

Aus dem Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Enno Hartmann

Untersuchungen zur Ribosomenbindung an
zwei verschiedene Populationen des Sec61-
Komplexes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät -

vorgelegt von

Nicolas Danzenbächer

aus Braunschweig

Lübeck 2010

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Kai-Uwe Kalies

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2010

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 19.07.2010

gez. Sprecher der MINT-Sektionen
Professor Dr. J. Prestin

*Jeder Fehler erscheint unglaublich dumm,
wenn andere ihn begehen.*

Georg Christoph Lichtenberg

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 EINLEITUNG	1
1.1.1 Proteintransport über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums	1
1.1.1.1 Der cotranslationale Proteintransport in Eukaryonten	2
1.1.1.2 Der posttranslationale Proteintransport in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	4
1.1.2 Die Struktur des Translokationskanals	6
1.1.2.1 Die proteinleitende Pore	6
1.1.2.2 Die oligomere Struktur des Sec61-Komplexes	9
1.1.3 Interaktion von Ribosomen mit der ER-Membran	12
1.2 ZIELSETZUNG	17
2 Material und Methoden	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Bakterienstämme	18
2.1.3 Hefestämme	18
2.1.4 Plasmide	20
2.1.5 Oligonukleotide	20
2.1.6 Antikörper	21
2.1.7 Puffer und Lösungen	22
2.1.8 Nährmedien zur Anzucht von Zellen	26
2.1.8.1 Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.8.2 Nährmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2 METHODEN	27
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	27
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1 Präparation von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.2.2.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Amplifikation der Tagging-Module ..	28
2.2.3 Zellbiologische Methoden	28
2.2.3.1 Vermehrung von Bakterienzellen	28
2.2.3.2 Kultivierung und Lagerung von Hefezellen	28

2.2.3.3 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit linearen DNA-Fragmenten	29
2.2.3.4 Kreuzung, Sporulation und Tetradendissektion	29
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4.1 Zellfraktionierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.4.2 Präparation von Membranen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.2.4.3 Präparation von Ribosomen aus Zytosol von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.4.4 Präparation von Ribosomen aus rauen Membranen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.4.5 Radioaktive Markierung von Ribosomen	31
2.2.4.6 Differentielle Extraktion von Hefemembranen	32
2.2.4.7 Anreicherung des trimeren Sec61-Komplexes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	33
2.2.4.7.1 Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose	34
2.2.4.7.2 Affinitätschromatographie mittels α -HA-Agarosekonjugat	34
2.2.4.8 Aufkonzentrierung der Eluate mit Amicon Ultra-15 Filtereinheiten	35
2.2.4.9 Rekonstitution gereinigter Proteine in Liposomen	35
2.2.4.9.1 Lipidlösungen	35
2.2.4.9.2 Rekonstitution von gereinigtem Sec61-Komplex in Proteoliposomen	35
2.2.4.10 Bindungsexperimente	36
2.2.4.10.1 Bindungsexperimente in Lösung	36
2.2.4.10.2 Bindung an in Lipidvesikel rekonstituierte Sec61-Komplexe	36
2.2.4.10.3 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)	36
2.2.5 Proteinanalytische Methoden	37
2.2.5.1 Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure	37
2.2.5.2 Präzipitation von Proteinen mit Methanol und Chloroform	38
2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.2.5.4 Western Blot und Antikörperinkubation	38
2.2.5.5 Auswertung/Software	39
3 Ergebnisse	40
3.1 HERSTELLUNG EINES HEFESTAMMES MIT DREI PROTEIN-TAGS	41
3.2 NACH DER VOLLSTÄNDIGEN DEPLETION DES SEC-KOMPLEXES BEFINDEN SICH ZWEI POPULATIONEN VON SEC61-KOMPLEXEN IN RAUEN MEMBRANEN VON YUE04.	45

3.3 AUS RAUEN MEMBRANEN VON YUE04 KÖNNEN BEIDE POPULATIONEN DES SEC61-KOMPLEXES SCHONEND ANGEREICHERT WERDEN	47
3.3.1 Der freie Sec61-Komplex kann aus dem Digitoninextrakt angereichert werden	47
3.3.2 Der ribosomengebundene Sec61-Komplex kann aus den RAMP isoliert werden	49
3.3.3 Die angereicherten Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP lassen sich im Western Blot und über eine Coomassiefärbung nachweisen	50
3.4 BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN VON RIBOSOMEN AUS ZYTOSOL AN SEC61-KOMPLEXE AUS DIGITONINEXTRAKT UND RAMP	52
3.5 DIE SEC61-KOMPLEXE BINDEN RIBOSOMEN IN DETERGENZLÖSUNG	54
3.5.1 Die isolierten Sec61-Komplexe können in Detergenzlösung an Ribosomen aus Zytosol gebunden werden	54
3.6 BESTIMMUNG DER RIBOSOMENBINDUNGSKONSTANTEN MIT HILFE DER SURFACE PLASMON RESONANCE SPEKTROSKOPIE	56
3.6.1 Die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex ist salzsensitiv	58
3.6.2 Die Dissoziationskonstanten der Bindung von Ribosomen an die zwei Populationen des Sec61-Komplexes können Online bestimmt werden	59
4 Diskussion	63
4.1 HERSTELLUNG EINES HEFESTAMMES ZUR VOLLSTÄNDIGEN DEPLETION DES SEC-KOMPLEX	64
4.2 IN DER ER-MEMBRAN VON S. CEREVISIAE KÖNNEN ZWEI DISTINKTE POPULATIONEN DES SEC61-KOMPLEXES IDENTIFIZIERT WERDEN	65
4.3 ISOLIERUNG DER SEC61-KOMPLEXE AUS RAUEN MEMBRANEN	66
4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNG VON RIBOSOMEN AN DIE ZWEI POPULATIONEN DES SEC61-KOMPLEXES	68
4.4.1 Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierte Sec61-Komplexe ..	68
4.4.2 Bindungsexperimente in Detergenzlösung	69
4.4.3 Untersuchungen mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance Spektroskopie	71
4.4.3.1 Die Bindung von Ribosomen an die aus Digitoninextrakt und RAMP gereinigten Komplexe folgt nicht dem „eins zu eins Modell“ des Massenwirkungsgesetzes	73

4.4.4 Die SPR-Spektroskopie als Methode zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex	74
4.5 KRITISCHE BETRACHTUNG DER ANGEWANDTEN METHODEN UND AUSBLICK	75
5 Zusammenfassung	78
6 Literaturverzeichnis	79
7 Abkürzungsverzeichnis	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der cotranslationale Proteintransport in Eukaryonten.	2
Abbildung 1.2: Der posttranslationale Proteintransport in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	4
Abbildung 1.3: Architektur des SecYE β -Komplexes	8
Abbildung 1.4: Widerstreitende Modelle zum oligomeren Zustand des Sec61-Komplexes	11
Abbildung 1.5: Interaktionspunkte des Sec61-Komplexes mit dem Ribosom	14
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Reinigungsprozesses der Sec61-Komplexe aus rauen Membranen der Hefe YUE04	33
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Proteintags, die in den Sec61- bzw. den Sec-Komplex integriert werden sollen um den Sec-Komplex gezielt zu depletieren	40
Abbildung 3.2: Herstellung des Hefestamm YND5	41
Abbildung 3.3: Herstellung des Hefestamms YUE04	43
Abbildung 3.4: Depletion des heptameren Komplexes aus YUE04	44
Abbildung 3.5: Inkubation des Sec-Komplexes aus YND22 mit IgG-Sepharose	45
Abbildung 3.6: In Membranen des Hefestamm YUE04 kommt der Sec61-Komplex in zwei Populationen vor	46
Abbildung 3.7: Isolierung des Sec61-Komplexes aus Digitoninextrakt	48
Abbildung 3.8: Reinigung des Sec61-Komplexes aus RAMP	50
Abbildung 3.9: Der fSec61-Komplex und der rSec61-Komplex wurden im Western Blot und über eine Coomassie-Färbung nachgewiesen	51
Abbildung 3.10: Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierten fSec61-Komplex	52
Abbildung 3.11: Bindung von Ribosomen in Proteoliposomen rekonstituierten Sec61-Komplex aus RAMP	53
Abbildung 3.12: Bindung von fSec61- und rSec61-Komplexen an Ribosomen	55
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung eines BIAcore Bindungsexperiment	56
Abbildung 3.14: Die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex ist salzsensitiv	58
Abbildung 3.15: Die Bindung von Ribosomen an gereinigte Sec61-Komplexe folgt nicht dem „eins zu eins Modell“ des Massenwirkungsgesetzes	59
Abbildung 3.16: Im BIAcore binden Ribosomen aus Zytosol an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt	60
Abbildung 3.17: Im BIAcore binden Ribosomen aus Zytosol an den Sec61-Komplex aus RAMP	61

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Alle eukaryontischen Zellen zeichnen sich durch die Unterteilung in voneinander getrennte Organellen aus. Diese Organellen, wie der Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat oder die Lysosomen, bestehen aus einem oder mehreren membranumschlossenen Reaktionsräumen (Kompartimenten). Die spezielle Proteinausstattung in den Kompartimenten bestimmt deren Funktion und erlaubt es, spezifische Stoffwechselwege innerhalb der membranumschlossenen Bereiche durchzuführen. Die Membranen der Kompartimente sind hydrophobe Permeabilitätsbarrieren, die sich aus Lipiden und Proteinbestandteilen zusammensetzen. Während die Lipide die unkontrollierte Diffusion von hydrophilen Molekülen verhindern, dienen spezielle Proteine als Translokasen, welche die Ionen- und Molekülzusammensetzung in den Kompartimenten regulieren.

Da die Synthese der meisten Proteine an Ribosomen im Zytosol beginnt, muss ein gerichteter Transport dieser Proteine in die oben genannten Organellen und in deren Kompartimente erfolgen. Hierzu besitzen sekretorische Proteine in ihrer Primärsequenz Zielsteuerungssignale, die einen selektiven Transport zu ihrem Wirkort gewährleisten. Diese Sortierungssignale ermöglichen die Erkennung dieser Proteine durch Translokationskanäle in der ER-Membran. Zur Sekretion vorgesehene Proteine oder Proteine, deren Wirkort sich im Lumen der Organellen des sekretorischen Weges (ER, Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen) bzw. in deren Membranen und der Plasmamembran befindet, werden bei Eukaryonten zunächst in das ER transportiert (Palade, 1975). Anschließend gelangen sie über Vesikel zu ihrem Ziel.

1.1.1 PROTEINTRANSPORT ÜBER DIE MEMBRAN DES ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS

Proteine, die sezerniert werden, tragen am Aminoterminus in der Regel eine Signalsequenz, die ihren Transport zum Wirkort determiniert (Blobel und Dobberstein, 1975), ihre Insertion in das ER erfolgt mit Hilfe eines Multiproteinkomplexes, der einen proteinleitenden Kanal bildet (Simon und Blobel, 1991; Simon und Blobel, 1992). Die Aktivität dieses von Blobel und Dobberstein 1975 postulierten Komplexes konnte erstmals zu Beginn der 1990er Jahre mit Hilfe genetischer, biophysikalischer und biochemischer Studien gezeigt werden (Deshaies und Schekman, 1987; Görlich *et al.*, 1992a; Rothblatt *et al.*, 1989; Simon und Blobel, 1991).

Der Komplex ist evolutiv konserviert und wird in Eukaryonten als Sec61-Komplex, in den Bakterien als SecYEG-Komplex und in den Archaeen als SecYE β -Komplex bezeichnet (Hartmann *et al.*, 1994; Pohlschröder *et al.*, 2005).

1.1.1.1 Der cotranslationale Proteintransport in Eukaryonten

Während des cotranslationalen Proteintransports sind die Translation und die Translokation der naszierenden Proteinkette über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gekoppelt (Abb 1.1). Dieser Vorgang ist am besten *in vitro* im Säugersystem untersucht (zur Übersicht siehe Rapoport *et al.*, 1996). Der cotranslationale Transport beginnt mit dem *Targeting* zytosolischer Ribosomen, die ein Protein synthetisieren, das eine N-terminale Signalsequenz besitzt. Die Signalsequenz wird spezifisch vom *Signal-Recognition-Particle* (SRP) erkannt, sobald diese den

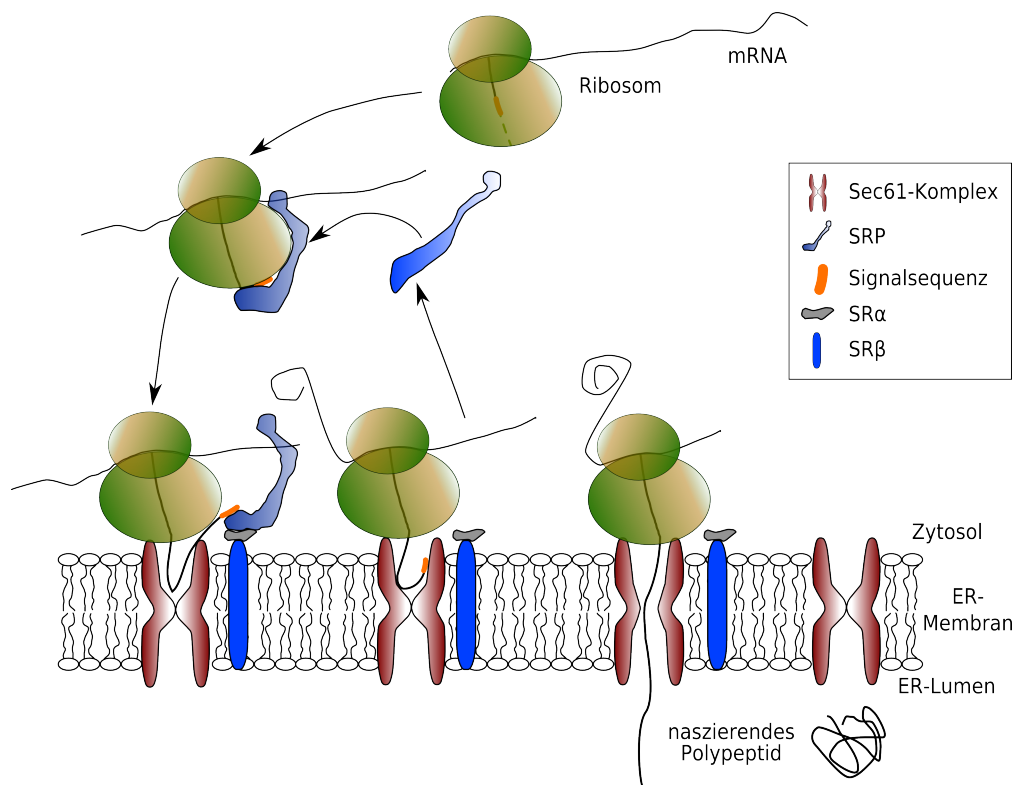


Abbildung 1.1: Der cotranslationale Proteintransport in Eukaryonten.

Verlässt die Signalsequenz den Protein-Exit-Tunnel im Ribosom, wird sie vom SRP erkannt und gebunden. Zusätzlich zur Bindung an die Signalsequenz, interagiert der SRP mit dem Ribosom und verlangsamt so die Translation. Dies ermöglicht das *Targeting* des Ribosom-naszierende-Kette-Komplex an die Membran, wo der SRP an seinen Rezeptor (SRP-Rezeptor SR) bindet. Daraufhin wird die Signalsequenz an den Sec61-Komplex übertragen, das Ribosom bindet seinen Rezeptor, den Sec61-Komplex und die Translokation beginnt. Nach GTP Hydrolyse dissoziiert der SRP von der Membran und steht einem weiteren Zielsteuerungszyklus zur Verfügung. Während der Translokation wird die Signalsequenz abgespalten. Das Protein wird in das Lumen des ER überführt und der Kanal schließt sich wieder.

polypeptidleitenden Tunnel im Ribosom verlässt. Der SRP ist in Eukaryonten ein Ribonukleo-

protein, das aus sechs Proteinen und einer 7S RNA zusammen gesetzt ist (Nagai *et al.*, 2003; Sauer-Eriksson und Hainzl, 2003). Zusätzlich zur Bindung an die Signalsequenz bindet der SRP auch an das Ribosom und verlangsamt so die Elongation des Polypeptids (Walter und Blobel, 1981). Dieses wird somit in einem translokationskompetenten Zustand gehalten, während der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und dem SRP (SRP-RNC) an die ER-Membran gelangt.

Die Interaktion dieses Komplexes mit der ER-Membran erfolgt hierbei über die α -Untereinheit des *Signal-Recognition-Particle-Receptor* (SR). Das SR α , ein peripheres Membranprotein, ist fest mit der β -Untereinheit des SR assoziiert, die den SR in der Membran verankert (Gilmore *et al.*, 1982). Beide Untereinheiten sind GTPasen, die zusammen mit der GTPase Untereinheit des SRP die anschließende Übergabe des naszierenden Polypeptids an den Sec61-Komplex regulieren (Connolly und Gilmore, 1993). Nachdem die Signalsequenz auf den Sec61-Komplex übertragen wurde, kann GTP hydrolysiert werden, der SRP dissoziiert vom SR α und das translatierende Ribosom kann an seinen Rezeptor den Sec61-Komplex binden (Egea *et al.*, 2004; Focia *et al.*, 2004; Shan und Walter, 2005). Erkennt das Translokon, eine Funktionseinheit, deren zentraler Bestandteil, die Proteinleitende Pore durch den Sec61-Komplex gebildet wird, eine funktionelle Signalsequenz, erfolgt die cotranslationale Translokation (Jungnickel und Rapoport, 1995).

Der im inaktiven Zustand geschlossene Translokationkanal wird hierbei wahrscheinlich durch die Bindung des Ribosoms an die zytoplasmischen Schleifen im Carboxyterminus des Sec61p sterisch so verändert, dass eine Weitung der Pore erfolgt (Jung *et al.*, 2003; Raden *et al.*, 2000). Angetrieben wird der Transport durch die GTP Hydrolyse im Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms. Die Elongation des Polypeptids schiebt das naszierende Protein gleichsam durch die Pore in der ER-Membran. Erreicht die Peptidkette eine Länge von etwa 70 Aminosäuren (AS), wird die Bindung des Ribosoms an die Membran hochsalzresistent (Jungnickel und Rapoport, 1995).

Die Insertion des sekretorischen Proteins in den Sec61-Komplex erfolgt schlaufenartig, d. h. die Signalsequenz bleibt im Kanal verankert, während die C-terminalen Aminosäuren durch die Membran transportiert werden (Mothes *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1988). Erreichen diese das Lumen des ER, erkennt der Signalpeptidase-Komplex die Schnittstelle zwischen Signalsequenz und reifem Protein und spaltet die Signalsequenz ab, woraufhin diese abgebaut wird.

Wenn das translatierende Ribosom am Stopcodon der mRNA angelangt ist, dissoziiert es in seine Untereinheiten. Ob sich aber die große Untereinheit von der Membran ablöst oder an das Sec61 gebunden bleibt, ist weiterhin Gegenstand von Diskussionen (Potter und Nicchitta, 2000; Potter *et al.*, 2001; Schaletzky und Rapoport, 2006).

1.1.1.2 Der posttranslationale Proteintransport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Anders als beim cotranslationalen Transport, wird das Polypeptid vor Beginn des posttranslationalen Transport vollständig im Zytoplasma synthetisiert (Abb. 1.2). In Eukaryonten ist dieser Prozess am besten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) untersucht (Matlack *et al.*, 1999). Ob ein Protein cotranslational oder posttranslational transportiert wird, ist bestimmt durch die Beschaffenheit der Signalsequenz. Proteine mit langen hydrophoben Signalsequenzen werden bevorzugt cotranslational transportiert. Proteine mit weniger hydrophoben Sequenzen werden entweder co- oder posttranslational, oder nur posttranslational transportiert (Ng *et al.*, 1996).

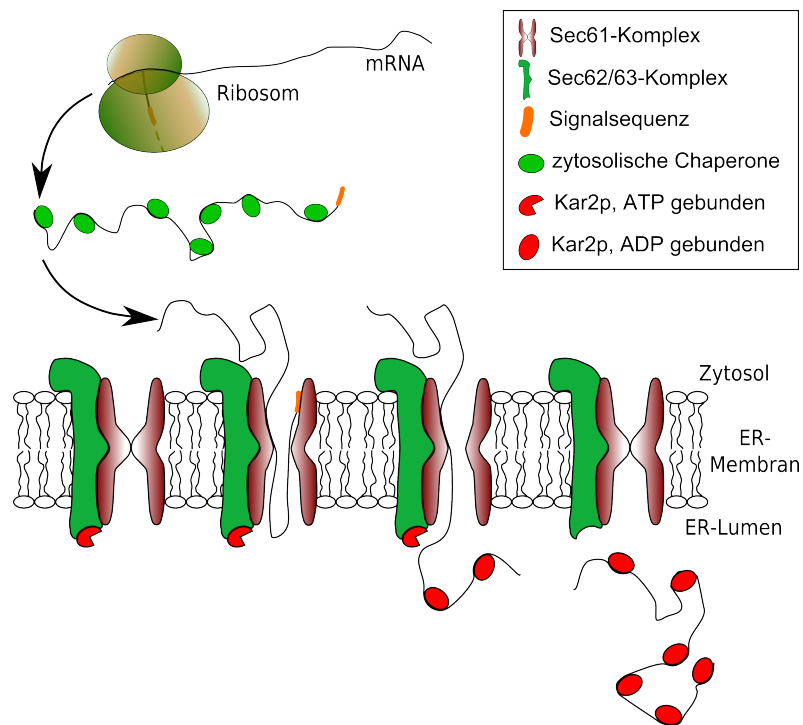


Abbildung 1.2: Der posttranslationale Proteintransport in der Hefe *S. cerevisiae*

Nach erfolgter Translation liegt das sekretorische Protein an zytosolische Chaperone gebunden in einem translokationskompetenten Zustand vor. Die Insertion der Polypeptidkette erfolgt schlaufenartig in den Sec-Komplex, der durch den Sec61-Komplex und den Sec62/63-Komplex gebildet wird. Der Transport erfolgt passiv durch „Brownsche Molekularbewegung“. Das Zurückgleiten des Proteins wird durch die sukzessive Bindung von Kar2p im Lumen des ER verhindert.

Die Architektur des Translokationskanals lässt nur den Transport von ungefalteten Proteinen zu, somit muss das im Zytosol synthetisierte Protein folglich in einem entfalteten Zustand gehalten werden. Hierzu binden Chaperone an die Polypeptidkette und halten diese in einem translokationskompetenten Zustand. Für die Hefe *S. cerevisiae* konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gezeigt werden, dass HSP70 Chaperone und deren DnaJ-verwandter Cofaktor Ydj1p

sekretorische Proteine transient binden (Caplan *et al.*, 1992). Diese Bindung wird jedoch aufgehoben, sobald die Aminosäurekette mit dem heptameren Translokationskanal interagiert. Dieser Sec-Komplex setzt sich aus den Komponenten des trimeren Sec61-Komplexes (Sec61p, Sbh1p und Sss1p), sowie den Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p, die den tetrameren Sec62/63-Komplex bilden, zusammen (Deshaies und Schekman, 1987; Panzner *et al.*, 1995).

In genetischen Studien wurde gezeigt, dass zwei der Proteine des Sec62/63-Komplex, das Sec62p und das Sec63p, essentiell, Deletionsmutanten also nicht lebensfähig sind (Deshaies und Schekman, 1987; Rothblatt *et al.*, 1989). In Hefezellen, die ein temperatursensitives Allel des *SEC62*-Gens besitzen, akkumulieren unter permissiven Bedingungen Präkursoren bestimmter sekretorischer Proteine im Zytosol (Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies und Schekman, 1990). Das Sec62p besitzt zwei Transmembrandomänen (TMD), wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus im Zytosol lokalisiert sind.

Das zweite essentielle Gen (*SEC63*) wurde in einer genetischen Studie isoliert, in der nach Mutationen im sekretorischen Weg gesucht wurde (Rothblatt *et al.*, 1989). Das Sec63p Protein ist ein integrales Membranprotein mit drei hydrophoben Bereichen. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Lumen des ER, zwischen den TMD 2 und 3, eine DnaJ-Domäne befindet. Genetische und biochemische Studien bewiesen, dass diese Domäne wichtig ist für die Interaktion mit dem luminalen Chaperon Kar2p, das notwendig ist für die posttranslationale Insertion von Proteinen in das ER (Feldheim *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992).

Auch die Gene für die beiden nicht essentiellen Proteine Sec71p und Sec72p wurden in genetischen Studien gefunden (Green *et al.*, 1992; Kurihara und Silver, 1993). Sec71p ist ein integrales Membranprotein, das eine Transmembrandomäne besitzt. Sein N-Terminus befindet sich im Lumen des ER und wird dort glykosiliert. In einem $\Delta sec71$ -Stamm kann *in vivo* ein Wachstumsdefekt bei 37°C beobachtet werden, außerdem wird das Sec72p reprimiert (Green *et al.*, 1992; Kurihara und Silver, 1993). Es wird angenommen, dass das Sec71p einen stabilisierenden Einfluss auf das Sec72p hat. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Sec72p als einziges Protein des Sec-Komplexes keine Transmembrandomäne besitzt, es ist aber als zytosolisches peripheres Membranprotein stabil mit dem Sec71p assoziiert (Feldheim und Schekman, 1994).

