 + 3), es ist aber keines der *Cross-Link* Produkte nachzuweisen. Aufgrund der bei den NAC-Kontrollen ebenfalls durchgeführten Sedimentation, ist bei den hier analysierten „Pellets“ in den jeweiligen Spuren kein EGD1 zu detektieren (Spuren 2 + 4).

Das Ergebnis des *Cross-linking* Experiments nach Sedimentation der Ribosomen-NAC Komplexe zeigt für wt NAC (yNAC) die vier spezifischen *Cross-Link* Produkte (Spur 5). Im Gegensatz dazu ist für die NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) keine dieser Banden nachzuweisen (Spur 3).

Die Analyse der beiden Versuchsanordnungen zeigt, dass die NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) *in vitro* spezifisch und mit wt NAC vergleichbar an Ribosomen bindet und über weitere Kontaktstellen zum Ribosom verknüpft wird. Die Summe dieser Bindungsstellen reicht jedoch nicht für eine Assoziation von NAC mit Ribosomen aus, die stark genug ist, um während der Sedimentation bestehen zu bleiben.

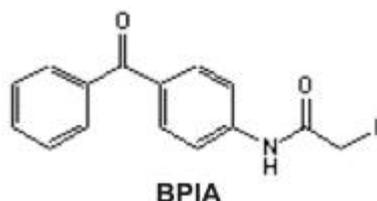
### 3.5.3 Positionsspezifische *Cross-linking* Studien vom N-Terminus von EGD1

Da sich bei den Ansätzen der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 ( $\beta$ -NAC) herausgestellt hatte, dass man das *Cross-Link* Produkt  $\gamma\beta$ X15 nicht mehr erhält, sollte im Gegensatz dazu überprüft werden, welche *Cross-Link* Produkte man von spezifisch festgelegten Positionen am N-Terminus von EGD1 erhält. Für diese Versuchsreihe wurden daher Punktmutationen kloniert (2.1.6 und 2.2.6), bei denen die Aminosäuren Ile<sup>3</sup>, Gln<sup>5</sup>, Lys<sup>7</sup>, Ala<sup>9</sup> und Leu<sup>11</sup> von EGD1 jeweils gegen Cystein ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 27 zur Veranschaulichung der Aminosäureposition).



**Abbildung 27** Darstellung der N-terminalen Sequenz von EGD1 ( $\beta$ -NAC). Zur Veranschaulichung der einzelnen Positionen der Aminosäureaustausche gegen Cystein, sind diese mit einem Pfeil markiert. Die Farbgebung entspricht dem Sequenzvergleich der  $\beta$ -NAC Homologe aus Abbildung 6B. Darüber ist die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur illustriert.

Da es weder in der  $\alpha$ - noch in der  $\beta$ -Untereinheit von NAC weitere Cystein-Reste gibt, kann somit in jedem Konstrukt die eine Position am N-Terminus spezifisch mit einem photoaktivierbaren *Cross-Linker* markiert werden. Verwendet wurde das *Cross-linking* Reagenz Benzophenone-4-iodoacetamide (BPIA), welches über die Iodoacetamid-Gruppe spezifisch mit freien Sulfhydryl-Gruppen eine kovalente Bindung ausbildet. Durch UV-Bestrahlung entsteht an der Carbonyl-Gruppe des Benzophenon ein Diradikal, welches bevorzugt mit C-H Bindungen reagiert (Dorman and Prestwich, 1994). Im Gegensatz zu AMAS beträgt der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen bei BPIA 10 Å.

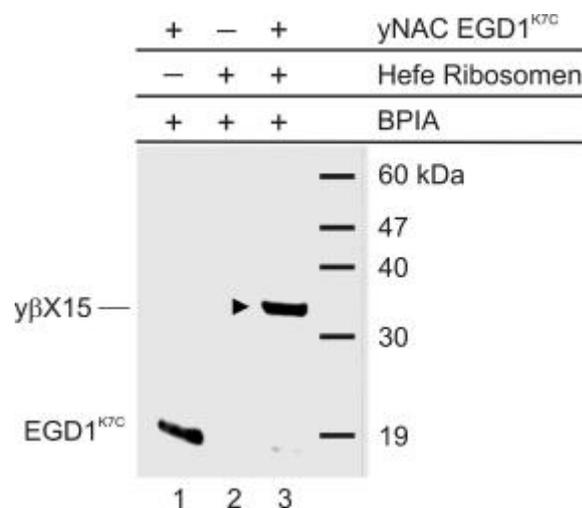


**Abbildung 28** Strukturformel von Benzophenone-4-iodoacetamide (BPIA). Die Iodoacetamid-Gruppe reagiert spezifisch mit freien Sulfhydryl-Gruppen, die Benzophenon-Gruppe (nach UV-Aktivierung) mit C-H Bindungen. Der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen beträgt 10 Å.

Für die *Cross-linking* Ansätze wurden zunächst die NAC Cystein-Mutanten  $\gamma$ NAC EGD1 I3C, - Q5C, - K7C, - A9C und - L11C mit BPIA im Dunkeln inkubiert, um den jeweiligen Cystein-Rest mit dem *Cross-Linker* zu markieren. Nach Abstoppen der Reaktion wurden Hochsalz-gereinigte Hefe Ribosomen zugegeben und nach kurzer Inkubation die Benzophenon-Gruppe durch UV-Bestrahlung aktiviert (2.4.3). Die Ribosomen wurden anschließend unter Hochsalzbedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Proben von den Ribosomen-Pellets und den Kontrollansätzen wurden über NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) und Western-Blot mit einem Antiserum gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. In einer parallel durchgeführten Kontrolle mit dem rekombinanten Hefe wt NAC wurde überprüft, dass der *Cross-Linker* BPIA nicht unspezifisch andere Aminosäure-Reste markiert.

Für die fünf verschiedenen NAC Cystein-Mutanten zeigte sich in der Analyse der *Cross-linking* Ansätze dasselbe Ergebnis. Das beste Resultat wurde dabei für die Mutante  $\gamma$ NAC EGD1<sup>K7C</sup> erzielt (siehe Abbildung 29).

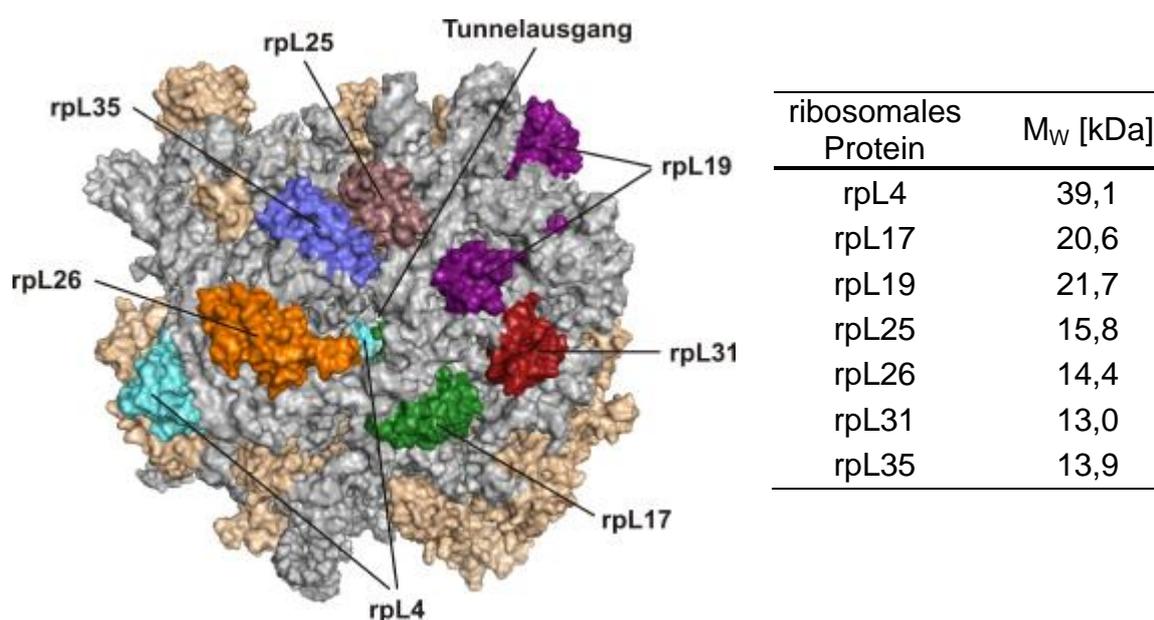
Das Ergebnis der *Cross-linking* Ansätze mit BPIA, bei denen nur noch ein ribosomales Protein mit einem Molekulargewicht von ~15 kDa verknüpft wird, lässt, zusammen mit dem Resultat der Ansätze mit der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 (Abbildung 24), bei dem ein vergleichbares *Cross-Link* Produkt –  $\gamma\beta$ X15 – mit identischer Molekulargewichts-Verschiebung nicht mehr nachweisbar war, den Schluss zu, dass sich der N-Terminus von  $\beta$ -NAC in einem sehr engen Kontakt zu diesem ribosomalen Protein befinden muss.