Innerhalb des heptameren Sec-Komplexes wird die proteinleitende Pore wie beim cotranslationalen Transport durch den trimeren Sec61-Komplex gebildet. Anders jedoch als bei diesem wird der Transport nicht direkt durch die Hydrolyse von GTP angetrieben, sondern beruht primär auf der „Brownschen Molekularbewegung“. Da diese jedoch ungerichtet ist, wird die gerichtete

Bewegung des Proteins durch die Pore durch die Wirkung einer sogenannten „molekulare Ratsche“ sicher gestellt. Die Funktion der Sperrklinke übernimmt hierbei das ER-luminale Chaperon Kar2p (Matlack *et al.*, 1999). Kar2p wird durch die J-Domäne des Sec63p an das Translokation rekrutiert (Sadler *et al.*, 1989). Es bindet die J-Domäne in seinem ATP gebundenen Zustand. So aktiviert ist es in der Lage, Peptide in der Nähe der luminalen Öffnung des Kanals mit geringer Spezifität zu binden (Misselwitz *et al.*, 1998). Durch diese Bindung wird die Rückdiffusion der Polypeptidkette in das Zytosol verhindert. Die Bindung des Kar2p an eine sekretorische Aminosäurekette führt zur schnellen ATP Hydrolyse, wodurch die bisher geöffnete Peptidbindungstasche des Chaperons um das Polypeptid herum geschlossen wird. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von ATP so die Energie für den Transport liefert (Matlack *et al.*, 1999). Erreicht nun ein weiterer Teil der Peptidkette das Lumen des ERs bindet erneut ein Kar2p-Molekül, ein Vorgang der durch mehrmalige Wiederholungen dazu führt, dass das sekretorische Protein vollständig in das ER transloziert wird. Der erneute Austausch von ADP gegen ATP im Kar2p führt zur Freisetzung des Proteins und beendet so die Translokation.

1.1.2 DIE STRUKTUR DES TRANSLOKATIONSKANALS

1.1.2.1 Die proteinleitende Pore

Die zentrale Komponente des Translokons in Eukaryonten ist der trimere Sec61-Komplex. Er bildet sowohl im cotranslationalen als auch im posttranslationalen Transport die proteinleitende Pore in der ER-Membran (Görlich und Rapoport, 1993). Auch in Prokaryonten wird der Transport von Polypeptiden in oder über die Zytoplasmamembran von einem trimeren Proteinkomplex katalysiert (Brundage *et al.*, 1990). Sowohl der SecYEG-Komplex der Eubakterien, als auch der SecYE β -Komplex der Archaeen, ist weitgehend homolog zum Sec61-Komplex (siehe Tabelle).

Tabelle 1: Komponenten des Translokationsapparats in den drei Reichen. Die homologen Untereinheiten wurden jeweils in den gleichen Zeilen aufgeführt.

Komponente		Eukaryonten	Eubakterien	Archaeen
	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. jannaschii</i>
Sec61-Komplex	Sec61 α	Sec61p	SecY	SecY
	Sec61 β	Sbh1p		Sec β
	Sec61 γ	Sss1p	SecE SecG	SecE
Sec62/63-Komplex	Sec62	Sec62p		
	Sec63	Sec63p		
		Sec71p Sec72p		
Ssh1-Komplex		Ssh1p		
		Sbh2p		
		Sss1p		

Es konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution des Sec61-Komplexes aus Säugern oder aus *S. cerevisiae* in Proteoliposomen ausreichend ist für den Proteintransport in diese Vesikel (Görlich und Rapoport, 1993; Panzner *et al.*, 1995). Systematische Quervernetzungsexperimente mit photoreaktiven Sonden zeigten, dass Bereiche der naszierenden Kette innerhalb der Membran nur mit dem Sec61 α oder mit Lipiden quervernetzt werden konnten und geben somit einen weiteren Hinweis darauf, dass die proteinleitende Pore durch den Sec61-Komplex mit dem zentralen Sec61 α gebildet wird (Görlich *et al.*, 1992b; Mothes *et al.*, 1994).

Betrachtet man die beiden anderen Untereinheiten des Sec61-Komplexes, zeigt sich, dass nur das Sec61 γ in allen drei Reichen konserviert ist. Sowohl das Sss1p der Hefen, als auch das SecE der Bakterien und Archaeen, besitzen in der Regel eine TMD, eine Ausnahme bildet hier u. a. *Escherichia coli* (*E. coli*), wo zwei zusätzliche TMD vorliegen, die jedoch nicht essentiell sind (Schatz *et al.*, 1991).

Die dritte Untereinheit des Sec61-Komplexes, das Sec61 β in Säugern, das Sbh1p in der Hefe und das Sec β der Archaeen, findet in den Bakterien kein homologes Protein. Hier findet man vielmehr das SecG, ein integrales Membranprotein mit zwei TMD, das ebenso wie das Sbh1p in der Hefe

nicht essentiell ist (Deshaies und Schekman, 1987; Hartmann *et al.*, 1994; Kalies und Hartmann, 1998).

Genetische Studien in der Hefe *S. cerevisiae* zeigten, dass in diesem Organismus mit dem Ssh1-Komplex ein zweiter am Proteintransport beteiligter trimerer Komplex in der ER-Membran existiert. Die Proteine weisen Homologien zum Sec61-Komplex auf. Der beschriebene Komplex besteht aus den beiden nicht essentiellen Proteinen Ssh1p (*Sec-sixty-one homolog 1*) und Ssh2p (*Sec-sixty-one beta homolog 2*) und dem Protein Sss1p, das auch Bestandteil des Sec61-Komplexes ist (Esnault *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die beiden Komplexe trotz der Sequenzhomologien zweier zentraler Bestandteile verschiedene Funktionen in der Zelle erfüllen. So ist der Ssh1-Komplex zwar in der Lage Ribosomen zu binden, eine Assoziation mit dem Sec62/63-Komplex konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Ssh1-Komplex scheint also ausschließlich am cotranslationalen Transport beteiligt zu sein. Später konnte diese Hypothese durch den Befund untermauert werden, dass das Ssh1p nur Signalsequenzen von cotranslational transportierten Proteinen erkennt (Wittke *et al.*, 2002).

Van den Berg *et al.* konnten 2004 die Kristallstruktur des trimeren SecYE β aus *M. jannaschii* lösen (van den Berg *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass der trimere Komplex in Detergenzlösung, von der zytosolischen Seite betrachtet, eine etwa rechteckige Form besitzt. Das SecY bildet hierbei die zentrale Komponente, das SecE und das Sec β befinden sich in der Peripherie. Jedes Protein kommt in einer Kopie in diesem Komplex vor.

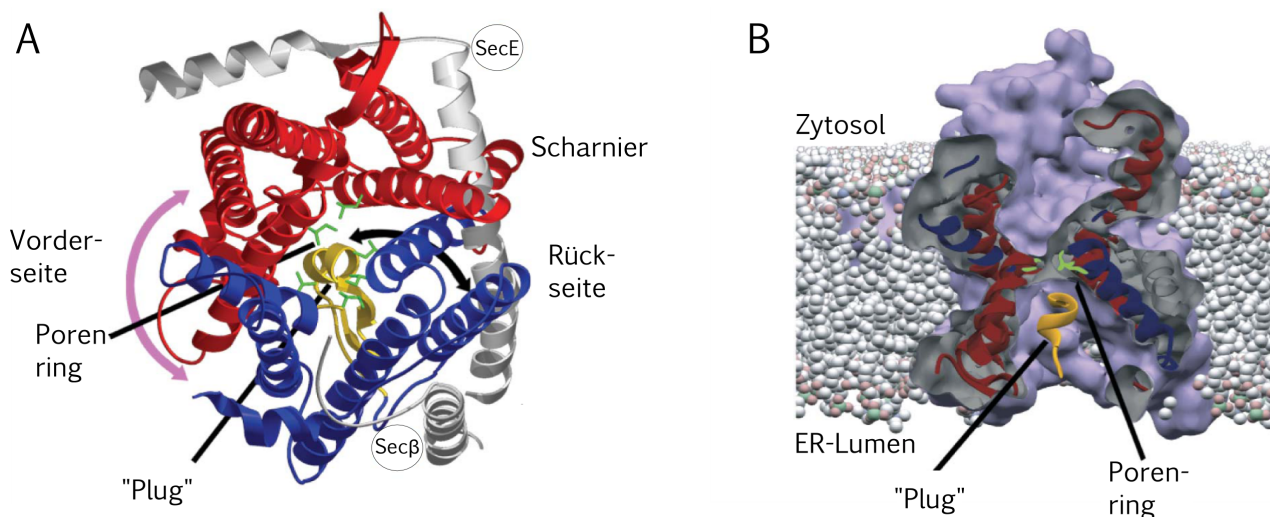


Abbildung 1.3: Architektur des SecYE β -Komplexes

(A): Die Ansicht des SecYE β -Komplexes vom Zytosol in Richtung der Membran. Es zeigt sich deutlich die Verteilung der 10 TMD auf zwei pseudosymmetrische Domänen (TMD 1-5 blau, TMD 6-10 rot), die eine „Klappmuschel“ bilden. (B): Der Schnitt durch den Komplex entlang der Membranebene verdeutlicht die „Sanduhr“-Form, die der SecYE β -Komplex bildet. Sie zeigt auch die zentrale Stellung der TMD 2a, die den Komplex zum Lumen des ER hin verschließt („Plug“). (Modelle aus (Rapoport, 2007), modifiziert)

Es zeigte sich, dass die zehn TMD des SecY in einem C- und einem N-terminalen Cluster organisiert sind (TMD 1-5 und TMD 6-10). Sie bilden zwei pseudosymmetrische Domänen, die über die zytosolische Schleife zwischen den TMD 5 und 6 wie mit einem Scharnier miteinander verbunden werden. Die SecE Untereinheit scheint hierbei eine Klammer zu bilden, welche die SecY Hälften an diesem Scharnier zusammen hält. Diese Anordnung der beiden Proteine wird als „Klappmuschel“ beschrieben, da sie an ihrem Rücken zusammen gehalten werden, auf der gegenüber liegenden Seite jedoch eine laterale Öffnung des Kanals hin zu den Membranlipiden möglich ist und so die Integration von Membranproteinen erlauben würde (Flower, 2007). Diese Beobachtung wird von dem Befund gestützt, dass die Signalsequenz eines sekretorischen Proteins in Photoquervernetzungsexperimenten gleichzeitig mit den TMD 2b und 7 und den Membranlipiden interagieren kann (Plath *et al.*, 1998).

Betrachtet man einen Schnitt durch den Kanal von der Membranebene aus, zeigt sich, dass das SecY um sechs hydrophobe Aminosäurereste herum eine sanduhrförmige Struktur aufweist (van den Berg *et al.*, 2004). Der durch diese Aminosäuren gebildete „Porenring“ wird durch einen Pfropfen („Plug“) verschlossen, welcher durch eine kurze Helix innerhalb der TMD 2a gebildet wird.

Die Bedeutung der „Plug“-Domäne für die strukturelle Integrität des Kanals konnte an Deletionsmutanten sowohl in *E. coli*, als auch in *S. cerevisiae* gezeigt werden (Junne *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Entgegen den Erwartungen waren diese Zellen lebensfähig, da hier andere Bereiche des SecY umgelagert werden, um einen neuen Pfropfen zu bilden und somit die Membranbarriere aufrecht zu erhalten. Erklären lässt sich dies Verhalten durch den nur geringen Konservierungsgrad der Aminosäuren im Bereich des „Plug“, der die große Plastizität dieses Bereiches der TMD 2 ermöglicht (van den Berg *et al.*, 2004). Mittlerweile konnte zudem *in silico* die Öffnung der Pore bei beginnender Translokation, die mit einer Weitung der Pore und einer Verlagerung des „Plug“ einhergeht, gezeigt werden (Gumbart und Schulten, 2006). Weitere biochemische Experimente stützen das Computermodell und können damit auch Hinweise auf die oligomere Struktur des Sec61-Komplexes in den jeweiligen Umgebungen geben (Cannon *et al.*, 2005; Maillard *et al.*, 2007; Tam *et al.*, 2005).

1.1.2.2 Die oligomere Struktur des Sec61-Komplexes

Bald nach der Identifizierung des Sec61-Komplexes als proteinleitende Pore in der ER-Membran wurden Untersuchungen über den oligomeren Zustand des Komplexes angestellt.

Hanein *et al.* konnten zeigen, dass sich in der ER-Membran von Säugerzellen ringförmige Strukturen ausbilden, die bei einem Durchmesser von 85-100 Å eine zentrale Ausstülpung von etwa 20 Å aufweisen und drei bis vier Sec61-Trimere beherbergen können (Hanein *et al.*, 1996). Diese durch Negativkontrastierung gewonnenen elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen konnten später durch kryoelektronenmikroskopische (Kryo-EM) Aufnahmen bestätigt werden. So zeigte sich bei der Bindung von Ribosomen an gereinigte solubilisierete Sec61-Komplexe aus der Hefe, dass zwei Sec61-Trimere einen oligomeren Komplex bilden (Beckmann *et al.*, 1997). In anschließenden Untersuchungen mit Sec61-Komplexen in nativen Membranen konnten vier Sec61-Trimere beobachtet werden, die ein Oligomer formen (Ménétrete *et al.*, 2005). Neue Kryo-EM Studien mit Sec61-Komplexen aus Säugern in Detergenzlösung zeigten wiederum, dass diese als Monomere an Ribosomen binden (Ménétrete *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnten auch erstmals elektronendichte Bereiche um den Sec61-Komplex als Phospholipide oder Detergenz identifiziert werden, die in vorherigen Studien noch als zusätzliche Kopien des Sec61-Komplexes erachtet wurden. Wie auch in der Arbeit von Ménétrete *et al.* (2005) diente hier die Kristallstruktur eines SecY β -Komplexes als Grundlage zur Modellierung des Sec61-Komplexes in die durch Kryo-EM erlangten Daten (Van den Berg *et al.*, 2004). Diese Methode wurde auch benutzt, um die Struktur eines SecYEG-Komplex aus *E. coli* zu bestimmen (Mitra *et al.*, 2005). Mitra *et al.* fanden in dieser Arbeit, dass zwei SecYEG-Trimere einen Komplex formen, der an ein translatierendes Ribosom bindet. Anders als in vorherigen Studien zeigte sich jedoch, dass die beiden Komplexe nicht mit den TMD 5 und 6, sondern mit den Öffnungen des Kanals zwischen den TMD 1 und 10 einander gegenüber stehen. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit auch ein einzelner SecYEG-Komplex beobachtet werden, der jedoch an der Austrittsstelle der mRNA mit dem Ribosom interagiert.

In biochemischen Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass SecYEG-Komplexe auch in Membranen Oligomere bilden. So konnte durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Messungen in Membranen gezeigt werden, dass zwei oder mehr SecYEG-Komplexe einen hochmolekularen Komplex bilden (Mori *et al.*, 2003; Scheuring *et al.*, 2005). In FRET-Studien wurde auch in Säugermembranen eine räumliche Nähe zwischen Sec61-Komplexen nachgewiesen (Snapp *et al.*, 2004). In Quervernetzungsexperimenten konnten zudem zwei Sec61-Komplexe über einen chemischen Linker vernetzt werden, was auf eine sehr geringe Distanz der Trimere in den Membranen hindeutet (Schaletzky und Rapoport, 2006). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen zeigten weiter, dass auch in nativen Membranen der Sec61-Komplex ein Oligomer aus vier Trimeren bildet (Kalies *et al.*, 2008). Während der Translokation bildet in diesen Komplexen ein

trimerer Komplex die proteinleitende Pore. Diese Befunde stimmen mit der Tatsache überein, dass der SecYE β -Komplex aus *M. jannaschii* in Detergenzlösung als trimerer Komplex kristallisiert wurde. Er besteht aus jeweils einem SecY, SecE und Sec β (Van den Berg *et al.*, 2004). Werden hingegen SecYEG-Komplexe aus *E. coli* in Membranen kristallisiert, zeigt sich, dass diese als Dimer vorliegen (Breyton *et al.*, 2002). Aufgrund dieser und weiterer biochemisch erlangter Befunde wird heute weithin davon ausgegangen, dass das ruhende bakterielle Translokon von einem SecYEG-Dimer gebildet wird (Duong, 2007). In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass während des Translokationsprozesses, abhängig von der Art des transportierten Substrates, der SecYEG-Komplex in unterschiedlichen oligomeren Zuständen vorliegt (Boy und Koch, 2009).

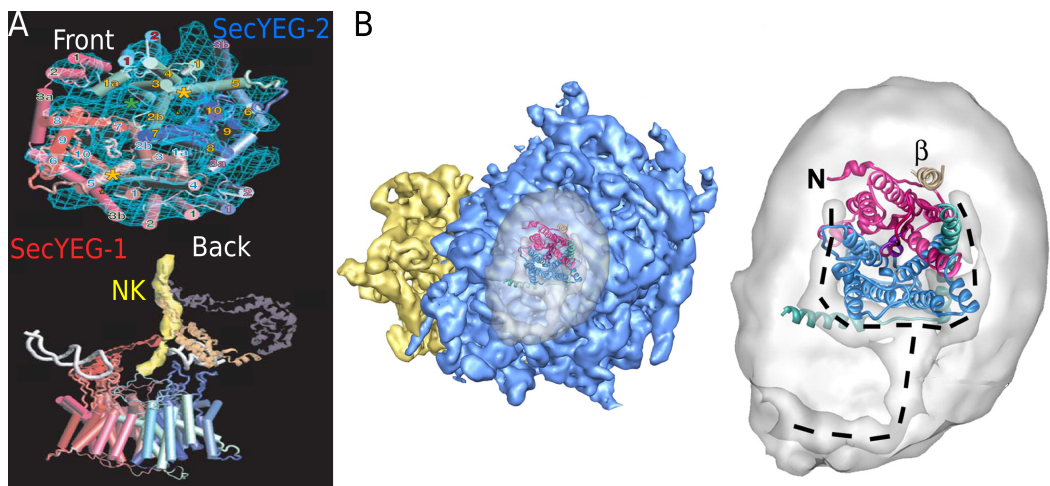


Abbildung 1.4: Widerstreitende Modelle zum oligomeren Zustand des Sec61-Komplexes

(A aus Mitra *et al.* 2005, B aus Ménétrét *et al.* 2008) Dargestellt sind die mit kryoelektronenmikroskopisch gewonnenen Daten ermittelten Modelle der Sec61-Komplexe aus *E. coli* und aus dem Säuger. Während Mitra *et al.* davon ausgehen, dass zwei SecYEG-Trimere einen Komplex bilden, postulieren Ménétrét *et al.*, dass nur ein trimerer Sec61-Komplex an ein Ribosom bindet.

A: Modell eines SecYEG-Dimers in der Zytoplasmamembran von *E. coli*. Gezeigt sind oben die beiden SecYEG-Komplexe in „front to front“ Orientierung (in rot und blau) vom Periplasma aus in Richtung des Ribosoms. Unten: Die selbe Anordnung der Komplexe um 90 Grad gedreht ermöglicht den Blick entlang der Membranebene (NK: naszierende Polypeptidkette).

B: Wie A jedoch ist hier die Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes in die Kryo-EM Struktur eines Sec61-Ribosom-Komplexes aus Säugern modelliert. Der Blick richtet sich aus dem Lumen des ER hinaus in Richtung des Ribosoms. In blau ist die große- in gelb die kleine Ribosomale Untereinheit dargestellt. In Grau sind diejenigen Bereiche dargestellt, die in älteren Strukturen noch als zusätzliche Sec61-Trimere identifiziert wurden, nun jedoch als Lipidreste oder Detergenz erkannt werden konnten. N: N-Terminus des Sec61 α ; β : Sec61 β

Zusammen genommen zeigen die Kryo-EM Studien, die durch FRET gewonnenen Daten und auch die biochemischen Befunde, dass der Sec61/SecYEG-Komplex in der Lage ist, in nativen Membranen Oligomere zu bilden. Diese Oligomere können Ribosomen binden (Kalies *et al.*, 2008). Werden die nativen Membranen jedoch zur Untersuchung der Struktur dieser Ribosomen-Sec61-Komplex-Einheiten solubilisiert, konnte beobachtet werden, dass auch ein einzelner Sec61-Komplex in der Lage ist Ribosomen zu binden. Strukturuntersuchungen ergaben auch, dass

wahrscheinlich ein einzelner Sec61-Komplex in der Lage ist, den proteinleitenden Kanal in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zu bilden. Es ist aber weiterhin unklar, ob in nativen Membranen während der cotranslationalen Translokation der Sec61/SecYEG-Komplex als einfaches Trimer, oder als Oligomer aus mehreren Trimeren vorliegt. Außerdem ist bisher unklar, wie sich die Bildung von Oligomeren auf die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex auswirkt.

1.1.3 INTERAKTION VON RIBOSOMEN MIT DER ER-MEMBRAN

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von gereinigten Membranen des rauen ER zeigten, dass dieses dicht mit membrangebundenen Ribosomen besetzt ist (Adelman *et al.*, 1973). Kurz danach konnte gezeigt werden, dass sowohl native, als auch vorher von Ribosomen befreite Mikrosomen in der Lage sind, erneut innerhalb von kurzer Zeit Ribosomen zu binden (Borgese *et al.*, 1974). Da die Bindung von Ribosomen an die ER-Membran durch die Vorbehandlung der Membranen mit Proteasen unterbunden wurde, war schon früh klar, dass der Interaktionspartner für die Ribosomen ein Protein war (Borgese *et al.*, 1974). Zunächst wurden Membranproteine wie die Ribophorine I und II (später identifiziert als Bestandteile des Oligosaccharyltransferase Komplexes), oder das p180 als Ribosomenrezeptor gehandelt (Kreibich *et al.*, 1978; Savitz *et al.*, 1990). Spätere biochemische Studien mit gereinigten in Proteoliposomen rekonstituierten Proteinen ergaben, dass der zuvor aus den ribosomenassoziierten Membranproteinen (RAMP) gereinigte Sec61-Komplex der primäre Ribosomenrezeptor in der ER-Membran ist (Kalies *et al.*, 1994).

Die Interaktion von Ribosomen mit dem Sec61-Komplex in Membranen ist unabhängig davon, ob die Ribosomen ein Protein translatieren oder frei von einer naszierenden Kette sind (Kalies *et al.*, 1994). Die Bindung wird auf ribosomaler Seite von der 28S rRNA der eukaryontischen Ribosomen vermittelt (Prinz *et al.*, 2000a). Das Sec61p bindet Ribosomen mit seinen zytoplasmatischen Bereichen, insbesondere über die Schleife zwischen den TMD 8 und 9 (Cheng *et al.*, 2005; Raden *et al.*, 2000). Diese biochemischen Befunde wurden durch hochauflösende Strukturuntersuchungen bekräftigt. In verschiedenen Kryo-EM Strukturen konnten mit zunehmend besserer Auflösung der erlangten Strukturen unterschiedliche Kontakte beobachtet werden. So wurden bei der Untersuchung von translatierenden Ribosomen, die an Sec61-Komplexe aus Hefe gebunden waren, vier Kontakte beobachtet. Diese Kontakte wurden sowohl von der rRNA, als auch durch ribosomale Proteine gebildet (Beckmann *et al.*, 2001). Spätere

Untersuchungen, die mit in Proteoliposomen rekonstituierten Sec61-Komplexen aus Säugern durchgeführt wurden, zeigten, dass das Ribosom sieben Kontaktpunkte mit einem Oligomer aus vier Sec61-Komplexen ausbildet (Ménéret *et al.*, 2005). Studien mit prokaryontischen Ribosomen, die an SecYEG-Komplexe gebunden wurden ergaben, dass ein translatierendes bakterielles Ribosom drei Verbindungen mit einem Dimer aus SecYEG-Komplexen ausbildet (Mitra *et al.*, 2005). Betrachtet man jedoch ein nichttranslatierendes Ribosom, so zeigt sich, dass zwar weiterhin die Verbindungen zwischen dem Ribosom und dem Translokationskomplex bestehen, dieser jedoch nur von einem SecYEG-Molekül gebildet wird (Ménéret *et al.*, 2007). In jüngsten Untersuchungen mit eukaryontischen Ribosomen-Sec61-Komplexen wurde beobachtet, dass nur ein Sec61-Komplex mit einem nichttranslatierenden Ribosom assoziiert. Durch eine höhere Auflösung der erlangten Kryo-EM Strukturen konnten Teile der an das Ribosomen gebundenen elektronendichten Strukturen als Detergenz identifiziert werden. In dieser Studie wurde auch beobachtet, dass nur noch ein Kontaktpunkt die Interaktion von Ribosom und Sec61-Komplex in inaktivem Zustand vermittelt (Ménéret *et al.*, 2008). So konnte gezeigt werden, dass die rRNA Helices H50, H6 und H7 eine Bindungstasche bilden und so die zytosolischen Schleifen des Sec61-Komplexes zwischen den TMD 6 und 7 bzw. 8 und 9 umschließen. Hierbei befindet sich die Schleife zwischen den TMD 6 und 7 nahe den Helices H6 und H7 und kann so mit beiden rRNA Bereichen wechselwirken. Die Schleife zwischen den TMD 8 und 9 wiederum kann mit den Helices H6 und H50 interagieren. Durch die höhere Auflösung der in dieser Arbeit gewonnenen Strukturen konnten auch die möglicherweise an der Bindung beteiligten ribosomalen Proteine genauer identifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Proteine L23ae, L35e und L29e der großen ribosomalen Untereinheit helfen, zusammen mit der rRNA eine Bindungstasche für die zytosolischen Schleifen des Sec61-Komplexes zu formen (Ménéret *et al.*, 2008). In jüngsten Arbeiten mit aktiv translatierenden Ribosomen und dem Ssh1-Komplex aus der Hefe *S. cerevisiae* wurden jedoch neben den oben beschriebenen Kontaktpunkten (C2, C4) zwei weitere Interaktionspunkte von Ribosom und dem zum Sec61-Komplex homologen Ssh1-Komplex beschrieben (Becker *et al.*, 2009). So konnten hier auch zwischen der rRNA Helix H59 und dem N-Terminus des Ssh1p (C1) und dem ribosomalen Protein rpL26, der Helix H24 und dem C-Terminus des Ssh1p (C3) mögliche Kontakte identifiziert werden. Somit wurden insgesamt wieder vier mögliche Interaktionspunkte beschrieben.