**Abbildung 29** Analyse des *Cross-linking* Ansatzes von der NAC Cystein-Mutante  $\gamma$ NAC EGD1<sup>K7C</sup> und 80S Ribosomen mit BPIA. Der Western-Blot zeigt in Spur 3 nur noch ein einziges *Cross-Link* Produkt –  $\gamma\beta$ X15, bei dem die Molekulargewichtszunahme von EGD1<sup>K7C</sup> ~15 kDa beträgt. Die Analyse erfolgte mit einem Antikörper gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC).

### 3.6 Identifizierung der ribosomalen Bindungspartner

Der frühe Kontakt von NAC zur naszierenden Polypeptidkette impliziert eine Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zum Tunnelausgang des Ribosoms. Betrachtet man diesen am Hefe-Ribosom, ergeben sich die in Abbildung 30 aufgeführten ribosomalen Proteine als potentielle Bindungspartner.

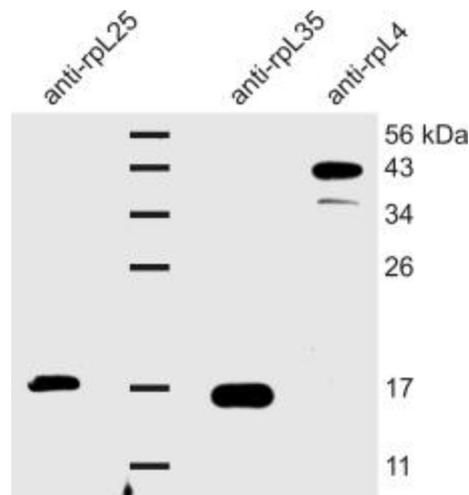


**Abbildung 30** Kryo-EM Struktur der ribosomalen 60S Untereinheit aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Blick auf den ribosomalen Tunnelausgang. Farblich hervorgehoben sind die Proteine, die potentielle Bindungspartner von NAC sind. Das ribosomale Protein rpL 4 befindet sich zwar nicht am Tunnelausgang, ragt aber bis in den Tunnel hinein. In der daneben stehenden Tabelle ist das jeweils kalkulierte Molekulargewicht (M<sub>w</sub>) angegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) unter Verwendung der Struktur 1S11 (PDB ID) angefertigt.

#### 3.6.1 Tests mit Antikörpern gegen ribosomale Proteine

Zur Identifizierung der verknüpften ribosomalen Proteine wurden im Verlauf der Studien die Gene einiger potentieller Kandidaten, ausgehend von der Zunahme des Molekulargewichts von EGD1 ( $\beta$ -NAC) und EGD2 ( $\alpha$ -NAC) bei den *Cross-Link* Produkten, für die Expression in *E. coli* und anschließende Proteinreinigung kloniert (2.1.6 und 2.3.9). Im Einzelnen handelte es sich um die ribosomalen Proteine rpL25, rpL35, rpL19, rpL17 und rpL4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die gereinigten Proteine rpL25, rpL35 und rpL4 wurden zur Immunisierung von Hühnern und Produktion von Antikörpern verwendet (2.1.8) (siehe Abbildung 31 für die Qualität der Antikörper). Das Protein rpL19 wurde

hingegen direkt nach Induktion der Expression intrazellulär proteolytisch abgebaut, wahrscheinlich aufgrund der recht flexiblen Konformation. Die Expression des Gens für rpL17 zeigte in *E. coli* einen toxischen Effekt und führte zur Zellyse. Peptide, die aus der Aminosäuresequenz von rpL26 abgeleitet worden waren, ergaben keine befriedigende Immunreaktion in den Hühnern.



**Abbildung 31** Western-Blot zur Veranschaulichung der Qualität der Antikörper gegen die ribosomalen Proteine rpL25, rpL35 und rpL4. Auffällig für alle drei Proteine ist das größere apparente Molekulargewicht in der SDS-PAGE (vergleiche Abb. 30 – Tabelle). Die jeweils aufgetragene Probenmenge betrug 2 pmol Hefe Ribosomen.

*Cross-linking* Ansätze mit AMAS zwischen Hefe wt NAC und 80S Ribosomen aus YJF24 wurden mit den Antikörpern gegen die ribosomalen Proteine rpL25, rpL35 und rpL4 analysiert. Dabei reagierte keines der mit Antiseren gegen EGD1 oder EGD2 detektierten *Cross-Link* Produkte ebenfalls mit einem der Antikörper gegen die ribosomalen Proteine.

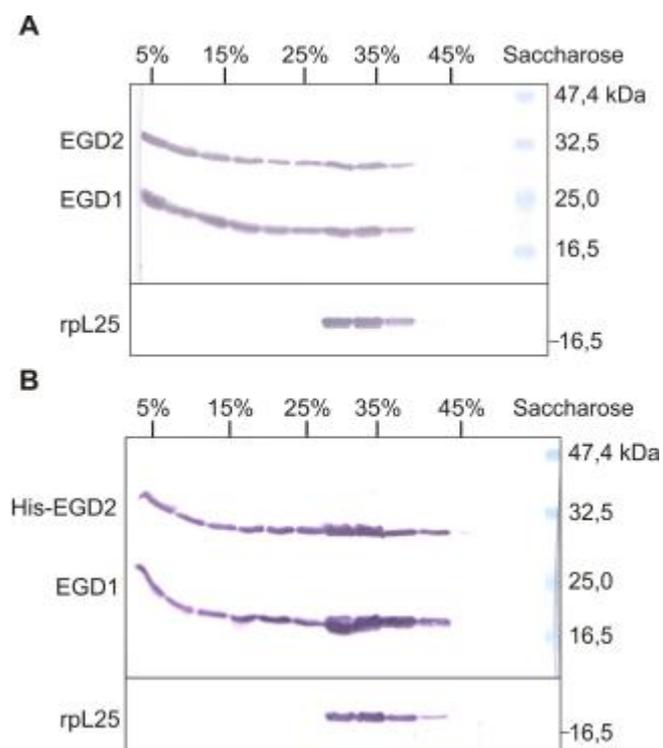
### 3.6.2 Reinigung der *Cross-Link* Produkte

Um die verknüpften ribosomalen Proteine mittels Massenspektrometrie oder N-terminaler Sequenzierung zu identifizieren, wurde nach einer Methode gesucht, die es ermöglicht die *Cross-Link* Produkte aus den Ansätzen zu reinigen und anzukonzentrieren. Die direkte Identifizierung der mit EGD1 bzw. EGD2 verknüpften ribosomalen Proteine aus einem SDS-Gel oder von einer Membran war nicht möglich. Das apparente Molekulargewicht von den erhaltenen *Cross-Link* Produkten in der SDS-PAGE liegt in einem Größenbereich, in dem sich ebenfalls sehr viele ribosomale Proteine befinden. Des

Weiteren ist die Proteinmenge der *Cross-Link* Produkte gegenüber der Proteinmenge der ribosomalen Proteine, die in den Reaktionsansätzen sind, sehr gering.