Neben den Untersuchungen, die versuchen die Struktur der Interaktion von Sec61-Komplex und Ribosom aufzulösen, wurden schon früh biochemische Studien zur Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex durchgeführt. Diese *in vitro* durchgeführten Flotationsuntersuchungen belegten, dass Ribosomen sowohl an vorher von Ribosomen befreiten Membranen (PK-RM), als auch an gereinigte Sec61-Komplexe innerhalb kurzer Zeit und mit nanomolarer Affinität binden (Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000a). So konnten im homologen System für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Säugern Dissoziationskonstanten von ca. 5 nM bestimmt werden (Kalies *et al.*, 1994). Für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus *S. cerevisiae* konnten sowohl im heterologen System mit Ribosomen von Membranen aus *Canis familiaris*, als auch mit zytosolischen Ribosomen aus der Hefe, Dissoziationskonstanten von etwa 15 nM ermittelt werden (Prinz *et al.*, 2000a). In diesen Arbeiten wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt, indem die Bindung von radioaktiv markierten Ribosomen an in Proteoliposomen

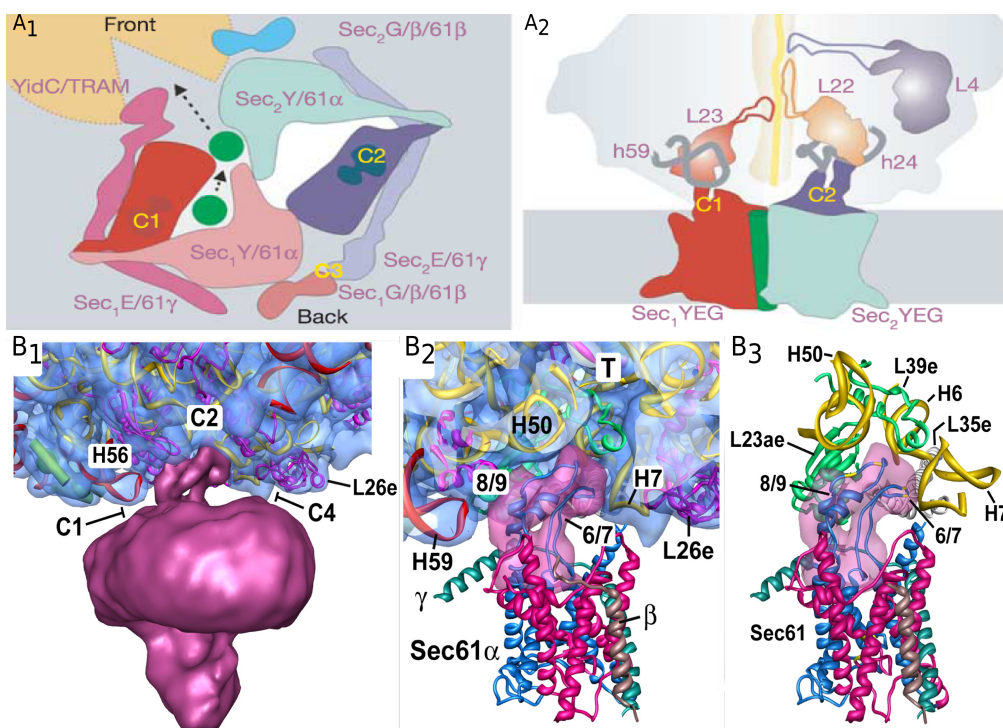


Abbildung 1.5: Interaktionspunkte des Sec61-Komplexes mit dem Ribosom

(A aus Mitra *et al.* 2005, B aus Ménétret *et al.* 2008) Dargestellt sind die mit kryoelektronenmikroskopisch gewonnenen Daten ermittelten Modelle der Sec61-Komplexe aus *E. coli* und aus dem Säuger. Während Mitra *et al.* davon ausgehen, dass die SecYEG-Trimere einen Komplex bilden, der drei Verbindungen (C1-C3) mit dem Ribosom eingeht, postulieren Ménétret *et al.*, dass nur ein trimerer Sec61-Komplex an ein Ribosom bindet.

A₁ und A₂: Grafisches Modell der beiden Komplexe in „front to front“ Orientierung. Die ribosomalen Proteine und rRNA-Helices, die an der Bindung von SecYEG-Komplex und Ribosom beteiligt sind, sind gekennzeichnet.

B: Wie A jedoch ist hier die Kristallstruktur des SecYEG-Komplex in die Kryo-EM Struktur eines Sec61-Ribosom-Komplexes aus Säugern modelliert. B₁: Raumfüllendes Modell der Verbindung von Sec61-Komplex und Ribosom entlang der Membranebene gesehen. Hier sind die ehemals als Kontaktstellen beschriebenen Bereiche C1 und C4 markiert, an denen sich in der höher auflösenden Struktur keine Verbindungen mehr identifizieren lassen. Nur noch im Bereich von C2 bildet der Sec61-Komplex eine Verbindung mit dem Ribosom aus. B₂ und B₃: Detaildarstellung der Verbindung von Sec61-Komplex und Ribosom. Es ist zu erkennen, dass die zytosolischen Bereiche zwischen den TMD 8 und 9 eine Protuberation hin zum Ribosom ausbilden. Die Bindungstasche im Ribosom wird durch die rRNA-Helices 6, 7 und 50 und die Proteine L23ae, L35e und L29e der großen ribosomalen Untereinheit gebildet.

integrierte Sec61-Komplexe verfolgt wurde. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich sowohl Aussagen über die Dissoziationskonstante, als auch über die Sättigung der Sec61-Komplexe mit Ribosomen treffen. Da die Analyse der Bindung jedoch erst nach dem Erreichen eines Gleichgewichts erfolgt, sind keine Aussagen über die Dynamik des Bindungsprozesses möglich. Um die durch die Flotationsassays gewonnenen Ergebnisse weiter zu untersuchen, wurde in einigen Arbeiten die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex auch in Detergenzlösung untersucht (Prinz *et al.*, 2000a). Mit Hilfe dieses Systems konnte auch gezeigt werden, dass der am posttranslationalen Transport beteiligte Sec-Komplex nicht in der Lage ist, Ribosomen aus *S. cerevisiae* zu binden (Prinz *et al.*, 2000a). Die so gewonnenen Befunde lassen aber nur qualitative Aussagen über die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex zu. Außerdem ist es mit den beiden genannten Methoden, nicht möglich Aussagen über ein mögliches Ablösen der Ribosomen vom Sec61-Komplex zu treffen.

Neben den Untersuchungen zur Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex konnte schon früh beobachtet werden, dass in rauen ER-Membranen von Säugern zusätzlich zu dem in den RAMP vorliegenden Sec61-Komplex auch eine ribosomenfreie zweite Population dieses Komplexes vorkommt (Görlich *et al.*, 1992b). In späteren Studien mit der Hefe *S. cerevisiae* konnte dann gezeigt werden, dass nur etwa ein Drittel des in solubilisierten Extrakten von ER-Membranen vorhandenen Sec61p an Ribosomen gebunden vorliegt (rSec61) (Panzner *et al.*, 1995). Bei der Untersuchung des freien Sec61p zeigte sich, dass wiederum etwa 30% des Proteins als nicht Ribosomen gebundener trimerer Sec61-Komplex vorliegt (fSec61). Weitere ca. 30% des Sec61p kommen im heptameren Sec-Komplex vor, der den posttranslationalen Transport katalysiert (Panzner *et al.*, 1995).

Im Jahre 2006 konnten Schaletzky und Rapoport zeigen, dass in mit Ribosomen vorgesättigten PK-RM etwa 30 % des Sec61 frei von Ribosomen sind. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die ribosomenfreien Sec61-Komplexe in PK-RM bevorzugt SRP-RNC binden und dass diese Komplexe in der ER-Membran möglicherweise als Dimer vorliegen. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Studie auch versucht das Ablösen der Ribosomen vom Sec61-Komplex zu untersuchen. Hierzu wurden radioaktiv markierte Ribosomen an zuvor von Ribosomen befreite Membranen gebunden und ihre Dissoziation verfolgt. Es zeigte sich, dass nach zwei Stunden noch mehr als 90 % der Ribosomen an die PK-RM gebunden waren (Schaletzky und Rapoport, 2006). In einer vorher durchgeführten qualitativen Untersuchung zur Dissoziation von Ribosomen konnte jedoch gezeigt werden, dass Ribosomen, die zuvor ein sekretorisches Protein translatierten, an der

Membran verbleiben und entweder erneut ein sekretorisches Protein translatieren können, oder sich bei der Assoziation mit einer zytosolischen mRNA von der ER-Membran ablösen (Potter und Nicchitta, 2000). In beiden hier vorgestellten Studien wurden ER-Membranen oder PK-RM eingesetzt. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem Sec61-Komplex weitere Membranproteine wie etwa das p180, für das unter nichtphysiologischen Bedingungen Ribosomenbindung gezeigt werden konnte (Savitz und Meyer, 1990; Kalies *et al.*, 1994; Morrow und Brodsky, 2001), die Ablösung der Ribosomen von der ER-Membran verhindern.

Es ist jedoch weiterhin unklar, ob Bestandteile des Sec-Komplex einen Einfluss auf die Ribosomenaffinität der Sec61-Komplexe haben und warum trotz der Vielzahl möglicher Interaktionspunkte zwischen dem Ribosom und dem Sec61-Komplex ein ribosomenfreier Sec61-Komplex in ER-Membranen beobachtet wurde.

1.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus der Hefe *S. cerevisiae* genauer charakterisiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in den Membranen des rauhen ER die Sec61-Komplexe sowohl an Ribosomen gebunden vorliegen (rSec61), als auch nicht mit Ribosomen assoziierte Sec61-Komplexe (fSec61) vorkommen. Im Gegensatz zur Bindung von Ribosomen an den rSec61-Komplex, wurde die Bindung von Ribosomen an die fSec61-Komplexe bisher nur wenig untersucht. Zur Analyse dieser Komplexe sollte zuerst ein Hefestamm hergestellt werden, aus dem sowohl der fSec61- als auch der rSec61-Komplex separat voneinander isoliert werden können. Zusätzlich sollte aus den solubilisierten Membranen dieses Hefestamms der fSec61-Komplex soweit wie möglich vom Sec-Komplex getrennt werden, um so etwaige Einflüsse des Sec-Komplexes, der nicht an der Ribosomenbindung beteiligt ist, auf die späteren Untersuchungen auszuschließen. Da jedoch weitere Interaktionspartner, welche die Ribosomenbindung der Sec61-Komplexe beeinflussen könnten, erhalten bleiben sollen, ist es notwendig die Komplexe aus den Membranen schonend und schnell anzureichern.

Im Anschluss an die Isolierung der Sec61-Komplexe, soll zunächst mit Hilfe von Flotationsassays untersucht werden, ob beide Populationen des Sec61-Komplexes in der Lage sind Ribosomen zu binden. Anschließend soll versucht werden, neben der Bindung auch das Ablösen der Ribosomen von den rSec61- und fSec61-Komplexen mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie (SPR) zu untersuchen. Zu diesem Zweck war es zuerst wichtig die Bindung beider Komplexe an Ribosomen in Detergenzlösung nachzuweisen. Der Nachweis sollte qualitativ durch die Sedimentation der Bindungsansätze im Sucrosegradienten erfolgen. Schließlich sollte mit Hilfe der SPR untersucht werden, ob sich die kinetischen Konstanten der Bindung und des AblöSENS von Ribosomen bestimmen lassen. Diese Methode bietet zudem erstmals die Möglichkeit diesen Vorgang auch in Echtzeit zu verfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 CHEMIKALIEN

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck KGaA, Sigma-Aldrich und Roth in p.a. Qualität bezogen.

2.1.2 BAKTERIENSTÄMME

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz und Herkunft
DH 5 α	<i>supE44; ΔlacU169 (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15); <i>hsdR17; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; relA1</i></i>	Hanahan (1983) Stratagene
XL1-Blue	<i>supE44; hsdR17; recA1; endA1; gyrA46; thi-1; lac; F'[proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987) Stratagene

2.1.3 HEFESTÄMME

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz und Herkunft
KY117	MATa <i>trp1-1; his3-Δ200; ura3-1; ade2-1; can1-100;</i> GAL	Struhl (1984)
YTX84	MAT α <i>Δssh1::K.l.LEU2</i> <i>his3-11, -15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1; ade2-1; can1-100</i>	Finke <i>et al.</i> (1996)

JD53-Sec62ProtA	MAT α SEC62-TEVPROA- <i>kanMX4</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>leu2-3,-112</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>trp1-Δ63</i> ; <i>ura3-52</i>	Johnson, unveröffentlicht
NJY145	MAT α SEC63-TEVPROA- <i>kanMX4</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>leu2-3,-112</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>trp1-Δ63</i> ; <i>ura3-52</i>	Wang und Johnson (2004)
YND5	MAT α SSS1-6xHA-K.l. <i>TRP1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>can1-100</i> ;	diese Arbeit
YND22	MAT α SSS1-6xHA-K.l. <i>TRP1</i> ; Δ <i>ssh1::K.l.LEU2</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>can1-100</i> ;	diese Arbeit
YAB1	MAT α SEC62-TEVPROA- <i>kanMX4</i> ; SSS1-6xHA-K.l. <i>TRP1</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>leu2-3,-112</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>trp1-Δ63</i> ; <i>ura3-52</i>	diese Arbeit
YAB2	MAT α SEC63-PROA- <i>kanMX4</i> ; SSS1-6xHA-K.l. <i>TRP1</i> ; Δ <i>ssh1::K.l.LEU2</i> ; <i>ura3-52,1</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ;	diese Arbeit

YUE04	haploid	diese Arbeit
	SEC62-TEVPROA- <i>kanMX4</i> ;	
	SEC63-PROA- <i>kanMX4</i> ;	
	SSS1-6xHA-K.l. <i>TRP1</i> ;	
	Δ <i>ssh1::K.l.LEU2</i> ;	
	<i>ura3-52,1</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ;	
	GAL	

2.1.4 PLASMIDE

Plasmid	Beschreibung	Referenz und Herkunft
pYM3	6fach Hämagglutinin (6HA-Tag); K.l. <i>TRP1</i> ; Ampicillin; für C-terminales Epitop-Tagging	Knop <i>et al.</i> (1999)

2.1.5 OLIGONUKLEOTIDE

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
sss1_tagging_sense	TAC GCC ATC AAG TTG ATT CAT ATT CCA ATC AGA TAC GTT ATT GTT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	upstream Primer für internes Tagging nach Gauss <i>et al.</i> (2005)
sss1_tagging_antisense	GGT TCT GGT GCC GTT GTT TTT ATT TTT TCT CGT CTT TTA TCT CTT ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	downstream Primer für internes Tagging nach Gauss <i>et al.</i> (2005)

2.1.6 ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Beschreibung / antigene Sequenz	Referenz / Herkunft
Primäre Antikörper		
α -HA	Influenza Hämagglutinin Protein (HA) YPYDVPDYA	Sigma-Aldrich
α -Sec61	Sec61p (C-Terminus) CLVPGFSDLM	Panzner <i>et al.</i> (1995)
α -Sec62	Sec62p (C-Terminus) CNKKKAINKEAEQN	Panzner <i>et al.</i> (1995)
α -Sec63	Sec63p gentechnisch hergestellt; rekombinantes C-terminales Fragment des Sec63p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; umfasst die AS 426-663	diese Arbeit
α -Sec72	Sec72p rekombinantes Protein	von C. Unger zur Verfügung gestellt
α -Sbh1	Sbh1p CPTPPGGQRTLQKRK	Panzner <i>et al.</i> (1995)
α -human Ribosomal pProtein	Humanes ribosomales pProtein	US Biological
Sekundäre Antikörper		
α -rabbit IgG (whole molecule)	Rabbit IgG, whole molecule; Meerrettich Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich
α -human IgG (whole molecule)	Human IgG whole molecule	Sigma-Aldrich

IRDye® 800 α -rabbit	IRDye® 800 konjugiertes α -rabbit IgG, whole molecule, fluoreszenzmarkiert	Rockland Immunochemicals
-----------------------------	---	--------------------------

Tertiäre Antikörper

α -Goat IgG (whole molecule)	Goat IgG, whole molecule; Meerrettich Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich
-------------------------------------	--	---------------

2.1.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben in ddH₂O angesetzt.

α -HA Elutionspuffer

100 mM Glycin/HCl (pH: 2,5), 1 % Digitonin

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz), sterilfiltriert

Blocking-Puffer

10 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBT

10 % (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS

Blotting-Puffer

25 mM Tris (pH: 8,8), 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Coomassie-Färbelösung

45,5 % (v/v) Methanol, 9,5 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R

5x DNA-Ladepuffer

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau gelöst in 1x TAE

1x DMD₀ Puffer (Digitoninpuffer mit Digitonin)

8 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β -Mercaptoethanol,
1 % Digitonin

1x DMD₁₀₀ Puffer

100 mM KOAc, 8 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 % Digitonin, 1/1000 Vol. PI-Mix

1x DMD₂₀₀ Puffer

200 mM KOAc, 8 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 % Digitonin, 1/1000 Vol. PI-Mix

1x DOD₁₅₀ Puffer (Digitoninpuffer ohne Digitonin)

150 mM KOAc, 8 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol

2x DOD₀ Puffer

16 mM Mg(OAc)₂, 100 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 20 % (v/v) Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

2x DOD₄₀₀ Puffer

800 mM KOAc, 16 mM Mg(OAc)₂, 100 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 20 % (v/v) Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

8x DOD₁₀₀-Puffer ohne HEPES/KOH

800 mM KOAc, 64 mM Mg(OAc)₂, 80 % (v/v) Glycerin, 40 mM β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris (pH: 8,8), 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Entfärbelösung

30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Geneticin (G418) Stammlösung

150 mg/ml Geneticin, sterilfiltriert

Gradienten-Puffer

50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 % Digitonin

5x Homogenisierungspuffer

250 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 50 % (v/v) Glycerin, 125 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 5 mM EDTA

1 mM DTT, 1 mM PMSF und 1/1000 Vol. PI-Mix wurden erst bei Herstellung des 2,5x, 1,25x oder 1x Puffers zugesetzt

Iodierungspuffer

25 mM Tris/HCl (pH: 7,5), 400 mM NaCl

LiOAc/TE-Lösung

100 mM LiOAc, 1x TE-Puffer

Frisch aus 1 M LiOAc-Stammlösung und 10x TE-Puffer angesetzt

Membranpuffer

50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 10 % (v/v) Glycerin, 2 mM DTT, 1/10000 Vol. PI-Mix

Novozympuffer

10 mg/ml Novozym und 50 nM DTT in SED-Puffer

10x PBS (Phosphate Buffered Saline)

10 mM KH₂PO₄, 1,37 mM NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 27 mM KCl (pH: 7,5)

Polyethylenglykol-Lösung (PEG-Lösung)

40 % (w/v) PEG 4000, 100 mM LiOAc, 1x TE-Puffer

Frisch aus 1 M LiOAc-Stammlösung, 50 % (w/v) PEG 4000-Stammlösung und 10x TE-Puffer angesetzt

PI-Mix (Proteaseinhibitoren-Mix)

10 mg/ml Leupeptin in ddH₂O, 10 mg/ml Aprotinin in ddH₂O, 4 mg/ml Chymostatin in DMSO, 0,5 mg/ml Pepstatin in DMSO

PK-RM Kissen Puffer

500 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 1,6 M Sucrose

2x POP (Puromycinpuffer ohne Puromycin)

1600 mM KOAc, 32 mM Mg(OAc)₂, 200 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 20 % (v/v) Glycerin, 10 mM DTT

Puffer A

150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 1 mM DTT, 250 mM Sucrose

Puffer A₀

150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 1 mM DTT

R₀ (Rekonstitutions-Puffer)

50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 16 % (v/v) Glycerin

R₄₀₀ (Rekonstitutions-Puffer 400 mM KOAc)

400 mM KOAc, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 16 % (v/v) Glycerin

R₁₀₀₀ (Rekonstitutions-Puffer 1000 mM KOAc)

1000 mM KOAc, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 16 % (v/v) Glycerin

Saponinpuffer

3,3 % Saponin, 1060 mM KOAc, 21 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5), 0,5 mM PMSE,
5 % Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1/2000 Vol. PI-Mix

2x SDS-Probenpuffer

125 mM Tris/HCl (pH: 6,8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 200 mM DTT, 0,02 % (w/v)
Bromphenolblau

SED-Puffer (Sorbitol-EDTA-Puffer)

1 M Sorbitol, 25 mM EDTA

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

2 M Tris/Acetat, 0,1 M EDTA, 5 % Eisessig, eingestellt auf pH: 8,5

10x TBT-Puffer (Tris-Buffered-Tween-Puffer)

500 mM Tris/HCl (pH: 7,5), 1,5 M NaCl, 1 % (v/v) Tween 20

10x TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

100 mM Tris/HCl (pH: 8,0), 10 mM EDTA

2.1.8 NÄHRMEDIEN ZUR ANZUCHT VON ZELLEN

2.1.8.1 Nährmedium für *Escherichia coli*

LB-Medium

1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

Feste Medien enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Agar.

Das Nährmedium wurde zum Sterilisieren für 20 min bei 120° C autoklaviert.

Ampicillin wurde bis zu einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben.

2.1.8.2 Nährmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Medien und Lösungen zur Kultivierung und Lagerung von Hefezellen wurden nach Sherman (2002) hergestellt.

YPD-Vollmedium (Yeast extract, Peptone, D-Glucose)

2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt

Feste Medien enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Agar. Zum Sterilisieren wurde das Medium für 20 min bei 120° C autoklaviert. Danach wurde die Kohlenhydratquelle in Form einer sterilfiltrierten 20 % (w/v) Glucoselösung bis zu einer Endkonzentration von 5 % (w/v) zugesetzt.

SD-Medium (Synthetic Drop-out)

0,67 % (w/v) yeast nitrogen base, 2 % (w/v) Glucose, alle Komponenten wurden sterilfiltriert.

SC-Selektionsmedium (synthetic complete)

Mit dem Zusatz bestimmter Supplines (sterilfiltriert) zum SD-Medium wurde SC-Medium hergestellt. Die komplette Mischung eines sogenannten *drop out mix* enthielt folgende Suppline mit den angegebenen Mengen/Liter Medium.

drop out mix:

20 mg/l Adeninsulfat	20 mg/l Uracil	30 mg/l L-Tyrosin	100 mg/l L-Leucin
20 mg/l L-Tryptophan	20 mg/l L-Methionin	30 mg/l L-Lysin HCl	150 mg/l L-Valin
20 mg/l L-Histidin HCl	50 mg/l L-Phenylalanin	100 mg/l L-Glutamat	200 mg/l L-Threonin
20 mg/l L-Arginin HCl	30 mg/l L-Isoleucin	100 mg/l L-Aspartat	400 mg/l L-Serin

Feste Medien enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Agar.

Die Komponente, auf deren Prototrophie selektiert wurde, wurde bei der Anzucht der Hefezellen weggelassen.

Bei Bedarf wurde dem Medium Geneticin bis zu einer Endkonzentration von 500 mg/l aus einer Stammlösung zugesetzt.

Sporulationsmedium

1 % (w/v) KOAc, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Agar

Das Medium wurde zum Sterilisieren für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Danach wurden 0,05 % (w/v) Glucose und das 0,25fache jener Menge an drop out mix zugesetzt, die im SC-Medium verwendet wird.

2.2 Methoden

2.2.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die allgemeinen molekularbiologischen Methoden wurden nach Sambrook und Russell (2001) ausgeführt. Die Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode von Cohen *et al.* (1972). Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse diente entweder das *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Mini-Präparation) von Macherey-Nagel oder das *JetStar Kit* (Midi-Präparation) der Firma Genome (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981). Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde der *NucleoSpin Extrakt II Kit* der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie *Klenow-Fragment* wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Die RNase (DNase frei), T4 Ligase und dNTPs lieferte Roche. Die rekombinante *Pfu* DNA-Polymerase stammte von Stratagene. Für die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA nach der Kettenabbruch-Methode kam der *SequiTherm EXEL™II DNA Sequencing Kit-LC (for 66 cm gels)* der Firma Epicentre zum Einsatz (Sanger *et al.*, 1977). Die Analyse der Sequenzreaktion erfolgte mit dem *Li-Cor-DNA-Sequencer* von MWG Biotech (Middendorf *et al.*, 1992).

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 Präparation von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Genomische DNA aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wurde nach Walter (2004) in Anlehnung an Holm *et al.* (Holm *et al.*, 1986) isoliert.

2.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation der Tagging-Module

Für die Amplifikation der Taggingmodule zum internen oder N-terminalen Epitop-Tagging wurde das *Expand High FidelityPLUS PCR System* (Roche) verwendet. Die eingesetzten Mengen, Zeiten und Temperaturen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers.

2.2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 Vermehrung von Bakterienzellen

Die verwendeten Bakterienstämme von *E. coli* wurden bei 37° C in LB-Medium vermehrt. Lag eine plasmidkodierte Ampicillinresistenz vor, wurde das Medium mit dem Antibiotikum komplettiert (Fehler: Referenz nicht gefunden). Flüssigkulturen wurden bei kleinem Volumen in Kulturröhrchen und bei größerem Volumen in Erlenmeyerkolben in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm angezogen. Die Zelldichte wurde mit einem Photometer (Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Biosciences) bei 590 nm gegen das unbeimpfte Medium bestimmt.

2.2.3.2 Kultivierung und Lagerung von Hefezellen

Alle *S. cerevisiae* Stämme wurden bei 30° C in YPD-Vollmedium oder in SD-Medium, das auf die entsprechende Prototrophie selektioniert, kultiviert. Bei Vorliegen einer *kanMX4*-Markerkassette wurde das entsprechende Medium mit dem Antibiotikum Geneticin komplettiert.

Das Wachstum der Hefen in Flüssigkultur wurde durch photometrische Bestimmung der Zelldichte bei einer Wellenlänge von 600nm gegen unbeimpftes Medium verfolgt.

Zur langfristigen Lagerung der Hefestämme wurden 40 % (v/v) Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 600 µl 80 % (v/v) steriles Glycerin mit 600 µl einer stationären Hefekultur vermischt. Die Glycerinkulturen wurden anschließend bei -80° C gelagert.

2.2.3.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit linearen DNA-Fragmenten

Die Transformation der Hefezellen basierte auf der Methode von Gauss *et al.* (Gauss *et al.*, 2005). Eine 25 ml Übernachtskultur der entsprechenden Hefezellen wurde verwendet, um 100 ml YPD-Vollmedium auf eine OD_{600} von 0,15 anzuimpfen. Diese Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bei 30° C kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 2500 rpm, Rotor S4180) geerntet und einmal mit 25 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml LiOAc/TE-Lösung aufgenommen und die Suspension erneut zentrifugiert (s.o.). Die Zellen wurden anschließend in 150 µl LiOAc/TE-Lösung, die 8 µl denaturierte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) enthielt, resuspendiert. Nun wurden 10 µl PCR-Produkt (Fehler: Referenz nicht gefunden) und 600 µl PEG-Lösung zugegeben und der Ansatz eine Minute durch Vortexen gemischt.

Darauf folgten zwei Temperaturschritte: Zunächst 15 min bei 30° C und dann 30 min bei 42° C unter ständigem Schütteln. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (30 sec, 10000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5417R) sedimentiert und in 200 µl sterilem ddH₂O resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 30° C kultiviert. Wurde eine *kanMX4*-Markerkassette transformiert, wurden die Zellen zunächst in 1 ml YPD-Vollmedium resuspendiert und für 2 Stunden bei 30° C im Thermomixer inkubiert, um die Expression des Markergens zu ermöglichen. Schließlich wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert, in 200 µl ddH₂O resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.3.4 Kreuzung, Sporulation und Tetradendisektion

Die Kreuzung zweier haploider Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp (MATa und MATα), die Sporulation des so erzeugten diploiden Stammes und die folgende Tetradendisektion erfolgten nach den von Walter (2004) beschriebenen Methoden.

2.2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.4.1 Zellfraktionierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zellfraktionierung von Hefezellen wurde wie von Walter (Walter, 2004) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden 100 ml Medium (SC-Medium oder Vollemedium) mit einer

Übernachtskultur des zu analysierenden Stammes inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,7 – 1,5 bei 30° C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen der OD_{600} wurden die Zellen sedimentiert, dreimal mit sterilem ddH₂O gewaschen und mit Hilfe von Glaskügelchen mechanisch aufgeschlossen. Nach dem Überführen des Totallysates in Eppendorf Reaktionsgefäße wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer durch eine Zentrifugation der Suspension für 10 min bei 4° C und 400 x g in einer Eppendorf Kühlzentrifuge (5417R) abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (30 min, 136000 x g, 4° C, Rotor TLA 55). Hierdurch wurden die Mikrosomen, in denen die Membranen des ER angereichert sind, vom Lysat getrennt. Das Membranpellet wurde in einem angemessenen Volumen Membranpuffer resuspendiert.

Ein Äquivalent aufgereinigter rauer Membranen aus dem Säuger ist nach Walter *et al.* (Walter *et al.* 1981) definiert als 1 µl einer Membransuspension mit einer $OD_{280} = 50$. Die in dieser Arbeit präparierten mikrosomalen Fraktionen aus *S. cerevisiae* wurden in Anlehnung an diese Definition normiert. Ein Aliquot der Membranen wurde für die photometrische Messung in 2 % (w/v) SDS verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

Für eine spätere Analyse der Zellfraktionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fehler: Referenz nicht gefunden) und Western Blotting (Fehler: Referenz nicht gefunden.) wurde ein Aliquot des Totallysates (TL) und der zytosolischen Fraktion (Zyt) und der Mikrosomen durch eine TCA-Behandlung (Fehler: Referenz nicht gefunden) gefällt.

2.2.4.2 Präparation von Membranen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Hefemikrosomen im präparativen Maßstab wurden aus einer 6 l Hefekultur in exponentiellem Wachstum gewonnen.

100 ml einer Vorkultur wurden verwendet, um 6 l YPD-Vollmedium auf eine Zelldichte von OD_{600} 0,05 anzuimpfen. Die Hefekultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600} \sim 4$ bei 30° C kultiviert und durch Zentrifugation geerntet (10 min, 8000 rpm, 4° C, Rotor JLA 8.100). Das Zellpellet wurde zweimal mit 500 ml sterilem ddH₂O gewaschen, in 100 ml 1,25x Homogenisierungspuffer resuspendiert und in eine Glasmühle überführt. Nach Zugabe von 100 ml 1x Homogenisierungspuffer wurden die Zellen unter ständigem Kühlen durch vier einminütige Läufe in der Glasmühle aufgeschlossen. Das Totallysat wurde mit 100 ml 1x Homogenisierungspuffer aus der Glasmühle gespült und für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert (4° C, Rotor JA 18). Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (15 min, 8000 rpm, 4° C, Rotor Type 45Ti). Aus dem so geklärten Lysat wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt

(35 min, 25000 rpm, 4° C, Rotor Type Ti 45) die Mikrosomen isoliert. Das Membranpellet wurde in etwa 20 ml Membranpuffer im Dounce-Homogenisator (auf Eis) resuspendiert. Der Überstand wurde zur Präparation von Ribosomen aus Zytosol verwahrt.

Die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde wie in Fehler: Referenz nicht gefunden beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3 Präparation von Ribosomen aus Zytosol von *Saccharomyces cerevisiae*

Ribosomen aus Zytosol 25 ml Hefezytosol wurden sedimentiert (110 min, 60000 rpm, Rotor Type 70Ti) und analog zu Mai (Mai, 2008) für 60 min bei 0° C und für 30 min bei 28° C im Wasserbad einer Puromycin/Hochsalz-Behandlung unterzogen. So behandelte Ribosomen wurden durch PK-RM Kissen Puffer sedimentiert (120 min 18° C, 120 min 4° C 80000 rpm, Rotor MLA 80). Das Pellet wurde in 1x DOD₁₅₀ resuspendiert.

Um freie Ribosomen von etwaigen Aggregaten, in die Untereinheiten zerfallenen und Mikrosomenresten zu trennen, wurden diese über einen 10 % - 40 % Sucrosegradienten in Puffer A₀ zentrifugiert (120 min 4° C, 40000 rpm, Rotor SW 40). Anschließend wurden 13 Fraktionen à 1 ml gesammelt und deren Nukleinsäuregehalt durch Vermessen im Photometer bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

Fraktionen, die intakte 80s Ribosomen enthielten, wurden vereinigt und mit 1 Vol. 50 mM HEPES/KOH (pH: 7,5) im Dounce-Homogenisator gründlich gemischt. Nach erfolgter Sedimentation (60 min, 100000 rpm, 4° C, Rotor TLA 100.3) wurden die Ribosomen ein weiteres Mal gewaschen (1x DOD₁₅₀, 30 min, 100000 rpm, 4° C, Rotor TLA 100.3) und schließlich in 1x DOD₁₅₀ resuspendiert und bei -80° C gelagert.

Die Konzentration der Ribosomen wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt. Die Messung erfolgte in 1 % SDS. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von eins einer Ribosomenmenge von einem pmol.

2.2.4.4 Präparation von Ribosomen aus rauen Membranen von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Präparation von Ribosomen aus rauen Membranen wurden Mikrosomen mit Puffer A auf eine Konzentration 1 eq/µl verdünnt und Puromycin/Hochsalz behandelt und wie in 2.2.4.3 beschrieben weiter isoliert. Konzentrationsbestimmung und Lagerung erfolgten wie oben beschrieben (2.2.4.3).

2.2.4.5 Radioaktive Markierung von Ribosomen

Ribosomen aus Zytosol wurden mit ^{125}I radioaktiv markiert. Die Iodierung wurde mit Pierce® pre-coated Iodination-Tubes analog zu den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 100 μCi Na^{125}I in einem pre-Coated Iodination Tube durch Oxidation an gekoppeltem Pierce® Iodination Reagent aktiviert. Anschließend wurden 500 μmol Ribosomen in Iodierungspuffer mit dem aktivierten Iod markiert. Nach 15 minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 mg/ml Tyrosin in Iodierungspuffer gestoppt.

Anschließend wurde freies ^{125}I durch Zentrifugation der Probe in einem Amicon-Ultra 4 Röhrchen von den Ribosomen getrennt.

Die in der Ultrafiltrationszelle verbliebene Probe wurde mit DOD_{150} auf 4 ml aufgefüllt und die Durchflüsse wurden im γ -Counter auf den Gehalt an verbliebener Radioaktivität untersucht. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis sich keine Aktivität mehr im Durchfluss befand.

Die so erhaltenen radioaktiv markierten Ribosomen wurden auf einen 10 %-40 % Sucrosegradienten geladen und sedimentiert. Sie unterschieden sich im Sedimentationsverhalten nicht von unmarkierten Ribosomen.

2.2.4.6 Differentielle Extraktion von Hefemembranen

Die Differentielle Extraktion von Hefemembranen wurde analog zu der von Panzner *et al.* (1995) beschriebenen Methode mit etwa 80000 eq rauhen Membranen durchgeführt.

Abweichend vom Protokoll wurden die Membranen zum Auflösen mit Digitonin auf eine Konzentration von 1 eq/ μl eingestellt.

Die abschließende Sedimentation der Puromycin/Hochsalz behandelten Ribosomen erfolgte durch eine 75 minütige Zentrifugation im MLA 80 Rotor (80000 rpm, 4° C).

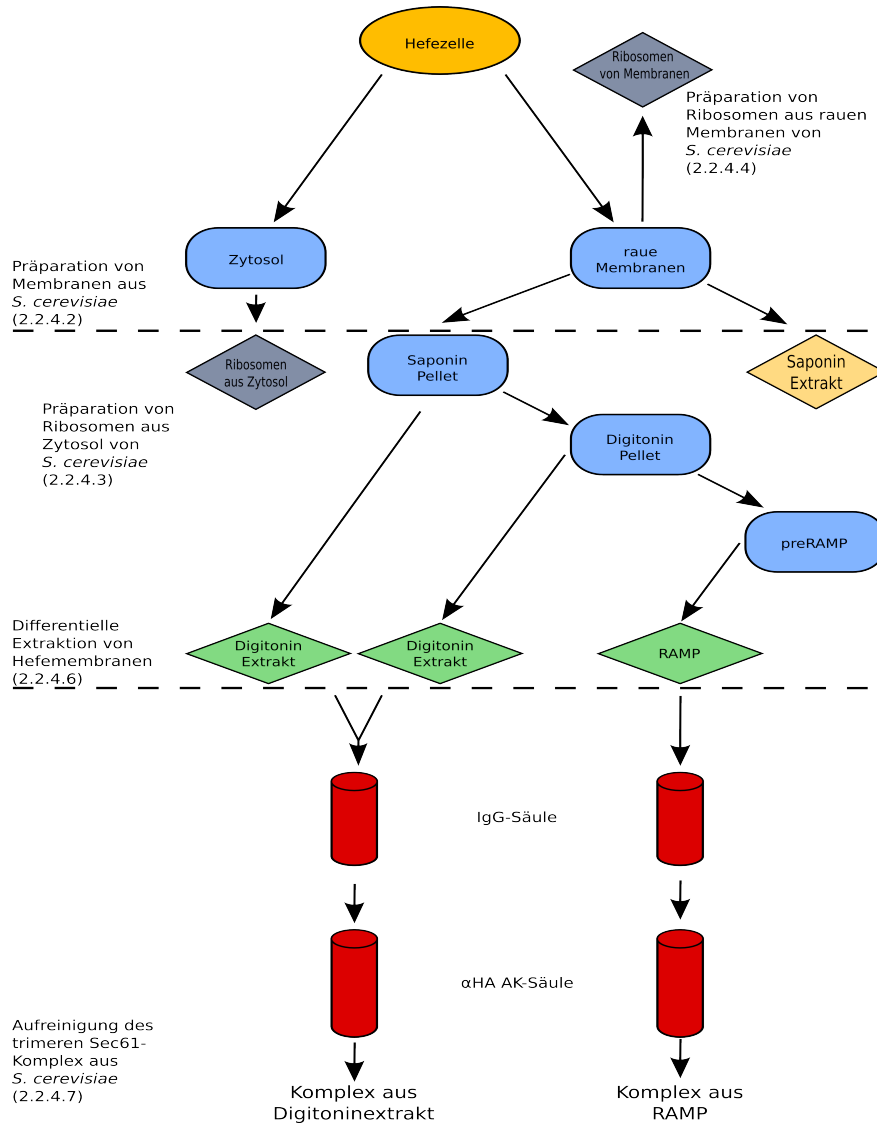


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Reinigungsprozesses der Sec61-Komplexe aus rauen Membranen der Hefe YUE04

Nach der Lyse der Hefezellen wurden zunächst die rauen Membranen isoliert. Aus diesen wurde nach drei Solubilisierungsschritten der Digitoninextrakt und die ribosomenassoziierten Membranproteine (RAMP) gewonnen. Anschließend erfolgte durch zwei affinitätschromatographische Schritte die Reinigung der Sec61-Komplexe. Angegeben ist jeweils die Abschnittsüberschrift zu den verwendeten Methoden. (α-HA AK-Säule: anti-Hämagglutinin Antikörper-Säule)

2.2.4.7 Anreicherung des trimeren Sec61-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt und aus der RAMP-Fraktion isoliert. Hierzu wurden jeweils unabhängig von einander zwei affinitätschromatographische Schritte durchgeführt. Um Kreuzkontaminationen zu verhindern, wurden jeweils zwei verschiedene Säulen für die einzelnen Reinigungsschritte genutzt.

Bei der Affinitätschromatographie nutzt man die spezifische Wechselwirkung zwischen dem am Säulenmaterial immobilisierten Stoff und dem in dem Proteingemisch enthaltenen Ligand aus. Bei den hier vorliegenden Versuchen wurde die Wechselwirkung zwischen ProteinA und IgG sowie dem HA-Epitop und α -HA Antikörper ausgenutzt.

2.2.4.7.1 Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose

Um zunächst den heptameren Sec-Komplex aus dem Digitoninextrakt und der RAMP-Fraktion (Fehler: Referenz nicht gefunden) zu entfernen, wurde dieser über die Bindung des Sec62pProtA und des Sec63pProtA an IgG-Sepharose aus den Extrakten depletiert.

Hierzu wurde eine Säule mit Fritte (Glass Econo-Column[®], Bio-Rad) mit 3 ml Säulenmaterial befüllt und mit 5 Säulenvolumen 1x DMD₄₀₀ Puffer equilibriert. Die RAMP-Fraktion wurde mit einem Volumen 1x DOD₀ Puffer auf eine Salzkonzentration von 400 mM KOAc eingestellt. Der Digitoninextrakt konnte direkt auf die Säule geladen werden. Die Proben wurden mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe (Amersham Bioscience) über Nacht bei einer Flussrate von 20 ml/h über die Säule zirkuliert. Die so erhaltenen Durchflüsse der Säulen wurden mit 1x DOD₀ auf eine Salzkonzentration vom 200 mM KOAc eingestellt und für die weitere Aufreinigung (Fehler: Referenz nicht gefunden) der trimeren Komplexe verwendet.

2.2.4.7.2 Affinitätschromatographie mittels α -HA-Agarosekonjugat

Der Durchfluss der IgG-Sepharose Säule wurde zur Aufreinigung des trimeren Sec61-Komplexes auf eine mit 2 ml α -HA-Agarosekonjugat befüllte und mit 5 Säulenvolumen 1x DMD₂₀₀ Puffer equilibrierte Säule (Glass Econo-Column[®], Bio-Rad) gegeben. Die Probe wurde über Nacht mehrfach im Kreislauf über die Säule gepumpt (4° C). Dann wurde die Säule mit zehn Säulenvolumen 1x DMD₂₀₀ Puffer gewaschen (4° C) und für 60 Minuten mit 15 Säulenvolumen α -HA-Elutionspuffer eluiert (RT). Die Elutionen wurde in Fraktionen à 1,5 ml in Eppendorf Reagiergefäßen aufgefangen. Zur sofortigen Neutralisierung des Eluats wurden in die Reagiergefäße 200 μ l 1 M HEPES/KOH (pH: 8,35) und 250 μ l 8x DOD₁₀₀ vorgelegt. Nach einem weiteren Waschschrift mit zehn Säulenvolumen 1x PBS/1 % Triton X-100 wurden 5 ml 1x PBS mit 0,05 % Natriumazid zur Lagerung auf die Säule gegeben.

2.2.4.8 Aufkonzentrierung der Eluate mit Amicon Ultra-15 Filtereinheiten

Nach der Elution von der α -HA Säule wurde der gereinigte Sec61-Komplex durch die wiederholte Zentrifugation der Probe durch den Cellulosefilter einer Amicon Ultra Filtereinheit aufkonzentriert. Hierdurch wurde auch das noch im Puffer vorhandene Glycin entfernt.

Je zwei Fraktionen, die den Sec61-Komplex enthielten, wurden vereinigt und mit 1x DOD₁₅₀ auf 15 ml aufgefüllt. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4000 x g wurde das Retentat mit zwei weiteren Fraktionen und 10 ml 1x DOD₁₅₀ aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Wiederholung dieser Schritte diente zur Konzentrierung aller Fraktionen, die den Sec61-Komplex enthielten auf ein Endvolumen von 0,2 – 1,5 ml.

2.2.4.9 Rekonstitution gereinigter Proteine in Liposomen

2.2.4.9.1 Lipidlösungen

Für die Rekonstitution der Sec61-Komplexe in künstliche Liposomen diente Leber Total Extrakt aus Rind (Avanti Polar Lipids).

Die in Chloroform vorliegenden Lipide wurden mit 10 % Deoxy BIGCHAP (in Methanol) und 1 M DTT auf ein Verhältnis von 2,7 % Deoxy BIGCHAP, und 9 mM DTT eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Zentrifugieren in der Speedvac (Univapo 150H, Airbus; UnijetII refrigerated Aspirator) entfernt. Die Pellets wurden in Ethanol resuspendiert und über Nacht erneut eingedampft. Zur weiteren Verwendung wurden die Lipide in 50 mM HEPES/KOH, 16 % (v/v) Glycerin auf eine Lipidkonzentration von 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, eine Detergenzkonzentration von 3 % Deoxy BIGCHAP und 10 mM DTT resuspendiert.

2.2.4.9.2 Rekonstitution von gereinigtem Sec61-Komplex in Proteoliposomen

Die Rekonstitution gereinigter Sec61-Komplexe erfolgte nach Görlich und Rapoport (1993). Für die Rekonstitution wurden 150 pmol gereinigter Sec61-Komplex mit 150 μg Lipid mit einem Festvolumen von 100 μl SM2-Biobeads in einem Reaktionsvolumen von 100 μl inkubiert. Nach einer ersten Inkubation von 4 Stunden bei 8° C und 1100 rpm wurde der Ansatz auf 100 μl frische Beads gegeben. Reste wurden mit 100 μl R₄₀₀-Puffer von den Beads gespült und mit der Probe vereinigt. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation wurde dieser Vorgang wiederholt und der Ansatz abschließend über Nacht inkubiert.

Rekonstituierte Proteoliposomen wurden am Folgetag durch eine einstündige Zentrifugation sedimentiert (70000 rpm, Rotor TLA 100.3 mit Adaptoren für Microzentrifugen Röhrrchen) und in

1x DOD₁₅₀ resuspendiert. Die inkorporierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalyse quantifiziert.

2.2.4.10 Bindungsexperimente

2.2.4.10.1 Bindung an in Lipidvesikel rekonstituierte Sec61-Komplexe

Für die Bindung von Ribosomen an Proteoliposomen wurden je 10 eq rekonstituierter Komplex in 30 µl 1xDOD₁₅₀ für 20 Minuten auf Eis und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen Ribosomen inkubiert. Jedem Bindungsansatz wurde zudem ein nmol radioaktiv markierter Ribosomen zugesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Versuchsansatz mit 240 µl 2,5 M Sucrose auf eine Sucrosekonzentration von > 2 M Sucrose eingestellt und unter ein 800 µl Trennkissen mit 1,6 M Sucrose in 1xDOD₁₅₀ geschichtet. Der Ansatz wurde mit 200 µl 1x DOD₁₅₀ überschichtet. Die Trennung der freien Ribosomen von den an die Proteoliposomen gebundenen erfolgte durch eine einstündige Zentrifugation bei 201078 x g im TLS 55 Rotor. Zur Analyse wurden die Ansätze in vier Teile fraktioniert. Die Aktivität der Fraktionen wurde im Wizard² Automatic Gamma Counter der Firma PerkinElmer bestimmt. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die Konzentration der gebundenen Ribosomen gegen die ungebundenen aufgetragen und eine nichtlineare Regression durchgeführt.

2.2.4.10.2 Bindungsexperimente in Lösung

Bindungen von Ribosomen an den Sec61-Komplex in Lösung wurden in 1x DMD₁₅₀ durchgeführt. Hierzu wurden 8 eq gereinigter Komplex mit 26,7 pmol Ribosomen (entspricht 0,5 µM Ribosomen) in 120 µl Gesamtvolumen für 20 min auf Eis und für 10 min bei RT inkubiert. Die Bindungsansätze wurden anschließend auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten (10 % - 40 % Sucrose in Gradientenpuffer) geladen. Die Trennung von gebundenen und ungebundenen Proteinen erfolgte durch Ultrazentrifugation (45 min, 55000 rpm, 4° C, Rotor TLS 55). Zur Analyse wurden 9 Fraktionen à 136 µl entweder direkt im Photometer bei 260/280 nm vermessen oder nach Fehler: Referenz nicht gefunden mit TCA präzipitiert. Die Analyse der Bindung erfolgte durch SDS-PAGE und quantitativen Western-Blot.

2.2.4.10.3 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)

Mit Hilfe der SPR Spektroskopie kann die Bindung zweier Moleküle in Echtzeit verfolgt werden. Alle wichtigen kinetischen Konstanten können so ermittelt werden. Eine gerichtete

Immobilisierung der trimeren Komplexe auf dem Sensorchip ist Voraussetzung für eine korrekte Messung.

Immobilisierung der Sec61-Komplexe auf dem Sensorchip

In dieser Arbeit wurde ein dreischichtiger Aufbau der Sensorchipoberfläche gewählt. Zunächst wurde ProteinA (Pierce) mit Hilfe der Aminkopplungsmethode nach Angaben des Herstellers kovalent auf einem C1 Chip immobilisiert:

- 7 min Aktivierung mit EDC/NHS 5 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Injektion des ProteinA 10 μl , 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 7 min Deaktivierung durch Ethanolamin, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$

In einer anschließenden einstündigen Injektion wurde der α -HA-Antikörper über seinen Fc-Teil an das ProteinA gebunden. Danach wurden 150 eq gereinigter Sec61-Komplex injiziert und an den Antikörper gebunden.

In eine Referenzzelle zur Messung des Leerwertes wurden statt des Sec61-Komplexes 100 μl BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) injiziert, um damit die unspezifische Bindung von Ribosomen an den Antikörper zu unterdrücken.

Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex

Zur Bestimmung kinetischer Konstanten im BIAcore System wird ein Analyt in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert und an den Liganden gebunden. Nach dem Ende der Injektion wird die Desorption des Analyts verfolgt.

Hierzu wurden Ribosomen in 1x DMD₁₅₀ Puffer bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den gebundenen Sec61-Komplex geleitet und die Änderung der relativen Resonanzen verfolgt. Die Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe der BIAeval Software.

2.2.5 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

2.2.5.1 Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure

Zur Fällung von Proteinen aus detergenzhaltigen Proben wurde Triton X-100 bis auf eine Endkonzentration von 2 % Triton X-100 hinzugefügt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde zusätzlich Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugegeben. Nach einer erneuten Inkubation für 15 Minuten auf Eis erfolgte die Sedimentation der präzipitierten Proteine (60 min, 4 °C, 15700 x g). Das Pellet wurde mit 900 μl

eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen und wieder zentrifugiert (30 min, 4 °C, 15700 x g, 5417R). Das so erhaltene Präzipitat wurde in 2x SDS-Probenpuffer bei 60° C für eine Stunde im Thermomixer gelöst.

2.2.5.2 Präzipitation von Proteinen mit Methanol und Chloroform

Enthielten Proben große Mengen an Detergenz, so wurden die enthaltenden Proteine quantitativ mit Chloroform und Methanol präzipitiert (Wessel und Flügge, 1984).

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ihrer Masse entsprechend können Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Zur Denaturierung wurden die zu analysierenden Proteinproben vor dem Auftragen für 10 min bei 60 °C im SDS-Probenpuffer (2fach; Fehler: Referenz nicht gefunden) erhitzt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 10 %-20 % SDS-haltige Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese wurde nach Laemmli durchgeführt.

2.2.5.4 Western Blot und Antikörperinkubation

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, verwendet man das sogenannte Western Blotting. Die Übertragung der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte durch Elektrotransfer mit dem semi dry System nach Walter (2004) (Kyhse-Andersen, 1984; Towbin *et al.*, 1979).

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Absättigung der unspezifischen Wechselwirkungen für mindestens 45 min in Blocking-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde der entsprechende primäre Antikörper (AK) gegen das Zielprotein über Nacht bei 4° C mit der Membran inkubiert. Nachdem die Membran mit 1x TBT gewaschen wurde, folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Nach erneutem Waschen mit 1x TBT, sowie destilliertem Wasser, erfolgte die Detektion der Proteine über die Fluoreszenz des sekundären Antikörper im Odyssey Imaging System. Sollten noch weitere Proteine immunochemisch detektiert werden, wiederholte sich der Ablauf ab dem Blocking.

Sollten ribosomale Proteine nachgewiesen werden, wurden die Membranen nach der Inkubation mit dem primären AK zunächst mit einem α -Human IgG geschwenkt. Der Nachweis dieses sekundären AK erfolgte dann mit Hilfe des tertiären α -Goat IgG. Beide Inkubationen

erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Die Detektion des tertiären AK erfolgte mit dem ECL-System der Firma Perkin Elmer. Die entstehende Chemolumineszenz wurde in der FujiFilm Intelligent Dark Box durch eine FujiFilm LAS-1000 CCD-Kamera detektiert.

2.2.5.5 Auswertung/Software

Die Auswertung und Quantifizierung von Proteinbanden in Immunoblots erfolgte mit Hilfe der Software *Advanced Image Data Analyzer* (AIDA), Version 3.52.046. Die Analyse der Sensorgramme der Bindung von Ribosomen an die Sec61-Komplexe im BIAcore erfolgte mit Hilfe des *BIAeval* Programms (GE Healthcare).