### Eine unspezifische Interaktion zwischen His-tag und Ribosom

Im Hinblick auf die Reinigung der *Cross-Link* Produkte wurden schon sehr früh zu Beginn der Studien Tests durchgeführt. Nahe liegend war die Reinigung der mit den NAC-Untereinheiten verknüpften ribosomalen Proteine über den His-tag, der schon bei der Ni-Affinitätschromatographie während der Reinigung verwendet wurde. Dafür wurde zunächst überprüft, ob der His-tag die Assoziation von NAC mit dem Ribosom beeinflusst. Die Analyse erfolgte in Rückbindungsstudien mit rekombinantem Hefe wt NAC (mit und ohne His-tag am N-Terminus von EGD2) und 80S Ribosomen aus YJF24. Die Ribosomen wurden dabei durch einen Saccharose-Stufengradienten mit physiologischer Salzkonzentration sedimentiert (2.3.14). Die Ergebnisse zeigten jedoch eine Verstärkung der Assoziation mit den Ribosomen, aufgrund einer möglicherweise unspezifischen Interaktion durch den N-terminalen His-tag (Abbildung 32).



**Abbildung 32** Rückbindung von Hefe wt NAC **A** ohne und **B** mit His-tag an 80S Ribosomen aus YJF24. Aufgetragen wurde bei der SDS-PAGE der fraktionierte Saccharose-Stufengradient. Die Western-Blots wurden mit Antiseren gegen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) und EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. Parallel wurden dieselben Proben mit einem Antikörper gegen das ribosomale Protein rpL25 auf die Ribosomen-Fractionen hin überprüft. Darüber ist jeweils der Beginn der einzelnen Saccharose-Stufen entsprechend der Fraktionen illustriert. Im Vergleich der beiden Ansätze zeigt sich, dass deutlich mehr NAC mit den Ribosomen sedimentiert, wenn sich der His-tag am N-Terminus von EGD2 befindet.

Da NAC sich in einem ständigen Zyklus von Assoziation und Dissoziation mit den Ribosomen befindet (Lauring *et al.*, 1995c), durchzieht NAC bei der

Sedimentation der Ribosomen durch den Stufengradienten die einzelnen Fraktionen bis hin zu den Ribosomen-Fraktionen. Die Menge an NAC nimmt dabei kontinuierlich ab und ist in den Fraktionen mit den Ribosomen wieder erhöht (Abb. 32A). Die Analyse der Ansätze zeigt, dass im Vergleich deutlich mehr NAC in den Ribosomen-Fraktionen nachgewiesen wird, wenn der His-*tag* am N-Terminus von EGD2 nicht durch einen proteolytischen Verdau mit Thrombin entfernt wurde (Abb. 32B). Diese Verstärkung der Assoziation mit Ribosomen könnte die Folge eines unspezifischen Kontakts vom N-terminalen His-*tag* an EGD2 sein.

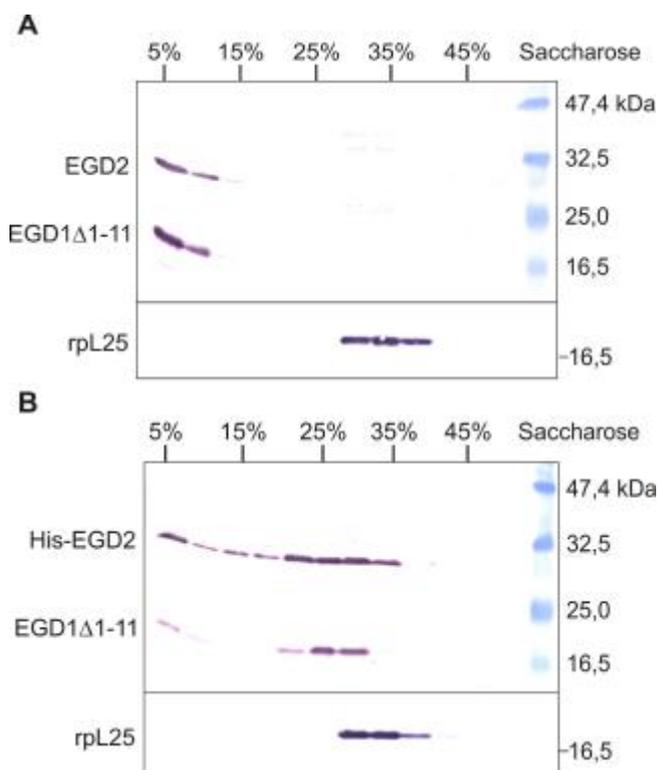
Zur weiteren Überprüfung wurden vergleichende Rückbindungstest mit der N-terminalen Deletionsmutante von EGD1 ( $\beta$ -NAC) ( $\gamma$ NAC EGD1 $\Delta$ 1-11) mit und ohne His-*tag* am N-Terminus von EGD2 ( $\alpha$ -NAC) durchgeführt. Für die NAC-Deletionsmutante war bereits gezeigt worden, dass sie unter physiologischen Salzkonzentrationen nicht mehr zusammen mit den Ribosomen sedimentiert (siehe 3.2 und 3.4.3). Für den Ansatz ohne His-*tag* konnten die NAC-Untereinheiten in der Analyse des fraktionierten Stufengradienten nicht in den Ribosomen-Fraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 33A). Bei dem Ansatz mit N-terminalen His-*tag* an EGD2 zeigte das Ergebnis jedoch, dass die NAC-Deletionsmutante mit den Ribosomen zusammen sedimentiert (Abbildung 33B).

Die Ergebnisse dieser Rückbindungsstudien führten zu dem Schluss, dass der His-*tag* durch eine möglicherweise unspezifische Interaktion die Assoziation von NAC mit dem Ribosom verstärkt.

### **Überprüfung verschiedener Affinitäts-*tags***

In einer umfangreichen Versuchsreihe wurden daher mehrere NAC-Varianten mit unterschiedlichen Affinitäts-*tags* kloniert. Die gereinigten Komplexe wurden in Rückbindungsstudien im Vergleich zu rekombinantem wt NAC auf die spezifische Assoziation mit Ribosomen hin getestet. Für beide Untereinheiten wurden dabei Konstrukte mit C-terminalem Strep-*tag*, c-myc *tag* und Protein C-*tag* kloniert, zusätzlich für EGD2 eine Variante mit N-terminalem Strep-*tag*. Die verschiedenen NAC Varianten zeigten allerdings entweder eine

ähnliche unspezifische Verstärkung der Bindung von NAC an Ribosomen oder eine deutlich geringere Assoziation.



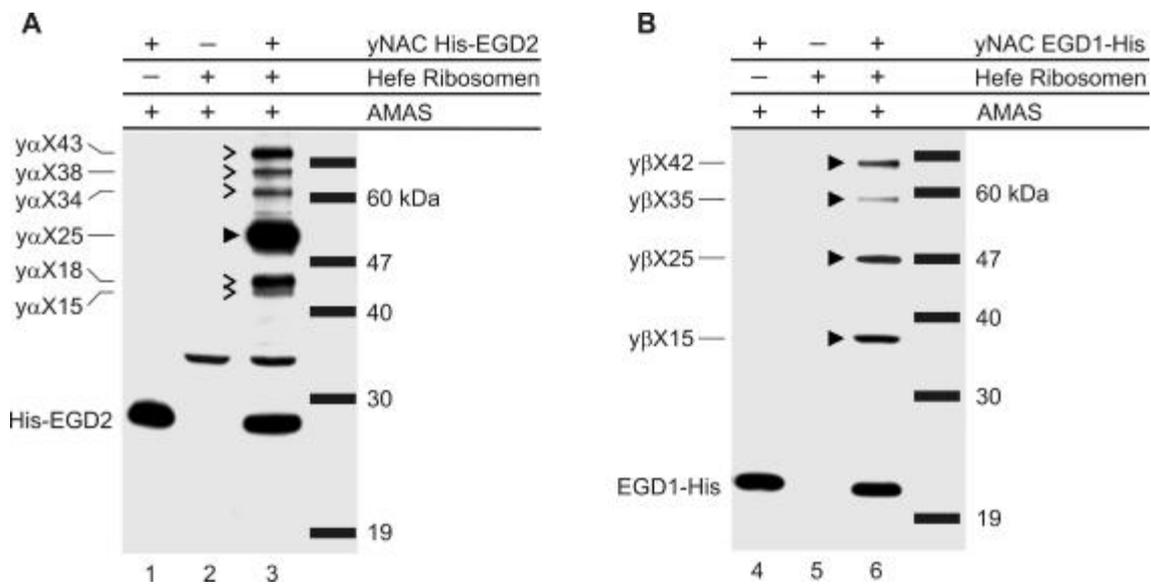
**Abbildung 33** Rückbindung von Hefe NAC EGD1Δ1-11 **A** ohne und **B** mit His-tag an 80S Ribosomen aus YJF24. Aufgetragen wurde bei der SDS-PAGE der fraktionierte Saccharose-Stufengradient. Die Western-Blots wurden mit Antikörpern gegen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) und EGD1 ( $\beta$ -NAC) analysiert. Parallel wurden dieselben Proben mit einem Antikörper gegen das ribosomale Protein rpL25 auf die Ribosomen-Fractionen hin überprüft. Darüber ist jeweils der Beginn der einzelnen Saccharose-Stufen entsprechend der Fractionen illustriert. Der Vergleich der beiden Ansätze zeigt, dass die NAC-Deletionsmutante nicht mehr zusammen mit den Ribosomen sedimentiert (**A**), wohingegen der His-tag am N-Terminus von EGD2 die Assoziation mit Ribosomen durch einen möglicherweise unspezifischen Kontakt verstärkt (**B**).