Zur Bestimmung der Bindungsisothermen und der Dissoziationskonstanten der untersuchten Bindungen wurde die nichtlineare Regressionsanalysefunktion der Software *GraphPad Prism* (GraphPad Software) genutzt.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das Ribosomenbindungsverhalten zweier unterschiedlicher Populationen des Sec61-Komplexes aus der Hefe zu untersuchen. Hierzu müssen diese zunächst aus den rauen Membranen eines Hefestammes angereichert werden. So soll der Sec61-Komplex zum Einen aus den ribosomenassoziierten Membranproteinen (RAMP) gewonnen werden, zum Anderen soll der Sec61-Komplex auch aus der ribosomenfreien Fraktion der aufgelösten Membranen (Digitoninextrakt) isoliert werden. Hierzu ist es nötig, eine neue Methode zur Isolierung der Sec61-Komplexe aus diesen beiden Membranfraktionen mit Hilfe zweier affinitätschromatographischer Schritte zu etablieren, mit Hilfe derer die Sec61-Komplexe schnell und schonend isoliert werden. Zu diesem Zweck soll das Sss1p im Wildtyp Hefestamm KY117 genomisch mit einem C-terminalen 6fach Hämagglutinin-Peptid-Tag (HA-Tag) versehen werden. Das Sss1p kommt als Bestandteil des Sec61-Komplexes sowohl in diesem Komplex, als auch im

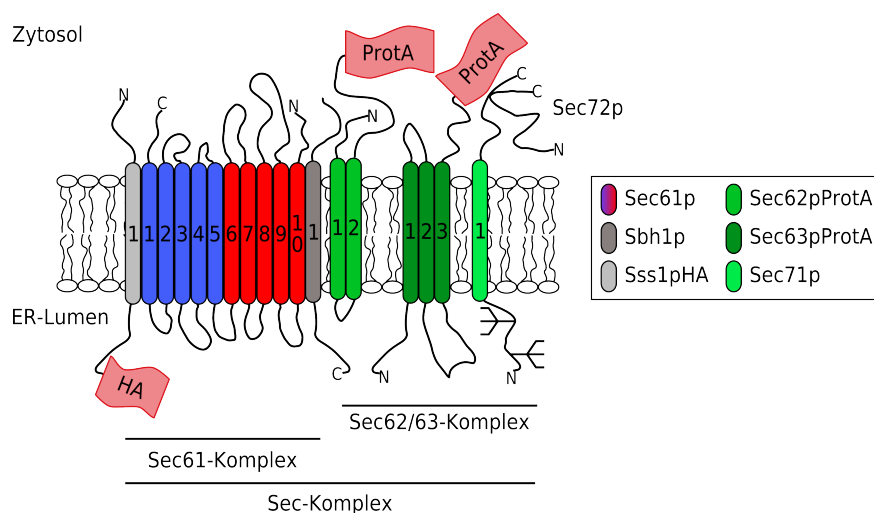


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Proteintags, die in den Sec61- bzw. den Sec-Komplex integriert werden sollen, um den Sec-Komplex gezielt zu depletieren

Zur vollständigen Entfernung des Sec62/63-Komplexes wurde je ein ProteinA-Tag an das Sec62p und an das Sec63p fusioniert. Zur späteren Reinigung des Sec61-Komplexes und zur Verankerung des Sec61-Komplexes auf dem BIAcore Sensorchip soll das Sss1p am C-Terminus mit einem HA-Peptid-Tag versehen werden.

Sec-Komplex, der durch den Sec61-Komplex zusammen mit dem Sec62/63-Komplex gebildet wird vor. Um die anschließenden Ribosomenbindungsexperimente nicht zu verfälschen, soll sicher gestellt werden, dass nur der Sec61-Komplex aus den solubilisierten Membranen gereinigt wird und dieser nicht durch Bestandteile des Sec-Komplexes verunreinigt wird, der zwar selber nicht an der Ribosomenbindung beteiligt ist, für dessen Derivat, den Sec'-Komplex aber eine Beteiligung am cotranslationalen Transport vermutet wird (Jermy *et al.*, 2005). Deswegen sollen zusätzlich zum bereits eingeführten HA-Tag, sowohl das Sec62p, als auch das Sec63p mit einem

ProteinA-Tag versehen werden. So können durch einen weiteren affinitätschromatographischen Schritt alle im Sec-Komplex gebunden vorkommende Proteine aus den aufgelösten Membranen depletiert werden. Nach der Reinigung der Sec61-Komplexe soll mit Hilfe des bereits etablierten Flotationsassays untersucht werden, ob beide Komplexe in der Lage sind Ribosomen zu binden. Im Anschluss soll mit zwei weiteren Methoden die Ribosomenbindung genauer charakterisiert werden. Zunächst soll durch Sedimentation in einem Sucrosegradienten untersucht werden, ob die gereinigten Sec61-Komplexe in der Lage sind in Digitoninlösung an Ribosomen zu binden, danach soll die Ribosomenbindung und die Ablösung der Ribosomen in Echtzeit mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie (SPR) im BIAcore System untersucht werden. Hier dient das zuvor in die Gensequenz integrierte Peptidtag dazu, die Sec61-Komplexe auf dem Sensorchip zu verankern.

3.1 Herstellung eines Hefestammes mit drei Protein-Tags

Da die Reinigung der Sec61-Komplexe aus den rauen Membranen über zwei affinitätschromatographische Schritte erfolgen sollte, musste zunächst ein Hefestamm hergestellt werden, bei dem das Sss1p mit einem 6fach HA-Tag versehen war. Zusätzlich sollten in diesem Stamm sowohl das Sec62p, als auch das Sec63p mit einem ProteinA-Tag ergänzt werden. Um eine stabile Expression der Fusionsproteine zu gewährleisten, sollten in die Genomsequenz der Hefe DNA-Sequenzen eingefügt werden, die für die Tags codieren.

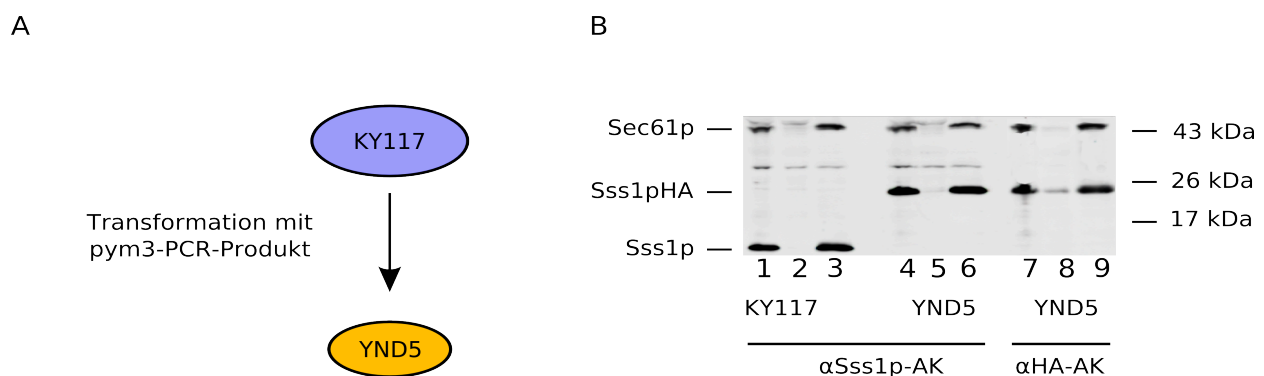


Abbildung 3.2: Herstellung eines Hefestammes mit einem genomisch kodierten Hämagglutinin-Tag am SSS1-Gen

(A) Zur Herstellung des Hefestammes YND5 wurde ein PCR-Produkt aus dem Tagging-Plasmid *pym3* in den Wildtypstamm KY117 transformiert. (B) Zur Kontrolle des korrekten Einbaus der Tagging Sequenz wurden die Zellen fraktioniert. Das gesamte Zelllysate (Bahnen 1, 4 und 7), der zellfreie Überstand (2, 5, 8) und die Mikrosomenfraktion (3, 6, 9) wurden im Western Blot analysiert. Die Inkubation des Western Blots erfolgte mit den spezifischen Antikörpern (AK) gegen das Sec61p, gegen das Sss1p und mit einem AK gegen das HA-Peptid. Das HA-Tag ist in der Mikrosomenfraktion nachweisbar und migriert im SDS-Gel auf der gleichen Höhe, wie das Sss1p, das auch über den spezifischen Antikörper gegen das Protein nachgewiesen wird.

Zu diesem Zweck wurde im Wildtypstamm KY117 zunächst das Sss1p mit dem Hämagglutinin-Tag ergänzt und so der Hefestamm YND5 generiert (Abb. 3.2). Zuerst wurde mit Hilfe einer PCR ein lineares DNA-Fragment generiert, das an seinen Flanken zwei benachbarte DNA-Sequenzen vom C-Terminus des *SSS1*-Gens trug. Zwischen diesen Sequenzen befand sich das 6fach HA-Tag und ein Markergen, welches das Wachstum der getagten Stämme auf Minimalmedium erlaubte. Dieses DNA-Fragment wurde in die Hefen transformiert (Abb. 3.2 A). Anschließend wurden Mikrosomen von Klonen, die in der Lage waren auf Minimalmedium zu wachsen, isoliert und im Western Blot auf das Vorhandensein des HA-Tags untersucht (Abb. 3.2 B). Hier konnte das Sss1p sowohl im Totallysat (Abb. 3.2 B, Bahnen 1 und 4), als auch in der Mikrosomenfraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.2 B, Lanes 3 und 6). Zusätzlich zeigte sich, dass im Vergleich zum Kontrollstamm (Abb. 3.2 B, Lanes 1-3, KY117) im Stamm YND5 das getagte Sss1pHA bei etwa 24 kDa migrierte und sowohl mit dem Antikörper gegen das Sss1p, als auch mit dem Antikörper gegen das HA-Peptid nachweisbar ist (Lanes 4 und 6, bzw. Lanes 7 und 9). Die Sequenzierung des *SSS1*-Genes des Hefestammes YND5 ergab zudem, dass die für das HA-Tag codierende Sequenz korrekt in die genomische DNA der Hefe eingefügt wurde (Daten nicht gezeigt).

In der ER-Membran der Hefe *S. cerevisiae* kommt mit dem Ssh1-Komplex ein weiterer zum Sec61-Komplex homologer trimerer Proteinkomplex vor, für den in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass dieser in der Lage ist, Ribosomen zu binden (Finke *et al.*, 1996). Aus diesem Grund musste in dieser Arbeit, in der die Sec61-Komplexe auch über ihre Ribosomenassoziation isoliert werden sollten, sichergestellt werden, dass der ribosomengebundene Ssh1-Komplex nicht mit dem Sec61-Komplex gereinigt wird. Hierzu wurde der Stamm YND5 mit dem Ssh1p *Knock out* Stamm YTX84 gekreuzt. Die so erzeugten diploiden Hefezellen wurden sporuliert und nach Tetradendissektion auf das Vorhandensein des *Knock out*-Markers und des Peptidtag-Markers analysiert. Die Membranen der selektionspositiven Sporen wurden zusätzlich im Western Blot auf das Vorhandensein des Sss1pHA und die Abwesenheit des Ssh1p untersucht (Daten nicht gezeigt).

Mit dem so erzeugten Stamm YND22 wurden dann durch Kreuzung mit jeweils einem Stamm, der ein ProteinA-Tag am Sec62p oder am Sec63p trug, die beiden Hefestämme YAB1 und YAB2 erzeugt (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden diese Hefestämme wiederum gekreuzt, um den Hefestamm YUE04 zu erzeugen, der sowohl am Sec62p, als auch Sec63p ein ProteinA-Tag trägt (Abb. 3.1). Zum Nachweis der Protein-Tags wurden aus allen erzeugten Stämmen nach den Kreuzungen Mikrosomen isoliert, die im Western Blot auf das Vorhandensein der Fusionsproteine hin untersucht wurden. Hierbei konnte das ProteinA-Tag am Sec62p und am Sec63p direkt mit

dem sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Dies ist möglich, da die IgG-Moleküle über ihren Fc-Teil an das ProteinA binden.

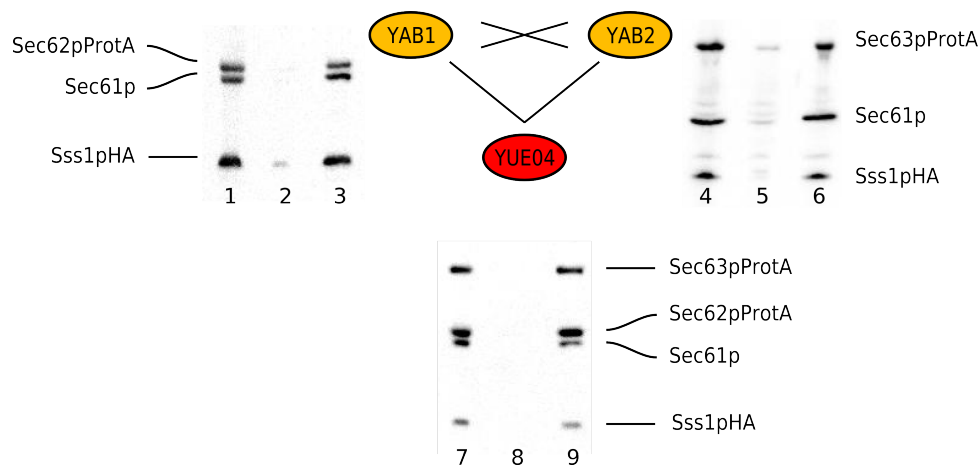


Abbildung 3.3: Durch der Kreuzung der Hefestämme YAB1 und YAB2 wird der dreifach getagte Stamm YUE04 erzeugt

Der Stamm YAB1 wurde mit dem Stamm YAB2 gekreuzt. Der resultierende diploide Stamm wurde sporuliert, die haploiden Sporen wurden auf das Vorhandensein des HA- und des ProteinA-Tags untersucht. Die Zellen des Stammes YUE04 wurden fraktioniert. Das gesamte Zelllysate (Bahnen 1, 4 und 7), der zellfreie Überstand (2, 5 und 8) und die Mikrosomenfraktion (3, 6 und 9) wurden im Western Blot analysiert. Alle Tags sind in der Membranfraktion nachweisbar. Die Western Blots wurden mit den AK gegen das Sec61p und gegen das HA-Peptid inkubiert. Der Nachweis des ProteinA-Tags erfolgte jeweils direkt über den sekundären Antikörper (siehe Text).

Nach der Herstellung des Hefestammes YUE04 wurde nun zunächst untersucht, ob sich die nachweisbaren Bestandteile des Sec62/63-Komplexes möglichst vollständig aus den solubilisierten Membranen entfernen ließen. Hierzu wurden raue Membranen isoliert und mit Hilfe von Digitonin aufgelöst. Etwaige Aggregate und nicht vollständig aufgelöste Membranen wurden sedimentiert, der Extrakt anschließend an IgG-Sepharose inkubiert und schließlich im Western Blot auf den Restgehalt an Sec62pProtA, Sec63pProtA und Sec72p untersucht. Es zeigte sich, dass aus diesen Membranen die Proteine, die spezifisch für den Sec62/63-Komplex sind, auf ein Niveau von unter zehn Prozent reduziert werden konnten (Abb. 3.4 Überstand Depletion). Betrachtet man die Proteine, die sowohl im Sec61-Komplex, als auch im Sec-Komplex vorkommen (Sec61p, Sss1pHA), so zeigt sich, dass diese Proteine nur zu etwa einem Drittel durch die Inkubation mit der IgG-Sepahrose entfernt werden. Dies Ergebnis befindet sich im Einklang mit den Befunden von Panzner *et al.* (Panzner *et al.* 1995) die beobachtet haben, dass etwa 30% des Sec61 im Sec-Komplex gebunden vorliegt.

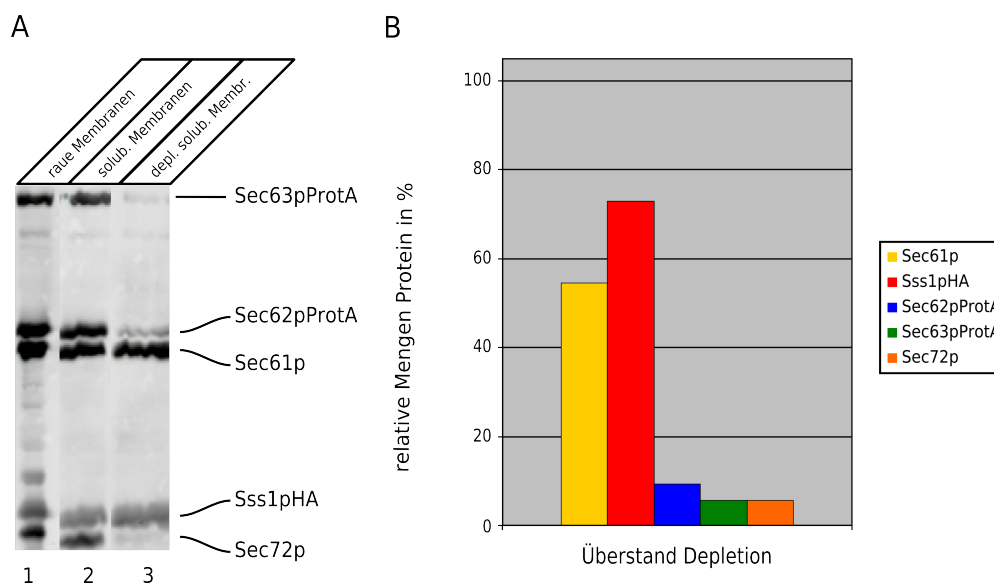


Abbildung 3.4: Depletion des heptameren Komplexes aus YUE04

(A) Raue Membranen des Hefestamms YUE04 wurden aufgelöst. Nicht aufgelöste Membranen und Aggregate wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde über Nacht mit IgG-Sepharose inkubiert. Die Depletion der Proteine des heptameren Komplexes wurde im Western Blot analysiert. Zur Bestimmung der Menge der detektierten Proteine wurden jeweils gleiche Anteile der Probe eingesetzt. (B) Grafische Darstellung der Depletion der Proteine aus solubilisierten Membranen. Dargestellt ist die verbliebene Menge der Proteine des Sec-Komplexes in depletierten solubilisierten Membranen im Vergleich zu den solubilisierten Membranen. Die Western Blots wurden mit dem spezifischen AK gegen das Sec61p, das Sec72p und gegen das HA-Peptid inkubiert. Das ProteinA-Tag wurde jeweils über die Bindung des Fc-Teil der AK an das ProteinA nachgewiesen.

Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung des ProteinA-Tags an die IgG-Sepharosematrix diente in diesen Versuchen der YND22 Stamm, der nur das HA-Tag trägt. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt ist bindet keines der untersuchten Proteine des heptameren Komplexes an IgG-Sepharose.

Die so erbrachten Befunde zur Depletion des Sec-Komplexes aus aufgelösten Membranen verschiedener Hefestämme zeigten, dass nur im Hefestamm YUE04 die nachweisbaren Komponenten des Sec62/63-Komplexes nach der Inkubation mit IgG-Sepharose in ausreichendem Maße aus aufgelösten Membranen entfernt wurden. Außerdem ist die Interaktion der getaggen Proteine insofern spezifisch, als dass es zu keiner Interaktion der ungetaggen Proteine mit der IgG-Sepharose kommt.

Somit konnte die Isolierung des Sec61-Komplexes aus Digitoninextrakt und aus den ribosomen-assoziierten Proteinen aus Membranen des Stamms YUE04 durchgeführt werden. Durch das gleichfalls inkorporierte HA-Tag war zusätzlich eine spezifische Bindung an eine α HA-Matrix möglich. Das HA-Tag sollte zudem zur gerichteten Immobilisierung der Proteinkomplexe an einem BIAcore Sensorchip dienen.

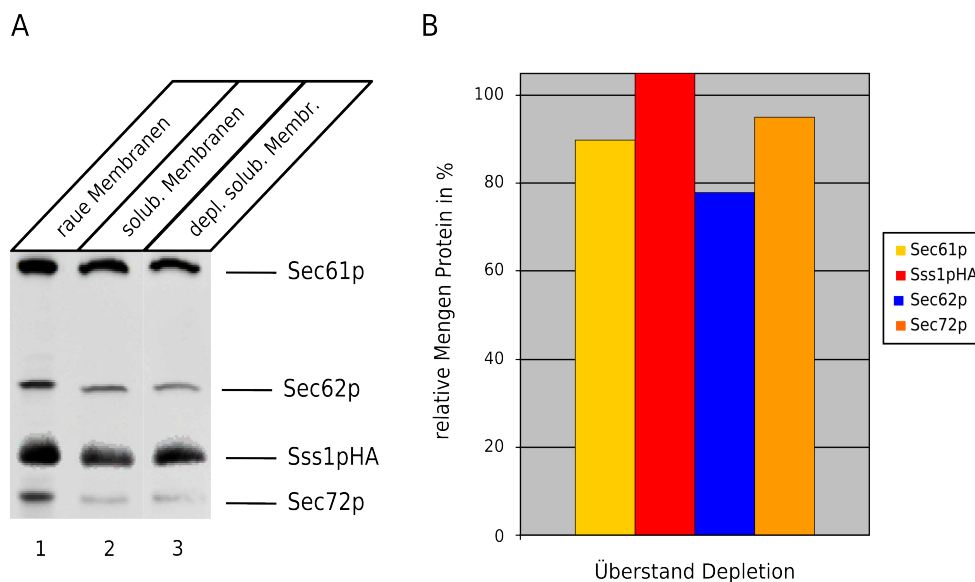


Abbildung 3.5: Der Sec-Komplex aus YND22 wird bei der Inkubation von solubilisierten Membranen mit IgG-Sepharose nicht depletiert

(A) Raue Membranen des Hefestamms YND22 wurden aufgelöst. Nicht aufgelöste Membranen und Aggregate wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde über Nacht mit IgG-Sepharose inkubiert. Die Depletion der Proteine des heptameren Komplexes wurde im Western Blot analysiert. Zur Bestimmung der Menge der detektierten Proteine wurden jeweils gleiche Anteile der Probe eingesetzt. (B) Grafische Darstellung der Depletion der Proteine aus solubilisierten Membranen. Dargestellt ist die verbliebene Menge der Proteine des Sec-Komplexes in depletierten solubilisierten Membranen im Vergleich zu den solubilisierten Membranen. Die Western Blots wurden mit dem spezifischen AK gegen das Sec61p, das Sec62p, das Sec72p und gegen das HA-Peptid inkubiert.

3.2 Nach der vollständigen Depletion des Sec-Komplexes befinden sich zwei Populationen von Sec61-Komplexen in rauen Membranen von YUE04.

Nachdem ein Hefestamm hergestellt wurde, aus dem der Sec-Komplex durch Inkubation mit IgG-Sepharose nahezu vollständig entfernt werden kann, wurde untersucht, ob sich in rauen Membranen dieses Stammes aus denen zuvor der Sec-Komplex entfernt wurden, zwei Populationen des Sec61-Komplexes befinden.

Hierzu wurden Membranen der Hefestämme YND22 und YUE04 in digitoninhaltigem Puffer aufgelöst und mit IgG-Sepharose über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand dieser Inkubation auf einen 10 % - 40 % igen Sucrosegradienten geschichtet. Nach einstündiger Zentrifugation wurde die Probe in neun Fraktionen geteilt und die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und die Verteilung der Proteine

des Sec61-Komplexes untersucht. Die Verteilung der Ribosomen wurde durch die Absorption der RNA bei 260 nm im Photometer bestimmt.

In Abbildung 3.6 ist die Verteilung der Proteine im Western Blot gezeigt und die prozentuale Distribution in Bezug auf die Gesamtmenge des detektierten Sec61p und der Gesamtabsorption der Proben bei 260 nm aufgetragen. Es zeigte sich, dass sowohl im isogenen Wildtypstamm YND22, als auch im Hefestamm YUE04 die Proteine des Sec61-Komplexes in drei Bereichen konzentriert sind. So bildet der nicht an Ribosomen gebundene freie Anteil des gesamten Sec61p das Maximum in den Fraktionen eins und zwei. Im isogenen Wildtypstamm YND22 ist vergleichsweise mehr Sec61p in den oberen Fraktionen zu detektieren (ca. 50 % im Wildtyp; ca. 40 % in YUE04). Da in diesem Stamm der heptamere Komplex durch die Inkubation mit der IgG-Sepharose nicht depletiert wird, deutet dies darauf hin, dass hier das Sec61p auch im Sec-Komplex gebunden vorliegen kann, der nicht an der Ribosomenbindung beteiligt ist.