Ein weiterer Ansatz war die C-terminale Fusion von EGD2 bzw. EGD1 mit der Biotinylierungs-Domäne des *Biotin Carboxyl Carrier Protein* (BCCP) aus *E. coli*. Die Tests dieser beiden Hefe NAC-BCCP Varianten zeigten, in der Analyse von *Cross-linking* Experimenten Banden, mit denselben Molekulargewichts-Verschiebungen wie das Wildtyp Hefe NAC, wenn auch mit geringerer Intensität. Trotz intensiver Optimierung des Reinigungsprotokolls für eine möglichst quantitative Ausbeute konnte aus den präparativen *Cross-linking* Ansätzen leider nicht genügend Material für eine Identifizierung, der mit EGD2 bzw. EGD1 verknüpften ribosomalen Proteine, gereinigt werden.

### Eine artifizielle Verstärkung der Assoziation mit Ribosomen über den His-tag

Die Ergebnisse aus den *Cross-linking* Studien mit der NAC-Deletionsmutante, bei der die ersten 11 Aminosäuren von EGD1 fehlen (yNAC  $\beta$ Δ1-11), zeigten schließlich, dass die Deletionsmutante *in vitro* ebenso spezifisch mit Ribosomen über weitere Kontaktstellen assoziiert (Abbildung 24 und 25). Die

Bindung ist aber nicht mehr stabil genug, um zusammen mit den Ribosomen zu sedimentieren (Abbildung 26). Dies führte zu der Überlegung, dass der His-*tag* wahrscheinlich eher zu einer verstärkten Assoziation über dieselben Bindungsstellen wie bei wt NAC führt. Daher wurden *Cross-linking* Experimente mit AMAS zwischen Hefe NAC mit His-*tag* am N-Terminus von EGD2 (yNAC His-EGD2) und einer neu klonierten Variante mit C-terminalem His-*tag* an EGD1 (yNAC EGD1-His) und 80S Ribosomen aus YJF24 durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ribosomen unter Hochsalzbedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Proben der Ribosomen-Pellets und der NAC-Kontrollen wurden über kommerziell erhältliche NuPAGE Bis-Tris Gele und Western-Blot mit Antikörpern gegen EGD2 (für yNAC His-EGD2) bzw. gegen einen His<sub>6</sub>-*tag* (für yNAC EGD1-His) analysiert (Abbildung 34). Das Antiserum gegen EGD1 konnte in diesem Fall nicht verwendet werden, da es gegen eine C-terminale Peptidsequenz gerichtet ist, die nach Fusion mit dem His-*tag* nicht mehr vom Antikörper erkannt wird.



**Abbildung 34** Analyse der *Cross-linking* Experimente von **A** yNAC His-EGD2 und **B** yNAC EGD1-His mit 80S Ribosomen. **A** Der Western-Blot zeigt in Spur 3 multiple *Cross-Link* Produkte, die entsprechend der Molekulargewichtszunahme von His-EGD2 in kDa bezeichnet sind. Auffallend ist die extrem dominante Bande von yαX25. Im Vergleich mit dem früheren Ansatz ohne His-*tag* (Abbildung 23) lässt sich erkennen, dass die *Cross-Link* Produkte identisch sind und keine weiteren auftreten. **B** Für yNAC EGD1-His zeigt sich in der Analyse im Vergleich zu dem früheren Ansatz ohne His-*tag* (Abbildung 22) ein entsprechendes Ergebnis. Die Verschiebung des Molekulargewichts von EGD1-His ist für die *Cross-Link* Produkte identisch, allerdings ist die Intensität der vorher sehr deutlich auftretenden Bande yβX25 in diesem Ansatz schwächer (Spur 6).

Die Analyse der *Cross-Link* Produkte aus den Ansätzen von NAC mit His-tag an EGD2 bzw. EGD1 ergab, dass die auftretenden Banden in ihrem Molekulargewicht unter Berücksichtigung des His-tag mit denen aus den vorherigen Ansätzen übereinstimmen. Auffallend war bei yNAC His-EGD2 die anscheinend stärkere Intensität der *Cross-Link* Produkte, insbesondere bei  $\gamma\alpha X25$  (Abb. 34A; Spur 3), wohingegen die Effizienz der Verknüpfung zu den ribosomalen Bindungspartnern bei yNAC EGD1-His schlechter zu sein scheint (Abb. 34B; Spur 6). Die Verwendung unterschiedlicher Antikörper bei der Analyse der Experimente ohne bzw. mit His-tag (anti-EGD1 bzw. anti-His<sub>6</sub>-tag) lässt jedoch keinen direkten Vergleich der Resultate aus den beiden Ansätzen zu.

In der Analyse konnten keine zusätzlichen *Cross-Link* Produkte nachgewiesen werden. Der His-tag scheint also in der Tat nur bereits vorhandene Bindungsstellen zwischen NAC und dem Ribosom zu verstärken. Die *Cross-Link* Produkte wurden daher für die Identifizierung der ribosomalen Bindungspartner über den His-tag gereinigt und für die Analyse ankonzentriert.

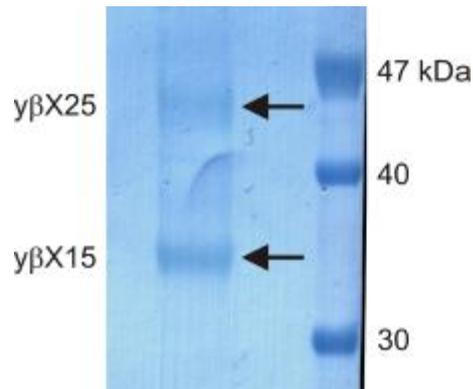
### 3.6.3 Präparative *Cross-linking* Ansätze und Edman-Sequenzierung

Für die Reinigung der *Cross-Link* Produkte wurden in Analogie zu den vorher beschriebenen analytischen Ansätzen für yNAC EGD1-His und yNAC His-EGD2 präparative Ansätze mit insgesamt je ca. 60 nmol 80S Ribosomen aus YJF24 durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.4). Die Proteine der Elutionsfraktionen wurden mittels TCA-Präzipitation vereinigt, über NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) getrennt und für die N-terminale Sequenzierung auf PVDF-Membran gebロットet. Die Membran wurde mit Amido-Schwarz gefärbt (Abbildung 35).

Die Reinigung der *Cross-Link* Produkte aus dem präparativen Ansatz von yNAC EGD1-His ergab für  $\gamma\beta X15$  und  $\gamma\beta X25$  deutliche und für die Sequenzierung gut geeignete Banden. Die N-terminale Sequenzierung der beiden Proben wurde durchgeführt von der WITA GmbH (Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules).

Das *Cross-Link* Produkt  $\gamma\beta X25$  ergab leider keine Sequenzdaten. Das Problem lag hierbei vor allem an der Menge des vorhandenen (sequenzierbaren) Proteins. Bei den Sequenzdaten für  $\gamma\beta X15$ , dem *Cross-Link* Produkt, das bei der NAC-Deletionsmutante yNAC EGD1 $\Delta$ 1-11 verloren geht, wurden

eindeutige Aminosäuren identifiziert. In Tabelle 4 ist das Ergebnis der automatischen Sequenzanalyse dargestellt. Parallel wurden präparative *Cross-linking* Ansätze mit  $\gamma$ NAC His-EGD2 und 80S Ribosomen durchgeführt. Bei der Reinigung konnte aber nur eine schwache Bande für  $\gamma\alpha$ X25 auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden. Die N-terminale Sequenzierung ergab jedoch aufgrund der geringen Proteinmenge leider keine Daten.

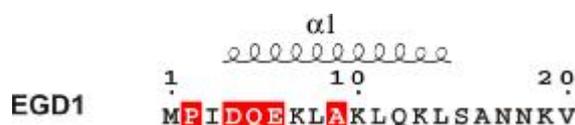


**Abbildung 35** PVDF-Membran des präparativen *Cross-Link* Ansatzes von  $\gamma$ NAC EGD1-His mit Hefe Ribosomen. Aus der Reinigung der *Cross-Link* Produkte ergab sich für  $\gamma\beta$ X15 eine sehr deutliche und für die N-terminale Sequenzierung gut geeignete Bande, wohingegen die Bande für  $\gamma\beta$ X25 nicht so distinkt war, aber dennoch ansequenziert wurde. Die Membran wurde mit Amido-Schwarz gefärbt.

Aus der automatischen Sequenz Analyse ließ sich für EGD1 ( $\beta$ -NAC) gut die Sequenz D Q E (Zyklen 3 – 5) und A (Zyklus 8) herausfiltern, unter Berücksichtigung, dass das N-terminale Methionin entfernt ist (vergleiche Abbildung 36 für die N-terminale Sequenz von EGD1). Die Durchsicht der Chromatogramme der einzelnen Zyklen zeigte außerdem eindeutig die Aminosäure Prolin in Zyklus 1.

**Tabelle 4** Ergebnis der automatischen Edman Sequenz Analyse für das *Cross-Link* Produkt  $\gamma\beta$ X15.

Zyklus	PTH-Aminosäure
1	A / P / S / K
2	-
3	D / L
4	Q / K
5	D / E
6	V
7	-
8	A



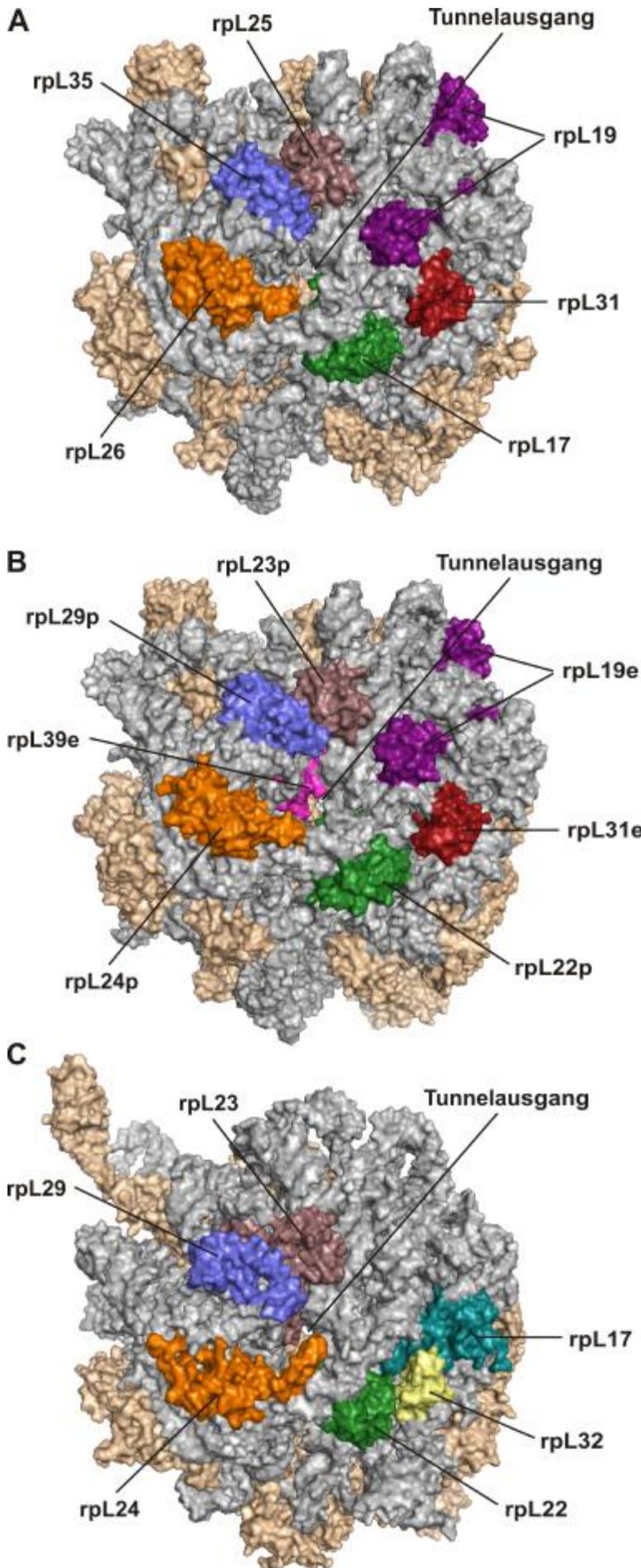
**Abbildung 36** N-terminale Sequenz von EGD1 ( $\beta$ -NAC). Die in der automatischen Sequenz Analyse identifizierten Aminosäuren der Edman-Sequenzierung sind in Weiß auf Rot dargestellt. Darüber ist die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur illustriert.

Die verbliebene Sequenzfolge L K D V (Zyklen 3 – 6) ergab bei einem *Blast search* gegen das komplette Hefe Proteom nur einen Treffer mit dieser Sequenz am N-Terminus, das ribosomale Protein rpL31 (Aminosäuren 3 – 6, ohne N-terminales Methionin). Mit der Information der Sequenzen von EGD1 und rpL31 wurde die automatische Sequenz Analyse von der WITA GmbH manuell überprüft. Die finale Analyse der Edman-Sequenzierung ergab, dass bei beiden Proteinen das N-terminale Methionin offensichtlich entfernt wurde (Tabelle 5). Die Identifizierung der Proteine gilt somit als gesichert!

**Tabelle 5** Finale Analyse der Edman-Sequenzierung. Die Aminosäuren sind entsprechend der Zuordnung zu EGD1 (rot) und rpL31 (blau) dargestellt.