In den Fraktionen fünf und sechs konzentrieren sich die 80s Ribosomen und der daran gebundene Anteil des Gesamt-Sec61p. Dies bedeutet, dass zusätzlich zu den nicht ribosomenassoziierten Sec61- und Sec-Komplexen in den oberen Fraktionen in den Membranen des Stammes YND22 etwa 20 % des Sec61p mit den Ribosomen sedimentieren. Im Gegensatz hierzu kommen in solubilisierten und vom Sec-Komplex befreiten Membranen des Stammes YUE04 etwa 26 % des Sec61p an die Ribosomen gebunden vor. Das dritte Maximum wird in der

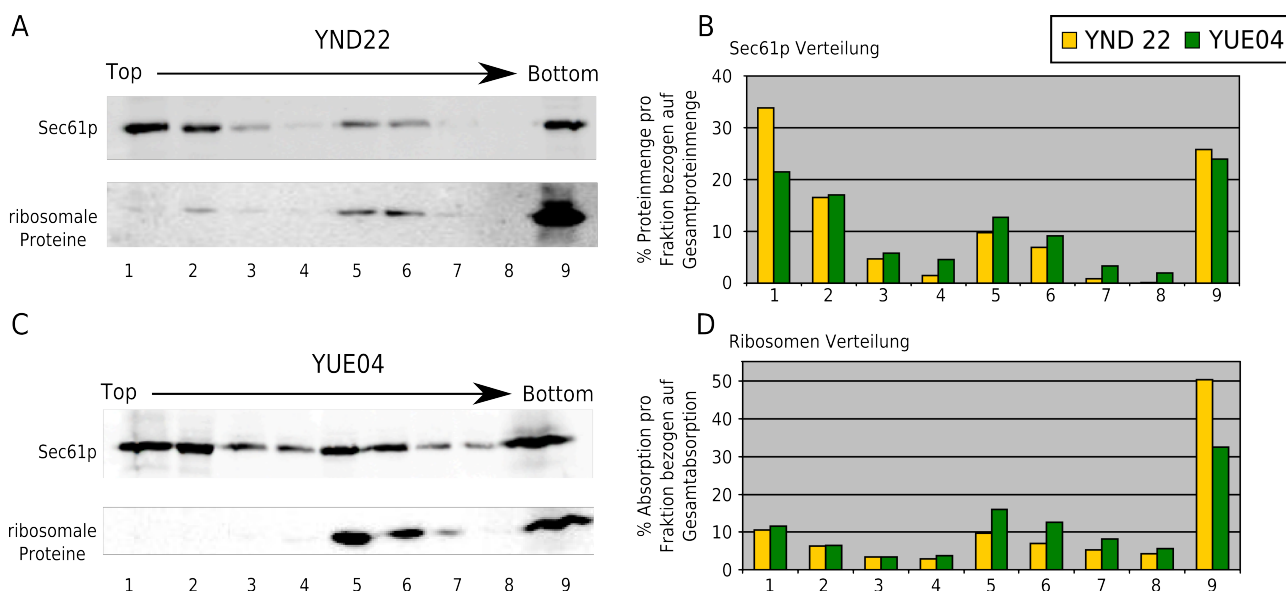


Abbildung 3.6: In Membranen des Hefestamm YUE04 kommt der Sec61-Komplex in zwei Populationen vor
 Membranen aus den Hefestämmen YND22 und YUE04 wurden isoliert und mit 2,5 % Digitonin solubilisiert. Nicht aufgelöste Membranen wurden sedimentiert und der Überstand wurde über Nacht mit IgG-Sepharose inkubiert. 8 eq des IgG-Überstand wurden auf einen 10 % - 40 % Sucrosegradienten geladen und sedimentiert. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurden jeweils 40 % der Fraktion in einem SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Western Blotting mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Verteilung der Ribosomen wurde zusätzlich über die Absorption bei 260 nm analysiert.

Fraktion neun von Protein- und Ribosomenaggregaten gebildet. Diese haben sich nach der im Anschluss an das Auflösen der Membranen erfolgten Sedimentation von nicht solubilisierten Mikrosomen gebildet und konnten somit durch den gesamten Gradienten migrieren.

Wird die Verteilung der Komponenten des Sec62/63-Komplexes untersucht, zeigt sich, dass sich diese Proteine zu einem Großteil in den Fraktionen eins und zwei konzentrieren (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die in diesem Experiment beobachtete Verteilung des Sec61- und des Sec-Komplexes in den solubilisierten Membranen der Stämme YND22 und YUE04, so ergibt sich in beiden getesteten Hefestämmen eine gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Werten (Panzner *et al.*, 1995).

3.3 Aus rauen Membranen von YUE04 können beide Populationen des Sec61-Komplexes schonend angereichert werden

Ziel dieser Arbeit war es, die zwei verschiedenen Populationen des Sec61-Komplexes, die in solubilisierten rauen Membranen des Hefestamm YUE04 beobachtet wurden, auf ihre Ribosomenbindung hin zu untersuchen. Hierfür ist es notwendig, die Komplexe separat voneinander aus den Membranen schonend anzureichern. Hierzu wurden die Sec61-Komplexe nach dem Auflösen der Membranen über zwei affinitätschromatographische Schritte isoliert. Zunächst jedoch musste der digitoninlösliche freie Sec61-Komplex (fSec61) vom ribosomengebundenen Sec61-Komplex (rSec61) getrennt werden. Dies geschah analog zu der von Panzner *et al.* (1995) beschriebenen differentiellen Extraktion von Hefemembranen. Hierzu werden die zuvor isolierten rauen Hefemembranen zunächst mit Hilfe von Saponin unter Hochsalzbedingungen perforiert und die luminalen ER-Bestandteile durch die folgende Sedimentation der noch intakten Membranen abgetrennt. Anschließend werden die Membranen durch zwei aufeinander folgende Extraktionsschritte mit Digitonin solubilisiert. Nach jedem Solubilisierungsschritt werden die an Ribosomen gebundenen Proteine sedimentiert. Durch diese Prozedur wird der rSec61-Komplex, von den fSec61-Komplexen und dem Sec-Komplex getrennt. Um den rSec61-Komplex von den Ribosomen abzulösen, wird eine Puromycin/Hochsalz-Behandlung durchgeführt, die Ribosomen werden anschließend pelletiert und der Sec61-Komplex steht für eine weitergehende Aufreinigung zu Verfügung (Panzner *et al.*, 1995).

3.3.1 DER FREIE SEC61-KOMPLEX KANN AUS DEM DIGITONINEXTRAKT ANGEREICHERT WERDEN

Die Reinigung der fSec61-Komplexe erfolgte durch zwei aufeinander folgende affinitätschromatographische Schritte. Zunächst wurden die verbliebenen Bestandteile des Sec62/63-

Komplexes durch die Bindung der ProteinA-Tags an IgG-Sepharose depletiert. Im Anschluss wurde dann der Durchfluss der ersten Säule über eine α -HA-Säulenmatrix geleitet, um den Sec61-Komplex über das modifizierte Sss1pHA aus dem Extrakt zu isolieren. Abschließend wurden die von der α -HA-Matrix eluierten Proteine mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationseinheit aufkonzentriert und analysiert.

In Abbildung 3.3 ist der Verlauf einer Reinigung im Western Blot dargestellt. Nach dem Auflösen von etwa 80000 Äquivalenten (eq) (Walter *et al.*, 1981) rauer Membranen, wurden zuerst die Bestandteile des Sec-Komplexes durch Chromatographie an IgG-Sepharose aus dem

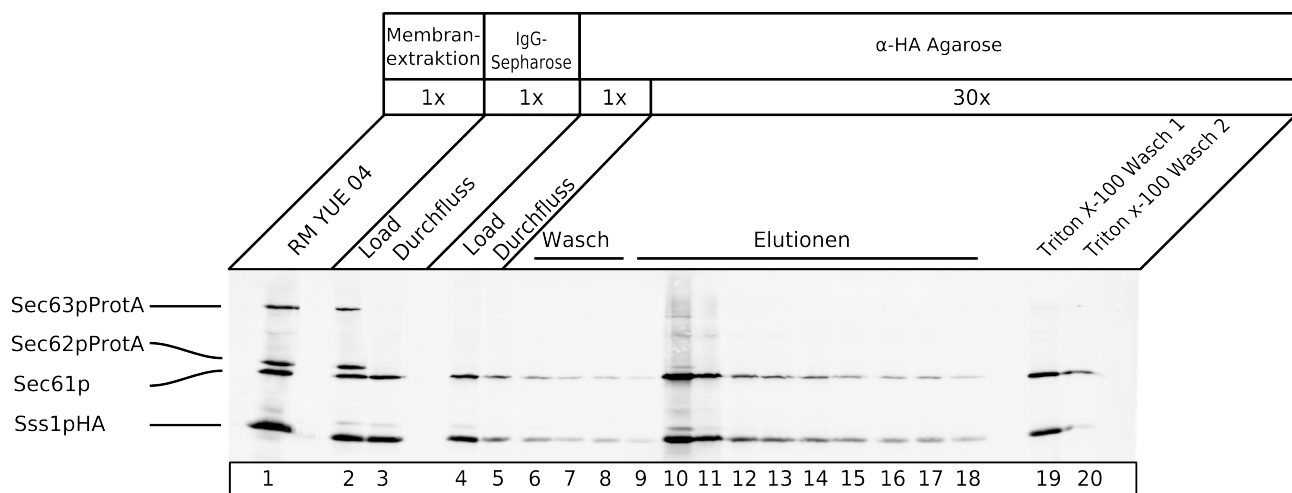


Abbildung 3.7: Isolierung des Sec61-Komplexes aus Digitoninextrakt

Etwa 80000 eq raue Membranen wurden zunächst mit Digitonin aufgelöst und wie oben beschrieben extrahiert. Der Digitoninextrakt (Lane 2) wurde dann über Nacht an IgG-Sepharose chromatographiert und der Sec-Komplex wurde über seine getagten Bestandteile (Sec62pProtA/Sec63pProtA) depletiert (vgl. Lanes 2 und 3). Die Aufreinigung des Sec61-Komplexes erfolgte an α -HA-Agarose. Das Sss1pHA und mit dem Protein auch der Sec61-Komplex aus dem Durchfluss der IgG-Sepharose Säule wurde über Nacht an die Matrix gebunden (Lanes 4-5). Nach drei Waschschrritten mit DMD₁₀₀ (Lanes 6-8) erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 100 mM Glycin/HCl in 1 % Digitonin. Zur sofortigen Neutralisation des Eluates wurde es in 1 M HEPES (pH: 8,35) aufgenommen und der pH-Wert kontrolliert. Nicht eluierte Proteine wurden abschließend mit 1 % Triton X-100 in PBS von der Säule gewaschen. Die Proben wurden zur Analyse auf ein 10 % - 20 % SDS-Gel geladen und mit den entsprechenden Antikörpern nach dem Western Blotting inkubiert. Die ProteinA-Tags wurden jeweils direkt über den sekundären Antikörper nachgewiesen.

Membranlysat depletiert. Die hohe Affinität des IgG für den ProteinA-Tag des chromosomal modifizierten Sec62pProtA und des Sec63pProtA führten zu einer ca. 95 % Reduktion dieser Proteine (Abb. 3.3 vgl. Lanes 2 und 3). Auch das Sec72p wird zu über 90 % Prozent aus der Load-Fraktion der IgG-Sepharose Säule depletiert (Daten nicht gezeigt).

Eine Reinigung des Sec61-Komplexes erfolgte im zweiten Schritt des Prozesses an einer α -HA Antikörpersäule. Der Durchfluss der IgG-Sepharose Säule wird über Nacht im Kreislauf etwa vier bis fünf Mal über die Säule gepumpt. So binden etwa 80 % des Sss1pHA und über dieses Protein auch die noch vorhandenen Bestandteile des Sec61-Komplexes (Abb. 3.3 vgl. Lanes 4 und 5). Im

Anschluss an das Laden der Säule wurden unspezifisch gebundene Proteine mit zehn Säulenvolumen des Bindepuffers von der Säule gewaschen.

Die Elution des Sec61-Komplexes erfolgte mit zehn Säulenvolumen Elutionspuffer (Abb.3.3 Lanes 9-18). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Elution mit Glycin die Proteinausbeute größer als bei der Elution mit dem HA-Peptid und das eluierte Protein weniger verunreinigt war (Daten nicht gezeigt).

Nicht eluierte Proteine wurden durch Waschen der α -HA-Agarose mit fünf Säulenvolumen 1 % Triton X-100 in PBS von der Matrix gelöst. Auffällig ist, dass auch in diesem Schritt noch etwa fünf Prozent der Gesamtmenge des Sss1pHA und des Sec61p von der Säulenmatrix eluieren (Abb. 3.3 Lanes 19 und 20), obwohl in den letzten Fraktionen der Elution mit Glycin/HCl praktisch kein Protein mehr nachweisbar war. Dies kann eine Folge des Detergenzwechsel sein. Triton X-100 führt zur vollständigen Dissoziation des Sec61-Komplexes (Daten nicht gezeigt). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Struktur der mit Triton X-100 eluierten Proteine den nativen Strukturen im Sec61-Komplex entspricht.

Anschließend wurde die Säule so lange mit PBS gespült, bis der pH-Wert wieder neutral war, mindestens jedoch mit fünf Säulenvolumen.

Mit der hier beschriebenen Methode zur Reinigung des Sec61-Komplexes aus *S. cerevisiae* konnten typischerweise etwa 30 Prozent des im Digitoninextrakt vorhandenen fSec61-Komplexes angereichert werden.

3.3.2 DER RIBOSOMENGEBUNDENE SEC61-KOMPLEX KANN AUS DEN RAMP ISOLIERT WERDEN

In Abbildung 3.2 ist der Verlauf einer Reinigung der Sec61-Komplexe aus RAMP dargestellt. Die Isolierung erfolgte analog zur zuvor beschriebenen Reinigung der Proteine aus Digitoninextrakt. Nach dem Ablösen der Ribosomen durch Puromycin/Hochsalz-Behandlung wurde zunächst eine Chromatographie an IgG-Sepharose durchgeführt. Hierdurch wurden die noch vorhandenen Reste von Proteinen des Sec-Komplexes (Sec62p, Sec63p und Sec72p) zu ca. 95 % aus dem Load der Säule depletiert (Abb. 3.2 vgl. Lanes 4 und 5).

Auch hier erfolgt eine Anreicherung des Sec61-Komplexes an einer α -HA Antikörpersäule. Wie bei der Isolierung aus dem Digitoninextrakt, binden auch hier etwa 80 % des Sss1pHA und über dieses Protein auch das Sec61p an die Säulenmatrix (Abb. 3.2 vgl. Lanes 6 und 7).

Die Elution des Sec61-Komplexes erfolgte wieder mit zehn Säulenvolumen Elutionspuffer (Abb. 3.2 Lanes 11-15). Im auf die Elution folgenden Waschschrift mit fünf Säulenvolumen

1 % Triton X-100 in PBS wurden noch etwa 5 % der Gesamtmenge des Sss1pHA und des Sec61p von der Säule eluiert. Abschließend wurde die Säule mit PBS neutralisiert.

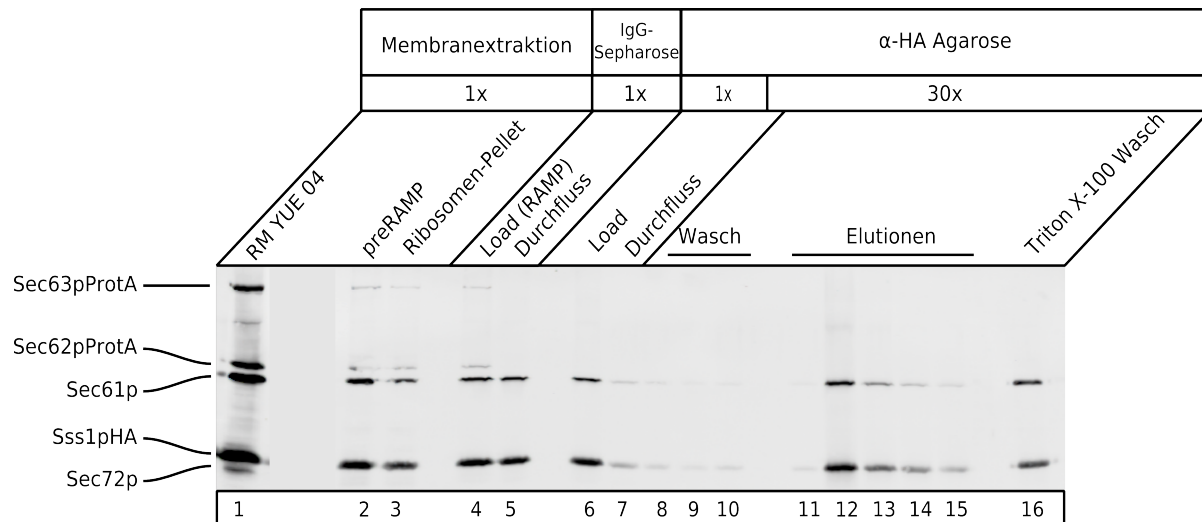


Abbildung 3.8: Reinigung des Sec61-Komplexes aus RAMP

Etwa 80000 eq raue Membranen (Lane 1) wurden zunächst mit Digitonin aufgelöst und wie im Text beschrieben extrahiert (Lanes 2 und 3). Die ribosomengebundenen Membran Proteine (RAMP Lane 4) wurden dann über Nacht an IgG-Sepharose chromatographiert. Hierdurch wurde der noch verbliebene Sec-Komplex über seine getagten Bestandteile, das Sec62pProtA und das Sec63pProtA depletiert (Lane 5). Die Aufreinigung des Sec61-Komplexes erfolgte an α-HA-Agarose. Das Sss1pHA und damit auch der rSec61-Komplex aus dem Durchfluss der IgG-Sepharose Säule wurden über Nacht an die Matrix gebunden (Lanes 6-7). Nach drei Waschschritten (Lanes 8-10) mit DMD₁₀₀ erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 100 mM Glycin/HCl in 1 % Digitonin (Lanes 11-15). Zur sofortigen Neutralisation des Eluates wurde es in 1 M HEPES (pH: 8,35) aufgenommen und der pH-Wert kontrolliert. Nicht eluierte Proteine wurden abschließend mit 1 % Triton X-100 in PBS von der Säule gewaschen (Lane 16). Die Proben wurden zur Analyse auf ein 10 % - 20 % SDS-Gel geladen und mit den angegebenen Antikörpern nach dem Western Blotting inkubiert. Die ProteinA-Tags wurden jeweils direkt über den sekundären Antikörper nachgewiesen.

Mit der hier beschriebenen Methode zur Reinigung des Sec61-Komplexes aus *S. cerevisiae* konnten typischerweise etwa 30 % des in den RAMP vorhandenen rSec61 gereinigt werden.

Nach der Reinigung der Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und aus den RAMP wurden diese aufkonzentriert. Hierzu wurden die isolierten Komplexe mit Hilfe einer Amicon Ultra-15 Filtereinheit auf eine Konzentration von etwa 20 eq/μl eingestellt.

Zur endgültigen Kontrolle der Komplexe wurden diese anschließend auf einem SDS-Gel getrennt. Die Proteine wurden über die spezifischen Antikörper im Immunoblot nachgewiesen bzw. durch Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abb. 3.7). Vergleicht man beide Nachweiswege zeigte sich, dass die durch die spezifischen Antikörper markierten Proteinbanden auch nach der Färbung identifizierbar waren (vgl. Abb. 3.7 A mit Abb. 3.7 B). Durch die schnelle und schonende Isolierung des Sec61-Komplexes über zwei affinitätschromatographische Schritte wurden weitere Proteine die mit den Komplexen assoziiert waren mit angereichert (Abb. 3.7 B). Aus diesem Grund wurde versucht die verbliebenen Proteinbanden massenspektrometrisch zu identifizieren. Diese Untersuchung ergab, dass die Proteinbanden im Coomassie gefärbten Gel vor allem aus zytosolischen und ribosomalen Proteinen bestehen.

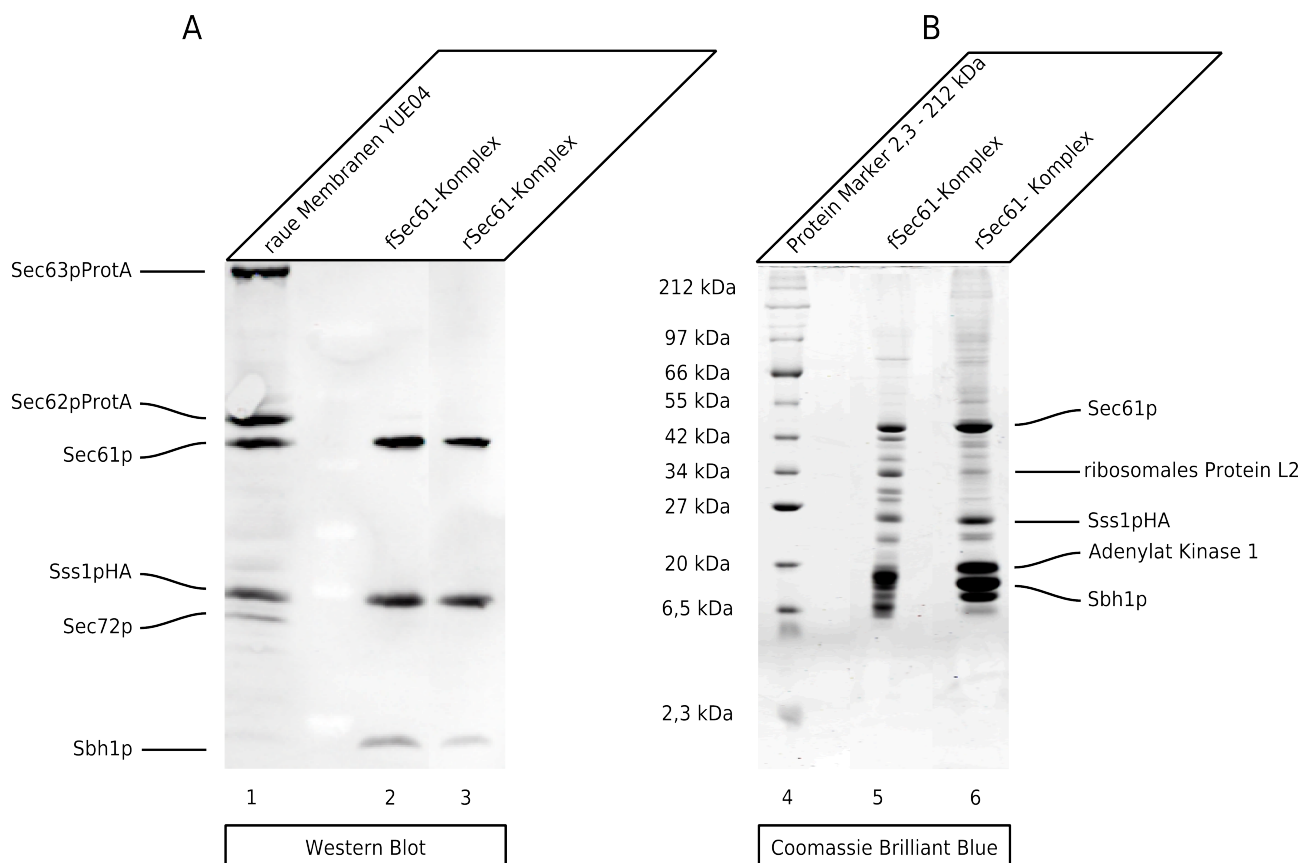


Abbildung 3.9: Der fSec61-Komplex und der rSec61-Komplex wurden im Western Blot und über eine Coomassie-Färbung nachgewiesen

Nach der Isolierung wurden die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP aufkonzentriert. Zur Analyse wurden die Retentate jeweils auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Die Proteine des Sec61-Komplexes wurden entweder über die angegebenen Antikörper (A), oder über eine Färbung sämtlicher Proteine mit Coomassie Brilliant Blue nachgewiesen (B). Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen Komplex, die zuvor über den Gehalt an Sec61p quantifiziert wurden.

B: Die Komponenten des Sec61-Komplexes wurden anhand ihrer Laufstrecke im Gel identifiziert und gekennzeichnet. Zusätzlich wurden stellvertretend für weitere, zwei durch die massenspektrometrische Analyse identifizierte Proteine markiert.

Um sicherzustellen, dass die isolierten und aufkonzentrierten Proteine der Sec61-Komplexe weiterhin in einem Komplex vorkommen, wurde abschließend eine Immunopräzipitation mit α -HA-Agarose durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Bestandteile der Sec61-Komplexe mit dem Sss1pHA kopräzipitieren (Daten nicht gezeigt).

3.4 Bestimmung der Bindungskonstanten von Ribosomen an Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP

Nach der Gewinnung der Sec61-Komplexe aus dem Digitoninextrakt und den RAMP sollte untersucht werden, ob sich der fSec61-Komplex und der rSec61-Komplex hinsichtlich ihrer Bindung von Ribosomen unterscheiden. Eine gute Methode hierzu stellt die Untersuchung der Bindung mit Hilfe einer Flotation durch ein hochkonzentriertes Sucrosekissen dar. Hierzu wurden die gereinigten Proteine zunächst in Proteoliposomen rekonstituiert. In den Bindungsversuchen wurden dann diese Proteoliposomen mit steigenden Mengen von aus Hefezytosol gewonnenen Ribosomen inkubiert. Außerdem wurde jeweils ein nmol zuvor durch Iodierung radioaktiv

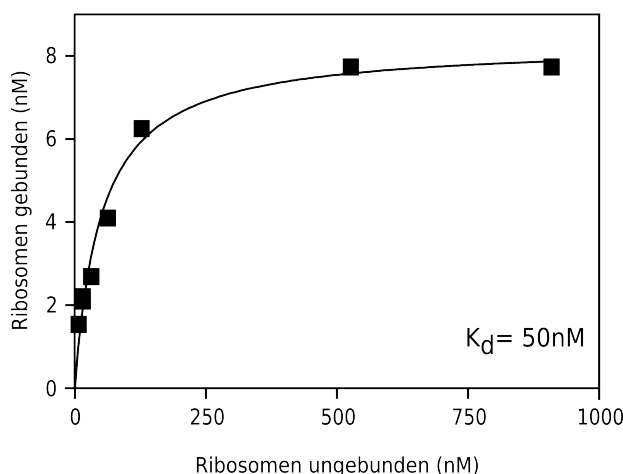


Abbildung 3.10: Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierten fSec61-Komplex

Je 10 eq in Proteoliposomen rekonstituiertes fSec61 wurden für 20 Minuten auf Eis und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen Ribosomen inkubiert. Außerdem wurde jeweils ein nmol zuvor durch Iodierung radioaktiv markierter Ribosomen zugesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Versuchsansatz mit 2,5 M Sucrose auf eine Sucrosekonzentration von > 2 M Sucrose eingestellt und unter ein Kissen mit 1,6 M Sucrose geschichtet. Die Trennung der freien Ribosomen von den an die Proteoliposomen gebundenen erfolgte durch eine einstündige Zentrifugation bei $201078 \times g$ im TLS 55 Rotor. Zur Analyse wurden die Ansätze fraktioniert. Die Aktivität der Fraktionen wurde im Wizard² Automatic Gamma Counter der Firma PerkinElmer bestimmt. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die Konzentration der gebundenen Ribosomen gegen die der ungebundenen aufgetragen und eine nichtlineare Regression durchgeführt.

markierter Ribosomen zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die an den Sec61-Komplex gebundenen Ribosomen durch die Flotation der Proteoliposomen durch ein hochmolares Sucrosekissen von den freien Ribosomen getrennt. Die Analyse der Bindung erfolgte über die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im γ -counter. Dieser Assay ist vielfach beschrieben und bietet die Möglichkeit, sowohl die Bindungskonstanten zu bestimmen, als auch

Aussagen über die Sättigung der Bindung treffen zu können. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism“. Die Messwerte wurden einer nichtlinearen Regressionsanalyse unterzogen, die die Bestimmung der Dissoziationskonstante ermöglichte.