Zyklus	PTH-Aminosäure
1	A / P / S / K
2	G / I
3	D / L
4	Q / K
5	D / E
6	V / K
7	V / L
8	T / A

Das ribosomale Protein rpL31 gehört zu den Proteinen, welche den ribosomalen Tunnelausgang umgeben. Bemerkenswerterweise finden sich rpL31 Homologe aber nur bei Eukaryonten und Archaeobakterien, wo es auch NAC gibt. Eubakterien hingegen, die kein NAC Homolog besitzen, weisen ebenfalls auch kein rpL31 Homolog auf (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37** Gegenüberstellung der großen ribosomalen Untereinheiten von Eukarya, Archaea und Eubacteria mit Blick auf den Tunnelausgang. **A** 60S Untereinheit aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 1S11). **B** 50S Untereinheit aus *Haloarcula marismortui* (PDB ID: 1S72). 50S Untereinheit aus *Escherichia coli* (PDB ID: 2AWB)

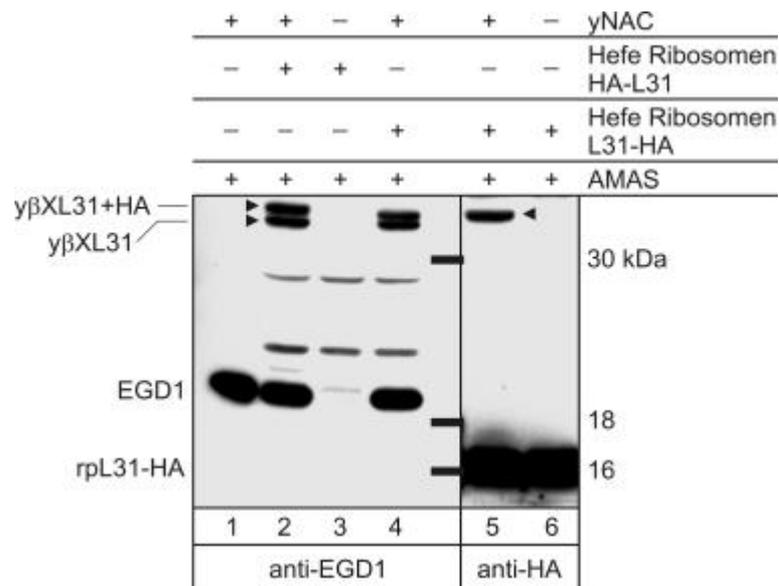
Die ribosomalen Proteine, die den Tunnelausgang umgeben, sind farbig hervorgehoben. Homologe Proteine sind in denselben Farben koloriert. Das ribosomale Protein rpL31, das ein wichtiger Bindungspartner von NAC bei der stabilen Assoziation mit dem Ribosom ist, kommt nur in Eukaryonten (**A**) und Archaeobakterien (**B**) vor. In Eubakterien, die kein NAC besitzen, findet sich ebenfalls kein Homolog von rpL31 (**C**).

Vom ribosomalen Protein rpL39e (**B**) gibt es ebenfalls ein Homolog in Eukaryonten. In der Kryo-EM Struktur der 60S Untereinheit von *S. cerevisiae* ist es aber nicht enthalten.

Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) erstellt.

### 3.7 $\gamma\beta$ X15 ist das *Cross-Link* Produkt zwischen EGD1 und dem ribosomalen Protein rpL31

Um die Interaktion zwischen NAC und rpL31 experimentell zu überprüfen, wurde das Gen für rpL31 einmal mit N- und einmal mit C-terminalem HA-*tag* (Y-P-Y-D-Y-P-D-Y-A) in einen Expressionsvektor für Hefe kloniert. Die beiden Varianten wurden getrennt in YJF24 exprimiert und die Ribosomen unter Hochsalzbedingungen gereinigt (2.3.11). Der Einbau der HA-*tag* Varianten von rpL31 in Ribosomen wurde nach SDS-PAGE mittels Western-Blot mit einem Antikörper gegen den HA-*tag* kontrolliert. Anschließend wurden parallel analytische *Cross-linking* Experimente mit Hefe NAC ( $\gamma$ NAC) und 80S Ribosomen +HA-L31 (N-terminal) bzw. +L31-HA (C-terminal) unter Verwendung des Reagens AMAS durchgeführt. Die Ribosomen wurden, nach Abstoppen der Reaktion, unter Hochsalzbedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert (2.4.2). Proben der Ribosomen-Pellets wie auch der NAC Kontrolle wurden über NuPAGE Bis-Tris Gele (Invitrogen) und Western-Blot mit Antikörpern gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) bzw. gegen den HA-*tag* analysiert (Abbildung 38).



**Abbildung 38** Analyse der *Cross-linking* Ansätze von Hefe NAC ( $\gamma$ NAC) mit 80S Ribosomen + rpL31 mit N- bzw. C-terminalem HA-*tag* (HA-L31 bzw. L31-HA). Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen EGD1 ( $\beta$ -NAC) (linke Hälfte) bzw. gegen den HA-*tag* (rechte Hälfte) entwickelt. Für EGD1 zeigt das Ergebnis im Bereich des *Cross-Link* Produkts  $\gamma\beta$ X15 für beide Ribosomen-Varianten nun zwei Banden (Spuren 2 + 5). Die obere der beiden Banden ( $\gamma\beta$ XL31+HA) reagiert ebenfalls mit einem Antikörper gegen den HA-*tag* (Spur 5). Die Doppelbande kommt dadurch zustande, dass die eingesetzten Ribosomen ein Gemisch mit endogenem rpL31 und der jeweiligen Plasmid-kodierten HA-Varianten sind.

Die Analyse der Ansätze mit einem Antiserum gegen EGD1 zeigt in dem Bereich des *Cross-Link* Produkts  $\gamma\beta X15$  jetzt für beide Ribosomen Varianten eine Doppelbande (Spuren 2 und 4). Die obere der beiden Banden reagiert dabei ebenfalls mit einem Antikörper, der gegen den HA-tag gerichtet ist (Spur 5). Die, bei der Detektion gegen EGD1, auftretende Doppelbande resultiert aus der Tatsache, dass die eingesetzten Ribosomen ein Gemisch aus endogenem rpL31 und der jeweiligen Plasmid-kodierten Variante mit HA-tag enthalten. Dadurch erhält man sowohl das *Cross-Link* Produkt zu rpL31 ( $\gamma\beta XL31$ ) als auch zu rpL31+HA-tag ( $\gamma\beta XL31+HA$ ). Die Molekulargewichts-Verschiebung bei der Doppelbande entspricht dem kalkulierten Molekulargewicht des HA-tags.

Die Analyse des Ergebnisses bestätigt, dass es sich bei dem mit dem N-Terminus von EGD1 ( $\beta$ -NAC) verknüpften ribosomalen Protein wirklich um rpL31 handelt!

### **3.8 rpL31 ist sehr wahrscheinlich ein essentielles ribosomales Protein**

Die stabile Assoziation von NAC mit dem Ribosom hängt entscheidend von der Interaktion der N-terminalen Helix von EGD1 ( $\beta$ -NAC) mit dem ribosomalen Protein rpL31 ab. Die Deletion der ersten 11 Aminosäuren von EGD1 führt dazu, dass NAC zwar noch spezifisch an das Ribosom bindet, die Assoziation aber nicht mehr stark genug ist, um in Sedimentationsstudien zusammen mit den Ribosomen zu sedimentieren.

Daher sollte, im Gegensatz zu der NAC-Deletionsmutante, überprüft werden, welchen Einfluss der Verlust von rpL31 auf die Assoziation von Hefe wt NAC mit Ribosomen hat.

#### **3.8.1 Deletion von rpL31 mittels homologer Rekombination**

In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es für das ribosomale Protein rpL31 zwei Gene *rpL31a* (YDL075w) und *rpL31b* (YLR406c), welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Beide Varianten von rpL31 werden expriert und unterscheiden sich lediglich in einem Aminosäureaustausch (Asp<sup>47</sup>/Glu<sup>47</sup>). Für die Klonierung einer rpL31-Nullmutante sollte in einem kommerziell

erhältlichen Hefe Stamm, bei dem *rp131b* bereits deletiert ist (Y06717, EUROSCARF), mittels homologer Rekombination, unter Verwendung eines HIS3-Markers, das Gen *rp131a* deletiert werden (2.2.10). Ungefähr 100 Klone, von den erhaltenen Kolonien, wurden nach Präparation der chromosomalen DNA mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden auf die Deletion hin überprüft. In allen Fällen konnte das Gen *rp131a* jedoch nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die rpL31-Nullmutante nicht lebensfähig ist. Aufgrund der durchgeführten Selektion war ein Überleben der resultierenden Klone somit nur durch die Rekombination des HIS3-Markers an anderen Positionen im Genom möglich.

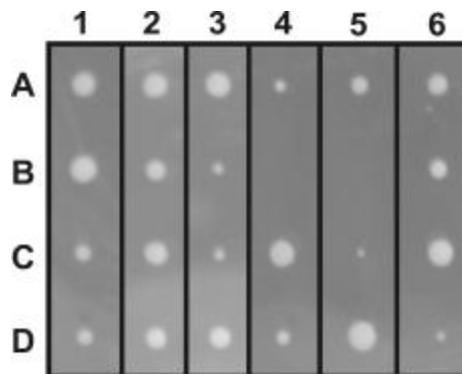
### 3.8.2 Analyse eines letalen Phänotyps mittels Tetraden-Analyse

Aufgrund des möglicherweise letalen Phänotyps der rpL31-Nullmutante, sollte dies durch eine Tetraden-Analyse eines diploiden, heterozygoten Hefe-Deletionsstamms (*rp131a/Δrp131a; Δrp131b/rp131b*) genau analysiert werden. Da man pro Ascus (vier Sporen einer diploiden Hefezelle) zweimal das Gen *rp131a* und zweimal *rp131b* vorfindet, sollte man, ausgehend von einem letalen Phänotyp, folgende Ergebnisse für die ausgekeimten Sporen der Ascii erwarten können:

Phänotyp	Genotyp
vier Sporen keimen aus	2x $\Delta rp131a$ ; 2x $\Delta rp131b$
drei Sporen keimen aus	1x wt; 1x $\Delta rp131a$ ; 1x $\Delta rp131b$
zwei Sporen keimen aus	2x wt

Zunächst wurde der heterozygote Hefestamm durch Kreuzung von kommerziell erhältlichen Deletionsstämmen Y06717 (MATa  $\Delta rp131b$ ) und YSC1021 (MAT $\alpha$   $\Delta rp131a$ ) erzeugt. Nach Vereinzelung der Sporen von sicheren Ascii wurde der Genotyp, der ausgekeimten Sporen, mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden im Hinblick auf *rp131a* und *rp131b* hin analysiert (2.2.11). In Abbildung 39 ist exemplarisch das Auskeimungsbild der Sporen von sechs analysierten Ascii gezeigt. Die entsprechenden Genotypen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Die Analyse ergab für den Phänotyp, dass in ca. 50 % der untersuchten Asci alle vier Sporen auskeimten und zu jeweils ca. 17 % drei bzw. nur zwei Sporen. Auffällig dabei war die unterschiedliche Vitalität der Hefezellen (siehe z.B. Reihe 3). Für die Genotypen hinsichtlich der Gene *rpl31a* und *rpl31b* der untersuchten Hefezellen stellte sich jedoch ein unerwartetes Ergebnis heraus. Sehr häufig wurde der wt Genotyp festgestellt, zum Teil bei allen vier ausgekeimten Sporen eines Ascus (siehe Tabelle 6; 2A – 2D), und in den anderen Fällen der Genotyp  $\Delta rpl31a$ . Im Vergleich zum Phänotyp zeigte sich dabei, dass die Hefezellen  $\Delta rpl31a$  eine deutlich reduzierte Vitalität aufweisen, welche schon früher beobachtet wurde (Deutschbauer *et al.*, 2005).



**Abbildung 39** Exemplarisches Auskeimungsbild der Sporen von sechs analysierten Asci der Tetraden-Analyse eines heterozygoten Hefe-Deletionsstamms (*rpl31a*/ $\Delta rpl31a$ ;  $\Delta rpl31b$ /*rpl31b*). Die mit A – D bezeichneten Sporen der einzelnen Reihen gehen jeweils auf eine diploide Zelle zurück. Auffällig ist die unterschiedliche Vitalität der Hefezellen, die teilweise auf den Genotyp zurückzuführen ist (vergleiche Reihe 3 mit Tabelle 6; 3A – 3D).

**Tabelle 6** Analyse der Genotypen hinsichtlich *rpl31a* und *rpl31b* der in Abb. 39 gezeigten, ausgekeimten Sporen. Erstaunlich ist das häufige Auftreten des wt Genotyps, zum Teil bei allen vier Sporen eines Ascus (Reihe 2). Ursache hierfür ist offensichtlich die Rekombination der beiden Gene während der mitotischen Zellteilung.

	1	2	3	4	5	6
A	wt	wt	wt	$\Delta rpl31a$	wt	wt
B	wt	wt	$\Delta rpl31a$	-	-	$\Delta rpl31a$
C	$\Delta rpl31a$	wt	$\Delta rpl31a$	wt	$\Delta rpl31a$	wt
D	$\Delta rpl31a$	wt	wt	$\Delta rpl31a$	wt	$\Delta rpl31a$

Die Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass offensichtlich beide Gene während der mitotischen Zellteilung in Folge von *crossovers*, welche sich eigentlich primär während der Meiose ereignen, rekombinieren. Dies deutet darauf hin, dass ein sehr starker Selektionsdruck auf die Erhaltung beider Gene

besteht (persönliche Mitteilung Dr. U. Schmidt). Hieraus lässt sich schließen, dass rpL31 mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit eine essentielle Bedeutung zukommt.

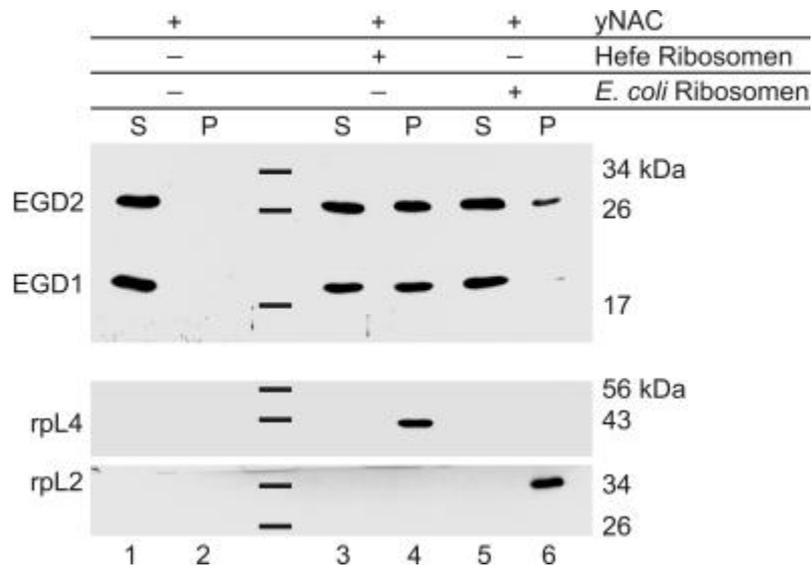
### **3.9 NAC kann nicht effizient mit Ribosomen aus Eubakterien assoziieren**

Aufgrund unserer Ergebnisse, dass eine rpL31-Nullmutante mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit letal ist, war es nicht möglich, die Assoziation von NAC mit Hefe Ribosomen zu untersuchen, denen das ribosomale Protein rpL31 fehlt. Daher wurde überprüft, ob Hefe NAC an Ribosomen aus Eubakterien ebenso wie an Ribosomen aus *S. cerevisiae* binden kann. Dieses heterologe System wurde ersatzweise ausgewählt, weil in Eubakterien kein rpL31 Homolog existiert.

In Rückbindungstests wurde rekombinantes Hefe wt NAC zum einen mit Hochsalz-gereinigten 70S Ribosomen aus *E. coli* und zum anderen mit 80S Ribosomen aus YJF24 inkubiert. Nach Sedimentation der Ribosomen unter physiologischer Salzkonzentration wurden äquivalente Proben der Überstände (S) bzw. der Ribosomen-Pellets (P) nach SDS-PAGE mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 40). Das Ergebnis zeigt für die Kontrolle ohne Ribosomen NAC nur im Überstand (Spuren 1 und 2). Im Vergleich der beiden Ansätze mit Ribosomen ist deutlich festzustellen, dass NAC in Kombination mit *E. coli* Ribosomen in nur sehr geringen Mengen im Pellet nachzuweisen ist (Spur 6). Dies gilt insbesondere für EGD1 ( $\beta$ -NAC).