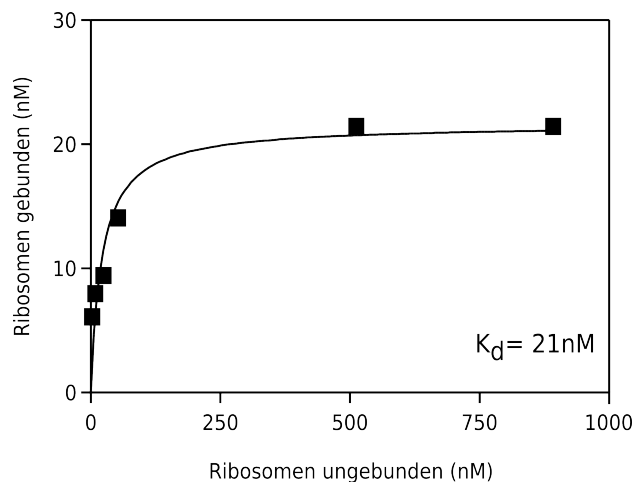


Abbildung 3.11: Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomenrekonstituierten Sec61-Komplex aus RAMP

rSec61 haltige Proteoliposomen (10 eq Sec61p) wurden für 20 Minuten auf Eis und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen Ribosomen inkubiert. Außerdem wurde jeweils ein nmol zuvor durch Iodierung radioaktiv markierter Ribosomen zugesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Versuchsansatz mit 2,5 M Sucrose auf eine Sucrosekonzentration von > 2 M Sucrose eingestellt und unter ein Kissen mit 1,6 M Sucrose geschichtet. Die Trennung der freien Ribosomen von den an die Proteoliposomen gebundenen erfolgte durch eine einstündige Zentrifugation bei 201078 x g im TLS 55 Rotor. Zur Analyse wurden die Ansätze fraktioniert. Die Aktivität der Fraktionen wurde im Wizard² Automatic Gamma Counter der Firma PerkinElmer bestimmt. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die Konzentration der gebundenen Ribosomen gegen die der ungebundenen aufgetragen und eine nichtlineare Regression durchgeführt.

Die Abbildungen 3.8 und 3.9 stellen jeweils den Verlauf einer typischen Bindungskurve dar. Es zeigte sich, dass die Bindung einer Sättigungskurve folgt und dass sich die Bindungskonstanten von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt und aus RAMP nicht wesentlich unterschieden. Die hier dargestellten Bindungsisothermen zweier repräsentativer Versuche ergaben Dissoziationskonstanten von ca. 20 nM für die Bindung von Ribosomen an rSec61 bzw. ca. 50 nM für die Bindung an fSec61. Hierbei bindet ein Äquivalent des rSec61-Komplexes im Mittel von zwei Versuchen etwa 90 fmol Ribosomen und der fSec61-Komplex aus Digitoninextrakt ist in der Lage etwa 170 fmol Ribosomen je Äquivalent zu binden. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte entsprechen etwa den in vorhergehenden Arbeiten gefundenen Dissoziationskonstanten (Kalies *et al.* 1994, Prinz *et al.* 2000a, Schaletzky und Rapoport 2006). Es kann also davon ausgegangen werden, dass der rSec61-Komplex nach der Reinigung weiterhin aktiv ist und dass die Bindung an den rSec61-Komplex spezifisch ist. Zusätzlich zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass auch die fSec61-Komplexe in der Lage sind Ribosomen mit ähnlich großen Dissoziationskonstanten und Sättigungen wie die rSec61-Komplexe zu binden.

3.5 Die Sec61-Komplexe binden Ribosomen in Detergenzlösung

Zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bindung von Ribosomen an die Sec61-Komplexe aus RAMP und Digitoninextrakt mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie (SPR). Da die Analyse dieser Bindung an die isolierten Sec61-Komplexe im BIAcore nur mit solubilisierten Komplexen möglich ist, musste vor der Durchführung von SPR-Studien gezeigt werden, dass die isolierten Sec61-Komplexe auch in Detergenzlösung in der Lage sind Ribosomen zu binden. Hierfür wurden die Proteine mit Ribosomen inkubiert, etwaige Aggregate abzentrifugiert und im Anschluss wurden die Proben auf einen Sucrosegradienten geschichtet und sedimentiert. So konnten die an die Ribosomen gebundenen Sec61-Komplexe von den freien Sec61-Komplexen getrennt werden. Nach der Fraktionierung der Gradienten erfolgte die Auswertung der Experimente im Western Blot. Sie lässt eine qualitative Aussage über das Bindungsverhalten der verschiedenen Komponenten zu.

Zur Untersuchung der Bindung von rSec61- und fSec61-Komplexen an Ribosomen wurden jeweils acht Äquivalente Sec61p mit 0,5 μ M Ribosomen inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich jeweils die Sec61-komplexe ohne Ribosomen und Ribosomen ohne den Sec61-Komplex inkubiert. Die Analyse der Ansätze nach der Auftrennung in einem Sucrosegradienten (Abbildung 3.12) zeigte zunächst, dass sich die Ribosomen alleine in den Fraktionen fünf und sechs befinden. In diesem Bereich befanden sich in allen drei Versuchsansätzen mehr als 90 % der detektierten Ribosomen. Wurden nur Sec61-Komplexe eingesetzt, waren diese im Gradienten vor allem in den Fraktionen eins und zwei zu detektieren, mit der Ausnahme, dass Aggregate von rSec61-Komplexen auch in Fraktion neun des Gradienten zu finden sind. Werden nun fSec61-Komplexe (Abb 3.12: A und F: fSec61 + CRb) oder rSec61-Komplexe (Abb 3.12: B und E-F: rSec61 + CRb) an Ribosomen gebunden zeigte sich, dass sich die untersuchten Komponenten in zwei bzw. drei Bereichen des Gradienten konzentrieren. Nicht an Ribosomen gebundene f- und rSec61-Komplexe befinden sich weiterhin in den Fraktionen eins und zwei. Mit etwa 30 % des fSec61- und ca. 27 % des rSec61-Komplexes (Abb. 3.12 D) befindet sich etwa ein Drittel des Sec61p auf der Höhe im Gradienten, auf der auch freie Ribosomen migrieren (Abb. 3.12 E: CRb). Nimmt man die angrenzenden Fraktionen vier und sechs hinzu in denen sich jeweils etwa 10 % des eingesetzten Sec61p befinden, zeigt dies, dass etwa 50 % des Sec61p mit den Ribosomen im Gradienten laufen.

Betrachtet man die rSec61-Komplexe, finden sich auch in den Bindungsansätzen etwa 25 % des rSec61p in der neunten Fraktion des Gradienten. Dies ist insofern erstaunlich, da unmittelbar vor

Beladen des Gradienten alle Proben noch einmal zentrifugiert wurden, um etwaige Aggregate zu entfernen.

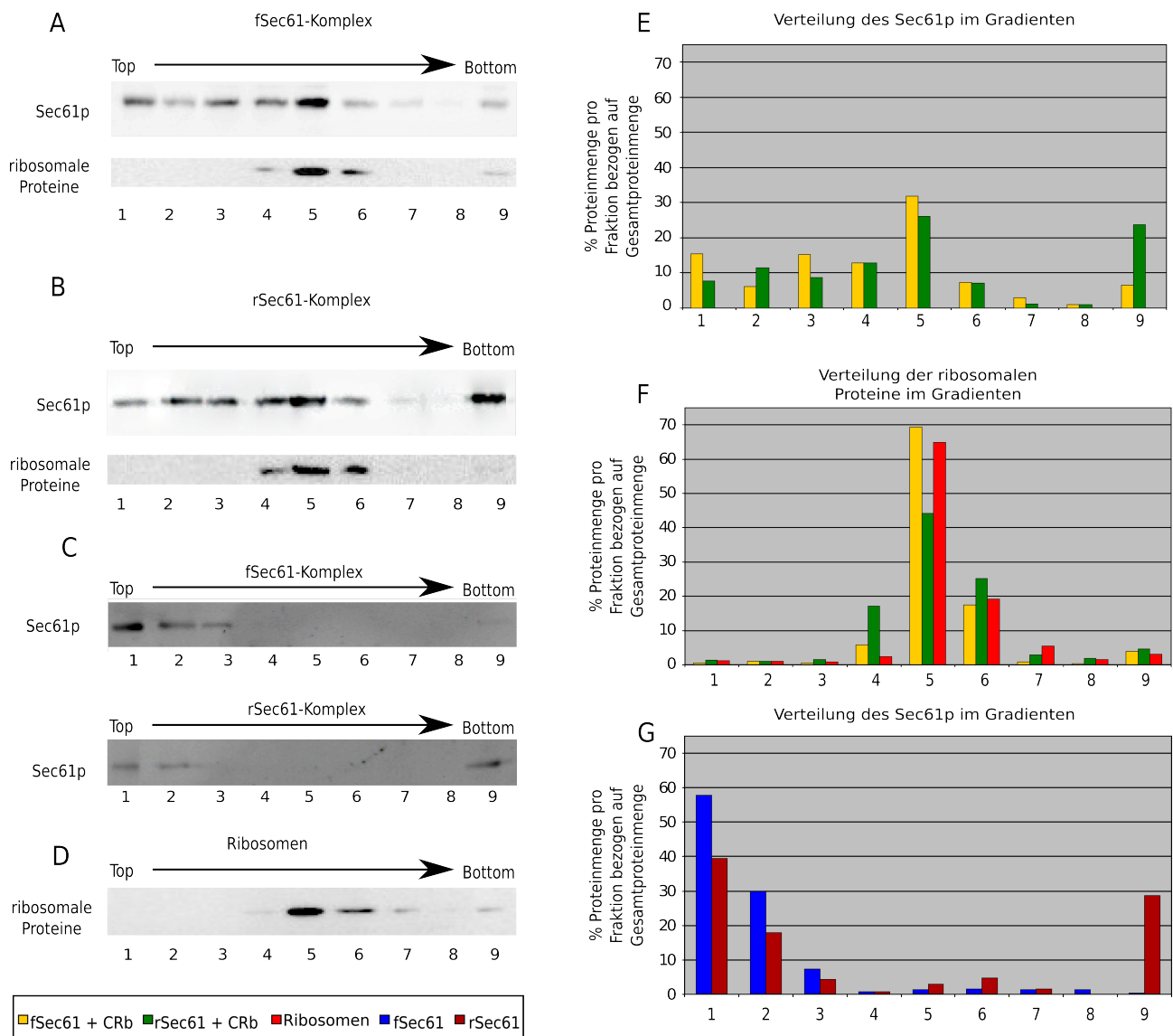


Abbildung 3.12: Bindung von fSec61- und rSec61-Komplexen an Ribosomen

(A-D) Je 8 eq gereinigter Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt (fSec61) und RAMP (rSec61) wurden mit $0,5 \mu\text{M}$ Ribosomen (CRb) für 20 Minuten auf Eis und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Etwaige Aggregate wurden sedimentiert und die Probe anschließend auf einen 10 % - 40 % Sucrosegradienten geschichtet. Zur Auftrennung der Proben wurde der Gradient für 45 Minuten bei $201078 \times g$ im TLS 55 Rotor zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Proben in neun Anteile fraktioniert. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA präzipitiert und jeweils 40 % der Proben wurden in einem 10 % - 20 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen wurden im Western Blot nach der Inkubation mit den angegebenen Antikörpern bestimmt. (E) Zur Auswertung der Versuche wurde die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen relativ zur Gesamtproteinmenge der Probe in einer Grafik aufgetragen. (F) Wie in E, jedoch wurde hier zusätzlich zu den Proben mit Sec61-Komplex und Ribosomen die Verteilung der ribosomalen Proteine in einer Kontrolle ohne Komplex dargestellt. (G) Darstellung wie in E, jedoch wurde in dieser Kontrolle nur der fSec61- bzw. der rSec61-Komplex eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl der rSec61-Komplex, als auch der fSec61-Komplex in der Lage sind, in Digitoninlösung Ribosomen zu binden und mit diesen in den

Sucrosegradienten einwandern. Die oben beschriebenen Experimente wurden mit aus Hefezytosol isolierten Ribosomen durchgeführt. Parallel zu den Bindungsversuchen mit diesen Ribosomen wurden auch Ribosomen von Membranen an die Sec61-Komplexe gebunden. Es zeigte sich, dass sich die Bindungen die mit diesen Ribosomen beobachtet wurden nicht wesentlich von denjenigen mit den aus Zytosol gewonnenen Ribosomen unterschieden (Daten nicht gezeigt).

3.6 Bestimmung der Ribosomenbindungskonstanten mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten statischen Untersuchungen zur Bindung von Ribosomen ergaben keine Unterschiede im Ribosomenbindungsverhalten zwischen dem rSec61-

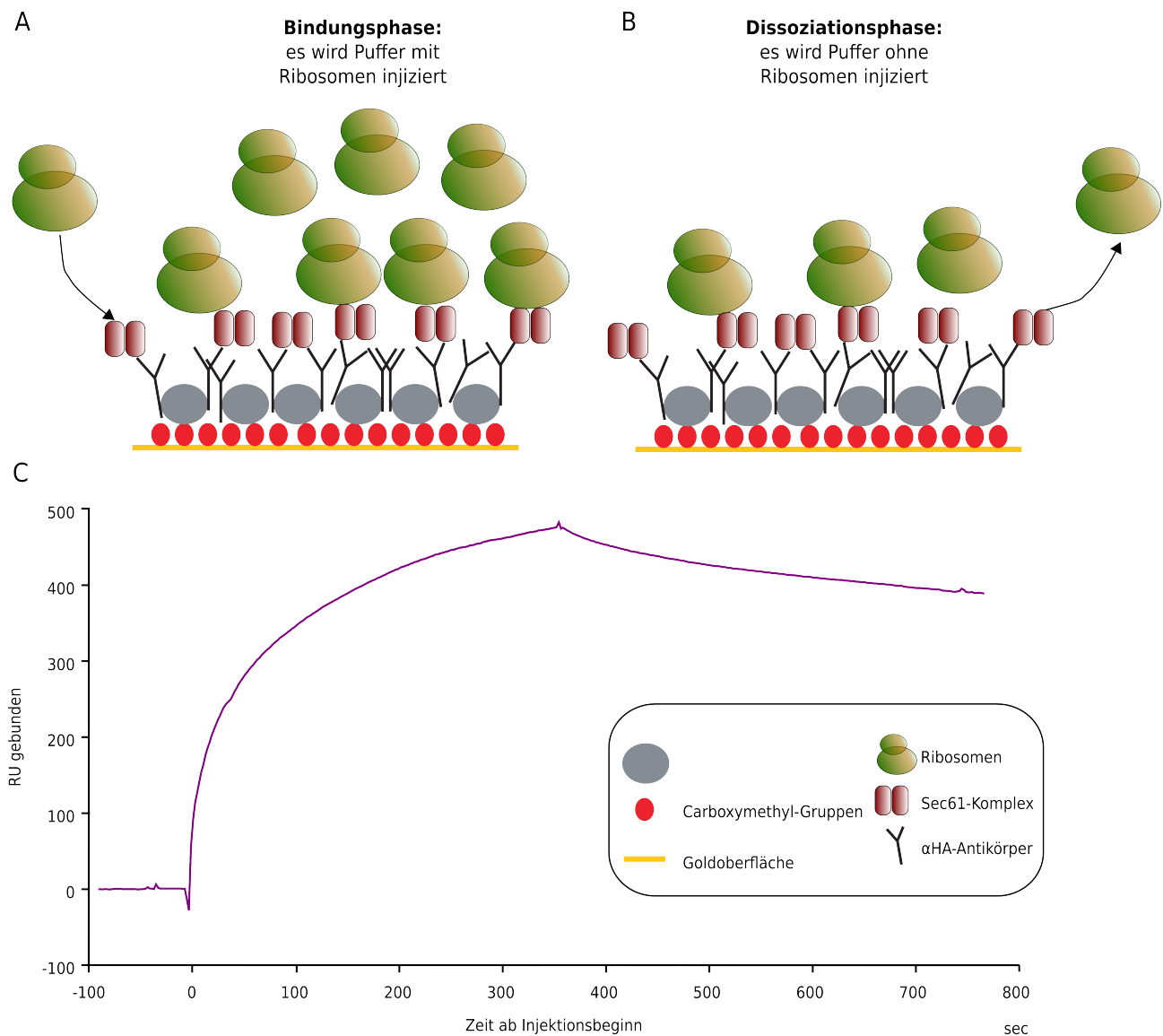


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung eines BIAcore Bindungsexperimentes

Ribosomenbindung an zuvor auf einem BIAcore Sensorchip immobilisierten Sec61-Komplex. Weitere Erläuterungen im Text.

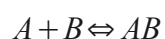
und dem fSec61-Komplex. Außerdem lässt sich mit diesen Methoden das Ablösen vom Ribosomen nicht untersuchen. Aus diesem Grund sollte versucht werden, einen neuen Assay zur Echtzeit-Bestimmung der Ribosomenbindungskonstanten zu etablieren. Die *Surface Plasmon Resonance (SPR)* Spektroskopie ist hierfür besonders geeignet. Sie bietet die Möglichkeit, die Bindung und auch das Ablösen unmarkierter Analyten an ihre Liganden zu verfolgen. Die Analyse der Bindung erfolgt dabei, während die Bindung stattfindet, über die Veränderung der Dichte im analysierten Medium.

Zur Bestimmung der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex wurde dieser auf einem C1-Sensorchip fixiert. In Abbildung 3.10 (A) ist der Aufbau eines BIAcore Sensorchips schematisch dargestellt. Zuerst wurde ProteinA kovalent an den Carboxylgruppen des Chips immobilisiert. An das ProteinA wurde wiederum ein Antikörper gegen das HA-Tag der Sec61-Komplexe gebunden. Das IgG bindet ProteinA über den Fc-Teil des Moleküles mit nanomolarer Affinität.

Nachdem der Antikörper auf dem Sensorchip fixiert wurde, folgt die Bindung des Sec61-Komplexes an den Chip. Dafür wird der isolierte Komplex in Detergenzlösung mit einer geringen Flussrate injiziert und kann somit an die Antikörper gegen das HA-Tag am Sss1pHA binden.

Der Verlauf einer typischen Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Zunächst erfolgt die Injektion von Ribosomen in Laufpuffer (Abb. 3.10 A und C: 0sec-360sec). Während dieser Phase können die Ribosomen an den Komplex binden, das Signal „RU gebunden“ steigt an. Nach Ende der Bindungsphase wird die Injektion von Ribosomen gestoppt. Von nun an kommt es zur Dissoziation der Ribosomen (Abb. 3.10 B und C: 360 sec-720 sec). Die „RU gebunden“ sinken wieder, so kann das Ablösen der Ribosomen in Echtzeit verfolgt werden. Durch die Injektion unterschiedlicher Ribosomenkonzentrationen ist es möglich, die kinetischen Konstanten der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex zu bestimmen.

Die Analyse der Bindungskonstanten in *SPR*-Experimenten erfolgt dann rechnerisch. Meist wird zur Berechnung durch die Software versucht, die Abstandsquadrate einer idealen Kurve von der tatsächlich bestimmten möglichst gering zu halten. Das am besten untersuchte Modell hierzu ist die Bindung eines Liganden an den Analyten im Verhältnis eins zu eins. Diesen Berechnungen liegt das Massenwirkungsgesetz zugrunde, dass diese Bindung anhand der Formel



beschreibt. Auch in dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die Bindungskonstanten anhand dieser Gleichung zu bestimmen.

3.6.1 DIE BINDUNG VON RIBOSOMEN AN DEN SEC61-KOMPLEX IST SALZSENSITIV

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die spezifische Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex abhängig ist von der Kaliumacetatkonzentration (KOAc) im Bindungspuffer (Kalies *et al.*, 1994). So konnte dargestellt werden, dass bei Kaliumacetatkonzentrationen, die unterhalb des physiologischen Niveaus liegen, eine größere Mengen von Ribosomen und auch unphysiologische Bindungspartner wie etwa DNA an den Sc61-Komplex binden. Wenn jedoch die Salzkonzentration auf etwa 150 mM KOAc erhöht wurde, waren nur noch Ribosomen in der Lage, an den Sec61-Komplex zu binden (Kalies *et al.*, 1994). Die Abhängigkeit der Bindung von Ribosomen an die immobilisierten Sec61-Komplexe von der Salzkonzentration im Injektionspuffer, die hier beobachtet wurde, erfüllt die für eine spezifische Bindung postulierte Voraussetzung, der Bindung von Ribosomen unter physiologischen Salzkonzentrationen (Borgese *et al.* 1974, Kalies *et al.* 1994).

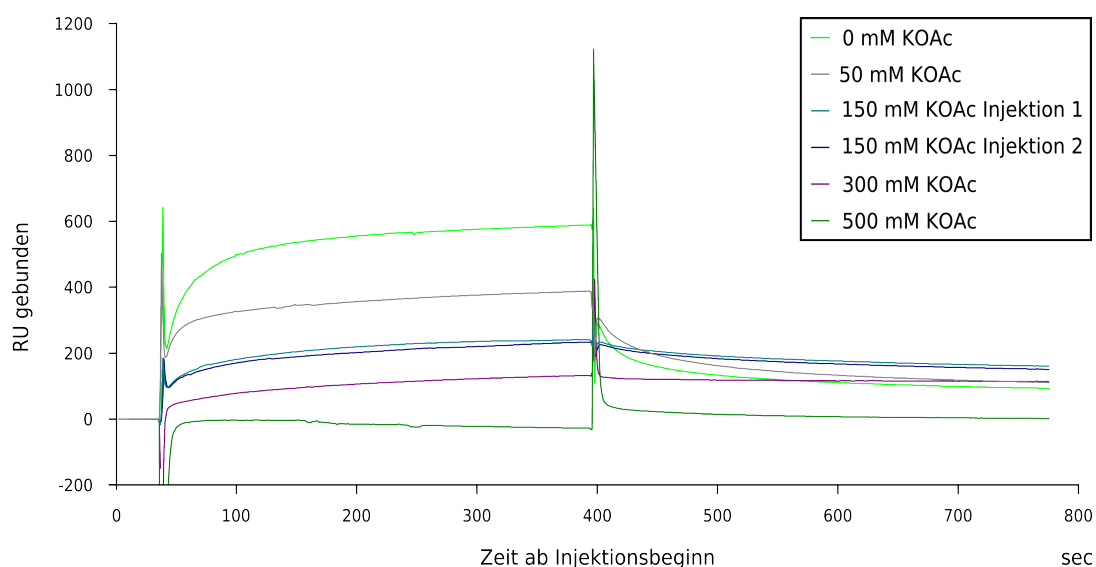


Abbildung 3.14: Die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex ist salzsensitiv

Der Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt wurde auf einem BIAcore Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden 66,7 nM Ribosomen in Laufpuffer mit den angegebenen Salzkonzentrationen injiziert. Nach Abschluss der Salztitration wurde eine zweite Injektion mit 150 mM KOAc durchgeführt.

Zur Kontrolle der Salzsensitivität wurden Ribosomen in Laufpuffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen von 0 mM Kaliumacetat (KOAc) bis zu 500 mM KOAc injiziert. Es zeigte sich, dass die Bindung in Puffer ohne KOAc am stärksten war und bis hin zu einer Salzkonzentration von 300 mM KOAc kontinuierlich abnimmt, jedoch noch messbar war. Wurden die Ribosomen in einem Puffer mit 500 mM KOAc injiziert, so war keine Bindung messbar. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den von Kalies *et al.* (1994) erlangten Beobachtungen.

Ein weiteres Ziel dieses Versuches war es, zu untersuchen, ob das Spülen des Sensorchips mit einem Hochsalzpuffer dazu führt, dass der auf dem Chip immobilisierte Sec61-Komplex geschädigt oder aber immobilisierte Proteine abgewaschen werden. Hierzu wurde nach der Injektion von Ribosomen in Laufpuffer mit 500 mM KOAc, eine zweite Injektion mit Ribosomen in 150 mM KOAc durchgeführt (Abb. 3.11 150 mM KOAc Injektion 2). Die Bindungskurve verläuft nahezu identisch mit der zuerst aufgenommenen, der Versuchsaufbau auf dem Sensorchip wurde somit nicht durch die hohe Salzkonzentration beschädigt. Zudem ist dieses Verhalten ein guter Hinweis darauf, dass die Regeneration des Chips nach den Injektionen mit Hochsalzpuffer die vorher gebundenen Ribosomen wirkungsvoll ablöst und der immobilisierte Sec61-Komplex wiederholt in der Lage ist Ribosomen zu binden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt abhängig von der Salzkonzentration im Puffer ist. In einem weiteren Versuch konnte dies auch für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus RAMP bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 DIE DISSOZIATIONSKONSTANTEN DER BINDUNG VON RIBOSOMEN AN DIE ZWEI POPULATIONEN DES SEC61-KOMPLEXES KÖNNEN ONLINE BESTIMMT WERDEN

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ribosomen auch in Detergenzlösung an die Sec61-Komplexe aus Zytosol und aus RAMP binden sowie eine hochsalzsensitive Bindung der Ribosomen an den Sensorchip vorliegt, sollten nun die Bindungskonstanten am BIAcore untersucht werden.