Da es sich bei der Kombination von NAC mit Ribosomen aus *E. coli* um ein heterologes System handelt (Eubakterien besitzen kein NAC Homolog), können Schlussfolgerungen aus diesem Ergebnis nur vorsichtig formuliert werden. Fest steht, dass NAC *in vitro* mit Ribosomen aus Eubakterien assoziieren kann. Möglicherweise über einige der weiteren Bindungsstellen, die eventuell zu ribosomalen Proteinen erfolgen, die in allen Organismen konserviert sind. Deutlich hingegen wird, dass Hefe wt NAC nicht so effizient mit *E. coli* Ribosomen assoziiert, wie mit Hefe Ribosomen. Die Ursache hierfür ist sehr wahrscheinlich der fehlende spezifische Kontakt zwischen EGD1 und dem ribosomalen Protein rpL31, welches es in Eubakterien nicht gibt. Weiter können

aufgrund des heterologen Systems unspezifische Interaktionen zwischen NAC und den 70S Ribosomen nicht ausgeschlossen werden, wie z.B. zu ribosomalen Proteinen, die spezifisch nur in Eubakterien vorkommen (siehe Abbildung 37). Dies wäre eine Erklärung, warum die NAC-Deletionsmutante ( $\gamma$ NAC  $\beta\Delta 1-11$ ) im Rückbindungstest mit Hefe Ribosomen überhaupt nicht im Pellet nachweisbar ist (siehe 3.4.3 Abbildung 20B), gegenüber wt NAC in Kombination mit Ribosomen aus *E. coli* (Abb. 40; Spur 6).



**Abbildung 40** Vergleich der Assoziation von Hefe wt NAC mit 80S Ribosomen aus *S. cerevisiae* und 70S Ribosomen aus *E. coli*. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass im Rückbindungstest mit *E. coli* Ribosomen vergleichsweise nur sehr geringe Mengen NAC im Pellet nachweisbar sind (Spuren 4 + 6). Die Analyse des Western-Blots erfolgte mit Antiseren gegen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) und EGD1 ( $\beta$ -NAC). Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Ribosomen-Sedimentation wurde der untere Teil desselben Blots mit Antikörpern gegen die ribosomalen Proteine rpL4 (aus *S. cerevisiae*) bzw. rpL2 (aus *E. coli*) überprüft.

### 3.10 Bindung von $\beta$ -NAC an eine Peptid-Bibliothek von rpL31

Um den Bereich von rpL31 zu identifizieren, über den die Assoziation der N-terminalen Helix von EGD1 ( $\beta$ -NAC) zum Ribosom vermittelt wird, wurde die Bindung von Hefe NAC an eine Peptid-Bibliothek von rpL31 untersucht.

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 sind dabei um jeweils 2 Aminosäuren versetzt.

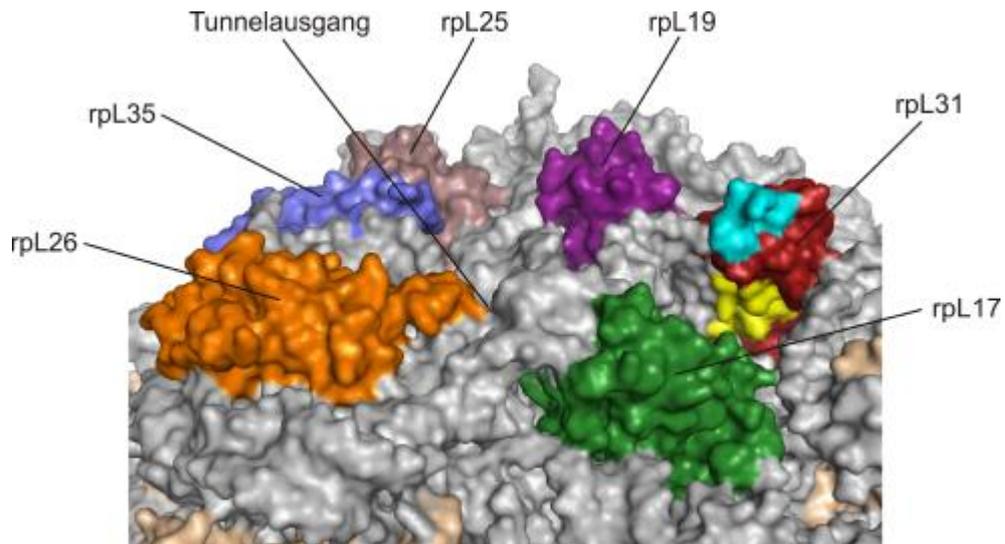
1. Peptid: MAGLKDVVTREY TIN
2. Peptid: GLKDVVTREY TINLH
3. Peptid: KDVVTREY TINLHKR
4. Peptid: VVTREY TINLHKRLH usw.

Zur besseren Orientierung wurde an den Positionen 1 und 52 auf dem Blot das Peptid Nr. 13 aufgebracht (K), das bereits in Vorversuchen als positiv identifiziert worden war. In parallelen Ansätzen wurde die Bindung von Hefe wt NAC (yNAC) im Vergleich zu der NAC-Deletionsmutante (yNAC  $\beta\Delta 1-11$ ) an die Peptide untersucht und mit einem Antiserum gegen EGD1 analysiert. Um zu überprüfen, ob der Antikörper Peptide von rpL31 als Epitop erkennt, wurde eine Peptid-Bibliothek nur mit dem Antiserum inkubiert (AK-Kontrolle) (Abbildung 41).

Die Analyse für yNAC zeigt für die positiv-Kontrolle (K) eine deutliche Reaktion. Die Beobachtung, dass EGD1 nur in der Peripherie des Peptid-Spots detektiert wird, hängt möglicherweise mit einem Ausbleich-Effekt zusammen. Dabei wird, aufgrund der großen Menge an gebundenem Protein am eigentlichen Peptidspot, das Nachweis-Substrat zu schnell umgesetzt, wodurch es nicht mehr detektiert werden kann (persönliche Mitteilung Dr. Volkmer-Engert). Demnach ergeben sich in der Analyse der Peptid-Bibliothek für yNAC zwei Sequenzbereiche an die EGD1 ( $\beta$ -NAC) wahrscheinlich bindet: Der erste Bereich beinhaltet die Peptide Nr. 12 – 14 (Sequenzabschnitt: Val<sup>23</sup> – Lys<sup>41</sup>). Interessanterweise lässt sich im Vergleich für den Ansatz mit yNAC  $\beta\Delta 1-11$  überhaupt keine positive Reaktion für diese Peptide feststellen. Die Beurteilung des zweiten Sequenzbereichs, Peptide Nr. 36 – 39 (Sequenzabschnitt: Leu<sup>71</sup> – Ser<sup>91</sup>), ist in der Analyse nicht eindeutig. Zunächst muss berücksichtigt werden, dass die Kontrolle mit dem Antiserum gegen EGD1 (AK) für die Peptide Nr. 36 – 38 eine positive Reaktion zeigt, allerdings nicht für das Peptid Nr. 39. Daher ist es durchaus möglich, dass ein Teil der detektierten Reaktion für den Ansatz mit yNAC auf eine Bindung von EGD1 an diese Peptide zurückzuführen ist. Bestätigt wird dies durch die deutlich schwächere Reaktion bei den Peptiden Nr. 38 – 39 für den Ansatz mit yNAC  $\beta\Delta 1-11$ . Aufgrund des beobachteten Ausbleich-Effekts bei den Peptiden Nr. 12 – 14 scheint die Bindung von EGD1



eine mögliche Interaktion mit der N-terminalen Helix von EGD1 zugänglich sind. Außerdem liegen sie in der dreidimensionalen Struktur relativ dicht beieinander, was in der Analyse der Peptidbibliothek die Bindung von EGD1 zu zwei Bereichen, die sich in der Aminosäuresequenz nicht überlappen, erklären würde.



**Abbildung 42** Illustration der Kryo-EM Struktur der großen ribosomalen Untereinheit von *S. cerevisiae* (PDB ID: 1S1I). Dargestellt ist der Bereich des Tunnelausgangs mit den umgebenden ribosomalen Proteinen. Bei rpL31 sind die Aminosäuren der Peptide Nr. 12 – 14 (gelb) und der Peptide Nr. 36 – 39 (cyan) farbig abgesetzt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) erstellt.