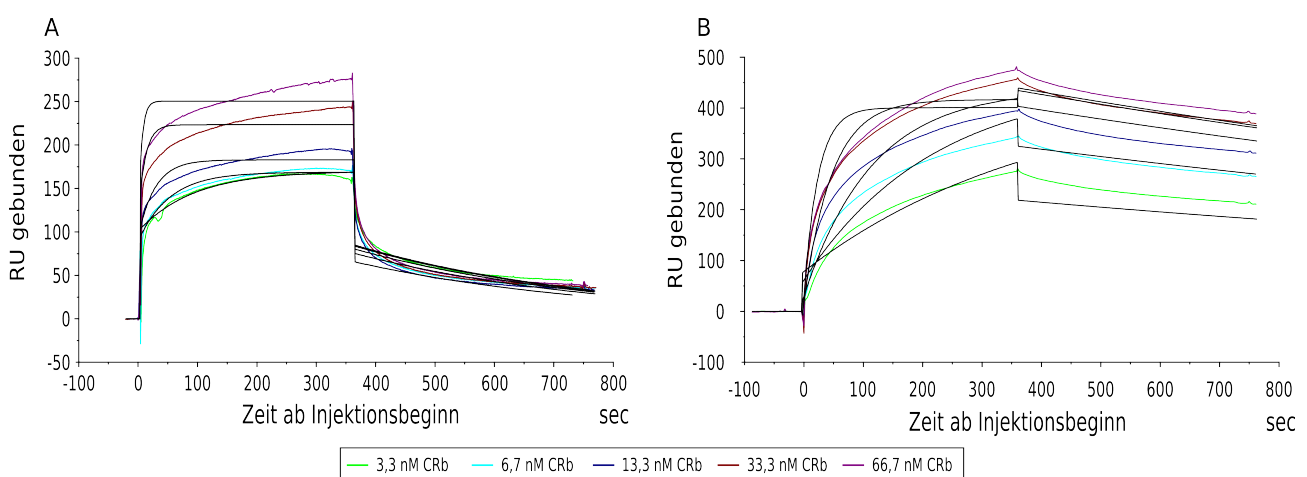


Abbildung 3.15: Die Bindung von Ribosomen an gereinigte Sec61-Komplexe folgt nicht dem „eins zu eins Modell“ des Massenwirkungsgesetzes

Auf einem BIAcore Sensorchip wurde der Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt (A) und aus RAMP (B) wie beschrieben immobilisiert. Zur Analyse der Ribosomenbindung wurden unterschiedliche Konzentrationen von Ribosomen auf diesen Chip injiziert. (A): Dargestellt sind die Bindung und Dissoziation in einem Sensorgramm. Steigende Konzentrationen von Ribosomen wurden injiziert. Der Verlauf der Bindung wurde für sechs Minuten verfolgt. Danach strömte ribosomenfreier Puffer über den Sensorchip. So konnte die Dissoziation der Ribosomen verfolgt werden. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde die Software „BIAeval“ genutzt. Es sollten alle Konstanten global für sämtliche Ribosomenkonzentrationen ermittelt werden. Die schwarzen Graphen stellen die Annäherungen mit dem geringsten Abstandsquadrat an die tatsächlich ermittelten Bindungskurven dar.

Hierfür wurden zunächst die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ribosomen inkubiert. In Abbildung 3.12 A ist der Verlauf einer typischen Bindungs- und Dissoziationskurve für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt dargestellt. Die Analyse der Ergebnisse ergab, dass mit steigenden Ribosomenkonzentrationen, auch die Menge der gebundenen Ribosomen steigt. Innerhalb von kurzer Zeit wird ein Großteil der injizierten Ribosomen gebunden und nach Ende der Injektion dissoziieren die gebundenen Ribosomen auch innerhalb von kurzer Zeit wieder vom fSec61-Komplex ab. Es zeigte sich aber auch, dass die Frühphase der Bindung trotz der hohen Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ nicht aufzulösen ist. Die Bindung verläuft hier offensichtlich zu schnell, um noch detailliert gemessen werden zu können.

Ein anderes Bild zeigt die Bindung von Ribosomen an den aus RAMP gereinigten Sec61-Komplex (Abb. 3.12 B). Hier kann die Zunahme der RU zeitlich besser aufgelöst werden. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Ribosomen länger an den Sec61-Komplex gebunden bleiben. Die Ablösung verläuft, genau wie die Bindung, langsamer, als bei der Bindung von Ribosomen an den Komplex aus Digitoninextrakt.

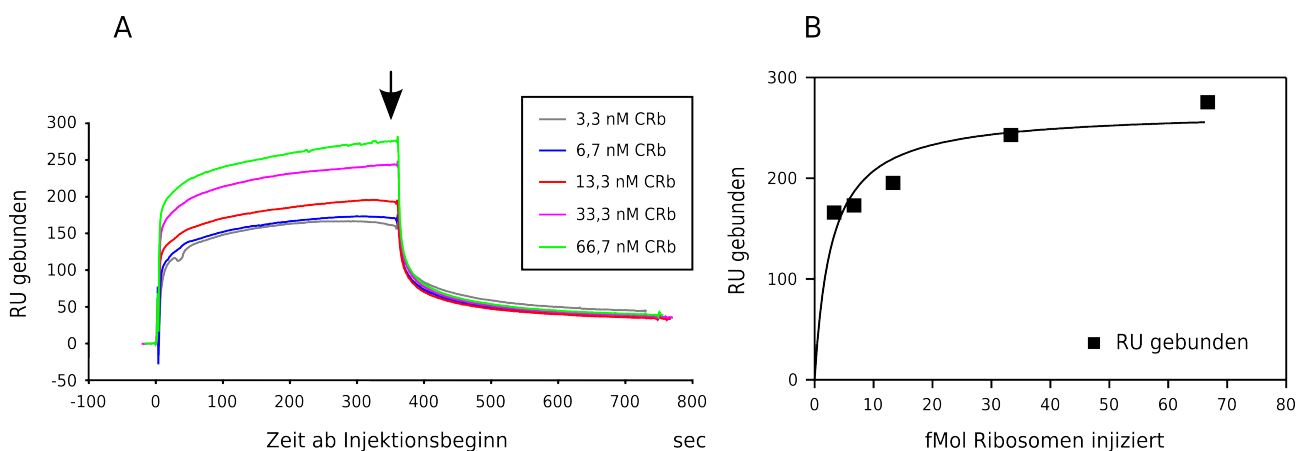


Abbildung 3.16: Im BIAcore binden Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt

Auf einem BIAcore Sensorchip wurde der Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt wie beschrieben immobilisiert. (A): Darstellung der Bindung und Dissoziation in einem Sensorgramm. Steigende Konzentrationen von Ribosomen wurden injiziert. Der Verlauf der Bindung wurde für sechs Minuten verfolgt. Danach strömte ribosomenfreier Puffer über den Sensorchip. So konnte die Dissoziation der Ribosomen verfolgt werden. (B) Der Pfeil in (A) kennzeichnet den Zeitpunkt, zu dem im „BIAeval“ Programm die Menge der gebundenen Ribosomen bestimmt (RU gebunden) wurde. Sie wurde gegen die Konzentration der eingesetzten Ribosomen aufgetragen und mit Hilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse wurde die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt bestimmt.

Bei der Auswertung der Messungen mit Hilfe der „BIAeval“ Software zeigte sich, dass die in Abbildung 3.12 gezeigten Bindungskurven nicht dem angenommenen „eins zu eins Modell“ einer Bindung nach dem Massenwirkungsgesetzes gehorchten. Das *Fitting* der Kurven nach diesem Modell führte zu Regressionskurven die nur sehr schlecht dem tatsächlichen Kurvenverlauf

entsprachen (vgl. Schwarze Kurven mit den farbigen). Es kann somit gesagt werden, dass die hier dargestellten Bindungen von Ribosomen an die zwei Populationen des Sec61-Komplexes nicht dem „eins zu eins Modell“ der Gleichung folgten.

Es wurde dennoch versucht, die Dissoziationskonstanten für diese Bindungen zu bestimmen. Hierzu wurde mit der „BIAeval“ Software die Menge der gebundenen Ribosomen am Ende der

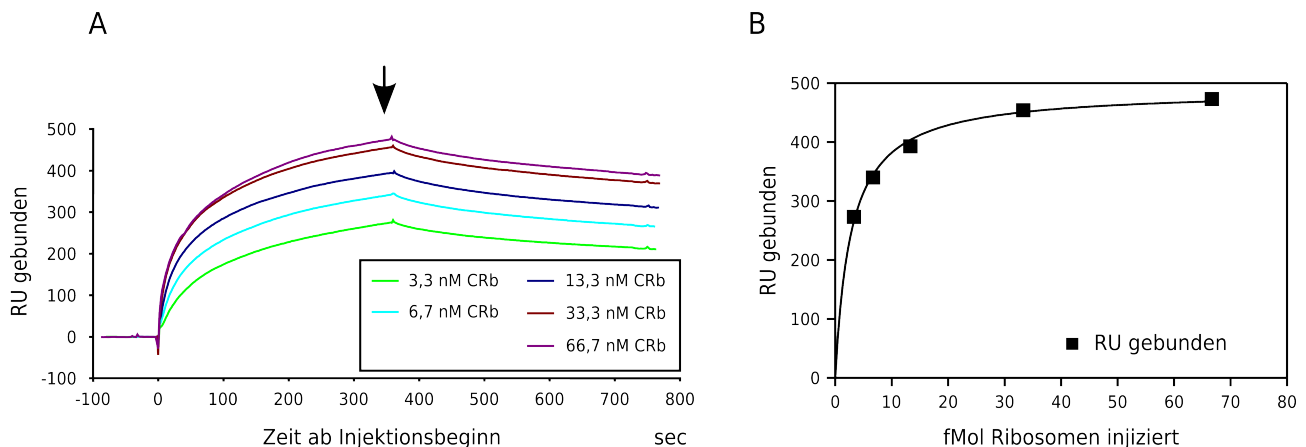


Abbildung 3.17: Im BIAcore binden Ribosomen an den Sec61-Komplex aus RAMP

Auf einem BIAcore Sensorchip wurde der Sec61-Komplex aus RAMP wie beschrieben immobilisiert. (A) Darstellung der Bindung und Dissoziation in einem Sensorgramm. Unterschiedliche Konzentrationen von Ribosomen wurden injiziert. Der Verlauf der Bindung wurde für sechs Minuten verfolgt. Danach strömte ribosomenfreier Puffer über den Sensorchip. So konnte die Dissoziation der Ribosomen verfolgt werden. (B) Der Pfeil in (A) kennzeichnet den Zeitpunkt, zu dem im „BIAeval“ Programm die Menge der gebundenen Ribosomen bestimmt wurde (RU gebunden). Sie wurde gegen die Konzentration der eingesetzten Ribosomen aufgetragen und mit Hilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse wurde die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus RAMP bestimmt.

Assoziationsphase bestimmt. Diese Werte wurden gegen die Konzentration der eingesetzten Ribosomen aufgetragen (Abb. 3.13, 3.14, Teil B). Die so ermittelten Bindungsisothermen konnten mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ausgewertet werden. So konnten die Dissoziationskonstanten der Bindungen von Ribosomen an die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP ermittelt werden. Da die Bindung nach der Injektion der Ribosomen möglicherweise noch nicht ihr Gleichgewicht erreicht hatte, wurde untersucht, ob nach manueller Weiterführung bis zu einem angenommenen Gleichgewicht der Reaktion eine Änderung in den Dissoziationskonstanten eintritt (Daten nicht gezeigt). Es ergab sich aber, dass sich die Dissoziationskonstanten nach der manuellen Extrapolation nur marginal veränderten.

In Tabelle 2 sind die Dissoziationskonstanten der Bindungen von Ribosomen an die gereinigten Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP dargestellt. Es zeigten sich trotz der unterschiedlichen Kurvenverläufe während der Bindung im BIAcore keine signifikanten Unterschiede in den ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D).

Zusätzlich zur Bestimmung der kinetischen Konstanten nach dem „eins zu eins Modell“ bietet die Software „BIAeval“ auch die Möglichkeit die Ablösung der Ribosomen separat von anderen Parametern zu betrachten. So können die Dissoziationsratenkonstanten („off rates“) der Ablösung von Ribosomen von den Sec61-Komplexen ermittelt werden. Sie zeigen, dass die Halbwertszeit der Bindungen von Ribosomen an die Sec61-Komplexe etwa 43 Minuten betragen (fSec61: 47 min; rSec61: 38 min), zwischen den so ermittelten „off rates“ in diesen Versuchen aber keine signifikanten Unterschiede zwischen dem fSec61-Komplex und dem rSec61-Komplex auszumachen sind. Dies ist erstaunlich, da sich bei der Betrachtung der aufgezeichneten kurven zeigt, dass ein Großteil der an die fSec61-Komplexe gebundenen Ribosomen schnell dissoziiert. Betrachtet man die Dissoziation der Ribosomen von den rSec61-Komplexen zeigt sich, dass diese Dissoziation sehr viel langsamer von statten geht. Es ist jedoch nicht möglich, mit Hilfe der Software die erste, schnelle Phase der Dissoziation von den fSec61-Komplexen zu beschreiben. Es ist nur eine Berechnung der Dissoziation in der zweiten kontinuierlichen Phase möglich, die die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse liefert.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten der Bindung von Ribosomen an die zwei Populationen des Sec61-Komplexes

Herkunft des Sec61-Komplexes	ermittelte K_D	„offrate“ Dissoziationsratenkonstante (k_d)
Digitoninextrakt (fSec61)	2,9 nM	0,00034 s ⁻¹
RAMP (rSec61)	3,3 nM	0,00043 s ⁻¹

Zusammenfassend zeigte sich also, dass die Gleichgewichtskonstanten der Bindungen keine Unterschiede aufweisen. Betrachtet man die Dissoziationsratenkonstanten der Ablösung der Ribosomen an von den zwei Populationen des Sec61-Komplexes, so sind auch hier im Rahmen der durch die Software vorgegebenen Parameter keine Unterschiede zwischen dem Sec61-Komplex aus Digitoninextrakt und aus RAMP zu erkennen.

4 Diskussion

Zusammen mit der Signalhypothese wurde postuliert, dass ein Proteinkomplex den Transport der naszierenden Polypeptidkette in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) katalysiert (Blobel und Dobberstein, 1975). Zusätzlich wurde angenommen, dass dieser Komplex beim Transport auch als Ribosomenrezeptor für die translatierenden Ribosomen dient und fest mit diesen interagiert. Anfang der neunziger Jahre wurde in wegweisenden Arbeiten dieser Komplex aus ER-Membranen von Säugern isoliert (Görlich *et al.*, 1992b). Es konnte einerseits nachgewiesen werden, dass die Rekonstitution dieses Sec61-Komplexes in künstliche Proteoliposomen notwendige Voraussetzung für den cotranslationalen Proteintransport ist (Görlich und Rapoport, 1993), andererseits konnte auch gezeigt werden, dass dieser Kanal wirklich den Ribosomenrezeptor in der ER-Membran darstellt (Kalies *et al.*, 1994). Wenig später konnte auch gezeigt werden, dass der homologe Sec61-Komplex der Hefe ebenfalls in der Lage ist, Proteine cotranslational zu translozieren (Panzner *et al.*, 1995). Im Zuge der Reinigung dieses Komplexes aus dem Säuger und aus der Hefe wurde beobachtet, dass eine zweite Population von Sec61-Komplexen in Membranen vorkommt, die nicht an Ribosomen gebunden vorliegt (Görlich und Rapoport, 1993; Panzner *et al.*, 1995). Später konnte gezeigt werden, dass auch in rauen Membranen und PK-RM von Säugern Sec61-Komplexe existieren, die nicht an Ribosomen gebunden sind (Schaletzky und Rapoport, 2006). Bisher liegen aber keine gesicherten Ergebnisse vor, die das unterschiedliche Ribosomenbindungsverhalten dieser beiden Komplexe erklären können.

Bei der Untersuchung der Komponenten des Translokons in der Hefe zeigte sich zudem, dass der posttranslationale Transport von bereits vollständig translatierten Proteinen durch den Sec-Komplex vermittelt wird. Dieser Komplex setzt sich aus dem Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Komplex zusammen (Deshaies und Schekman, 1990; Panzner *et al.*, 1995). Gegenstand von Diskussionen ist nach wie vor, ob Derivate dieses Komplexes an der Bindung von Ribosomen an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt sind. So wurden einerseits bisher keine Bestandteile des Sec62/63-Komplexes gefunden, wenn an Ribosomen gebundene Proteine aus solubilierten Membranen analysiert wurden und in Bindungsstudien konnte keine Bindung des Sec-Komplexes an Ribosomen nachgewiesen werden (Panzner *et al.*, 1995; Prinz *et al.*, 2000a). Andererseits zeigten Studien zur Funktion der Brl-Domäne des Sec63p aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), dass das Sec63p mit den Proteinen Sec61p, Sbh1p, Sss1p, Sec71p, und

Sec72p den Sec'-Komplex bildet, der am cotranslationalen Proteintransport beteiligt sein könnte (Jermy *et al.*, 2006).

Zusammen genommen legen diese Daten die Schlussfolgerung nahe, dass der Translokationskomplex in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums eine dynamische Maschine ist, deren Zusammensetzung von den Erfordernissen des gerade statt findenden *Targeting*- oder Transportprozesses abhängig ist. Zur Untersuchung etwaiger Unterschiede im Ribosomenbindungsverhalten der unterschiedlichen Translokationskomplexe ist es also notwendig, diese zu identifizieren, mögliche Kontaminationen durch Bestandteile anderer Komplexe auszuschließen und diese dann zu analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung von Ribosomen an die zwei verschiedenen Populationen des Sec61-Komplexes untersucht werden. Hierzu war es zuerst notwendig, einen Hefestamm herzustellen, aus dessen rauen Membranen selektiv der heptamere Sec-Komplex entfernt werden konnte. Im Weiteren sollten die Sec61-Komplexe aus den Membranen des ER isoliert werden. Anschließend wurde die Bindung von Ribosomen an diese Komplexe mit drei unterschiedlichen Methoden untersucht.

Die Hefe *S. cerevisiae* eignet sich besonders als Modellorganismus für molekularbiologische und biochemische Studien. Einerseits sind viele genetische Systeme zur direkten Manipulation der Genomsequenz von *S. cerevisiae* vorhanden, andererseits lassen sich die Zellen einfach in großen Mengen kultivieren. Dies ermöglicht die Reinigung von nativ exprimierten Proteinen. Diese beiden Vorteile wurden während dieser Arbeit genutzt, um erst einen Hefestamm herzustellen, der an drei Proteinen ein Peptid-Tag trägt und aus dem sich im Folgenden zwei Formen des Sec61-Komplex reinigen ließen.

4.1 Herstellung eines Hefestammes zur vollständigen Depletion des Sec-Komplex

Bisher durchgeführte Studien zur Bindung von Ribosomen an zwei Populationen des Sec61-Komplexes aus Säugermembranen ließen den auch im Säuger vorhandenen Sec62/63-Komplex völlig außer acht (Schaletzky und Rapoport, 2006). Dies ist insofern problematisch, da sowohl im Säuger, als auch in der Hefe das Sec61 α bzw. das Sec61p auch im Sec-Komplex vorkommt, der nicht an der Ribosomenbindung beteiligt ist (Meyer *et al.*, 2000; Panzner *et al.*, 1995; Prinz *et al.*, 2000a). In Bindungsstudien kann somit nicht zwischen freiem im Sec61-Komplex vorliegenden und freiem im Sec-Komplex vorhandenen Sec61 α bzw. Sec61p unterschieden werden. Aufgrund

dieser Tatsache sollte in dieser Arbeit auf die möglichst vollständige Entfernung des Sec-Komplexes aus den späteren Bindungsexperimenten besondere Rücksicht genommen werden.

Hierfür wurde ausgehend vom Hefestamm KY117 zunächst ein sechsfach Hämagglutinin-Tag an das Sss1p angefügt. Dies erfolgte mit Hilfe der homologen Rekombination eines PCR-Fragments in die chromosomale Hefe-DNA. Hierzu wurde zuerst ein DNA-Fragment amplifiziert, das die Sequenz des Epitop-Tags und eines Marker-Gens trägt. Zusätzlich besaß das Fragment zur DNA-Sequenz der Hefe homologe Bereiche, die an den C-Terminus des Sss1p rekombinierten (Gauss *et al.*, 2005). Nach der Transformation besaß der resultierende Stamm YND5 das HA-Tag am Sss1p.

In der Hefe *S. cerevisiae* kommt ein zum Sec61-Komplex homologer Komplex vor, der ebenfalls in der Lage ist, Ribosomen zu binden (Finke *et al.*, 1996). Da auch die an Ribosomen gebundene Population des Sec61-Komplexes gereinigt werden sollte, musste der homologe Ssh1-Komplex aus der Hefe entfernt werden. Hierfür wurde der YND5-Stamm mit dem Hefestamm YTX84 gekreuzt, in dem das Ssh1p deletiert war (Finke *et al.*, 1996). Der aus dieser Kreuzung resultierende Stamm YND22 wurde im Folgenden noch mit zwei weiteren Stämmen gekreuzt. Beide Stämme besaßen ein C-terminales ProteinA-Tag entweder am Sec62p, oder am Sec63p. Die aus diesen Kreuzungen hervorgegangenen Stämme YAB1 und YAB2 tragen also jeweils ein Tag an einem Protein des Sec61-Komplexes und an einem Protein des Sec62/63-Komplexes. Um den endgültig gewünschten Hefestamm herzustellen, der am Sss1p und an den beiden Proteinen Sec62p und Sec63p getagt war, wurden dann die Stämme YAB1 und YAB2 miteinander gekreuzt. Es zeigte sich, dass der aus dieser Kreuzung resultierende Stamm YUE04 lebensfähig war, obwohl drei essentielle Proteine mit Peptid- bzw. Protein-Tags versehen waren.

Um zu klären, ob aus den Membranen des dreifach getagten Stammes die Bestandteile des Sec-Komplexes depletiert werden konnten, wurden Mikrosomen isoliert und mit Digitonin solubilisiert. Nach der Inkubation mit IgG-Sepharose wurde der Überstand auf das Vorhandensein der Proteine des Sec-Komplexes analysiert. Es zeigte sich, dass aus diesem Stamm die Komponenten des Sec62/63-Komplexes zu über 90 % entfernt werden konnten. Da mit diesen Komponenten auch etwa 30 % des Sec61p entfernt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der Sec-Komplex nahezu vollständig aus den solubilisierten Membranen depletiert werden konnte. Somit konnten aus diesem Stamm beide Populationen des Sec61-Komplexes frei von Verunreinigungen durch den Sec-Komplex gereinigt werden.

4.2 In der ER-Membran von *S. cerevisiae* können zwei distinkte Populationen des Sec61-Komplexes identifiziert werden

Neben den verschiedenen oligomeren Komplexen, an deren Bildung das Sec61p beteiligt ist, wurden auch zwei distinkte Formen des Sec61-Komplexes in den rauen Membranen von *S. cerevisiae* beobachtet. Diese wurden jedoch nicht näher charakterisiert (Panzner *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass sich das Sec61p zu jeweils etwa einem Drittel auf den Sec-Komplex, den Ribosomen gebundenen Sec61-Komplex und einen Sec61-Komplex verteilt, der frei von Ribosomen vorkommt (Panzner *et al.*, 1995). Auch im Säuger wurde beobachtet, dass das Sec61 α in rauen Membranen sowohl Ribosomen gebunden, als auch nicht Ribosomen assoziiert vorliegt (Görlich und Rapoport, 1993). Spätere Studien zeigten dann, dass das freie Sec61 α auch in der ER-Membran von Säugern im Sec61-Sec63-Komplex mit den Proteinen Sec62 und Sec63 vorkommen kann (Meyer *et al.*, 2000). In Untersuchungen mit Puromycin/Hochsalz behandelten Membranen (PK-RM), die mit physiologischen Mengen von Ribosomen inkubiert wurden, lag ebenfalls etwa 30 % des Sec61 α nicht an Ribosomen assoziiert vor (Schaletzky und Rapoport, 2006).

In dieser Arbeit sollte deswegen zuerst gezeigt werden, ob ein freier Sec61-Komplex in solubilisierten rauen Membranen des Endoplasmatischen Retikulum vorkommt. Die hier dargestellten Untersuchungen ergaben, dass auch in Membranen, die nahezu vollständig von den Komponenten des Sec62/63-Komplexes befreit wurden, eine ribosomenfreie Population des Sec61-Komplexes vorhanden ist.

Vergleicht man die Menge des freien Sec61p in solubilisierten depletierten Membranen mit dem in lediglich solubilisierten Membranen zeigte sich, dass sich in den depletierten Membranen das Verhältnis zwischen ribosomenfreien und gebundenen Sec61-Komplexen hin zum ribosomen-assoziierten Komplex verschiebt. Diese Beobachtung unterstützt den Befund, dass ein Teil des freien Sec61p im Sec-Komplex vorkommt, der nicht an der Ribosomenbindung beteiligt ist. Es ist aber weiterhin nicht auszuschließen, dass Komponenten des Sec-Komplexes am cotranslationalen Transport beteiligt sind (Jermy *et al.*, 2005).

Zusammen genommen zeigen die hier dargestellten Befunde eindeutig, dass in solubilisierten Membranen des ER von *S. cerevisiae* zwei Populationen des Sec61-Komplexes unabhängig voneinander vorkommen. Ob sich diese ineinander umwandeln können wurde nicht untersucht, da die beiden Populationen für die Reinigung aus den Membranen direkt nach dem Auflösen der Membranen getrennt wurden und somit zwei gleichförmige Ursprungspopulationen vorlagen.

4.3 Isolierung der Sec61-Komplexe aus rauen Membranen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in den rauen Membranen des Endoplasmatischen Retikulums von *S. cerevisiae* zwei Populationen des Sec61-Komplexes vorkommen, sollten diese möglichst schonend isoliert werden. So sollte verhindert werden, dass etwaige Interaktionspartner, die die Ribosomenbindung dieser Komplexe beeinflussen in Mitleidenschaft gezogen werden. In bisherigen Studien wurde der Sec61-Komplex vor allem über seine Ribosomenassoziation gereinigt (Panzner *et al.*, 1995). Hierzu wurden zunächst die Ribosomen aus solubilisierten Membranen isoliert und anschließend die daran gebundenen Proteine und mit ihnen auch der Sec61-Komplex abgelöst (Panzner *et al.*, 1995). Da im Rahmen dieser Arbeit sowohl ribosomengebundene, als auch freie Sec61-Komplexe isoliert werden sollten, musste der Ansatz modifiziert werden. Zusätzlich sollte eine möglichst vollständige Entfernung der Komponenten des Sec-Komplexes erreicht werden. Diese Vorgaben stellten besondere Ansprüche an den Ablauf der Reinigung. Der Sec-Komplex wurde zuerst durch die Inkubation der Membranextrakte mit IgG-Sepharose depletiert. Vergleicht man die Proben vor und nach der Depletion, so zeigt sich, dass jeweils über 90 % der detektierbaren Bestandteile des Sec62/63-Komplexes aus den solubilisierten Membranen entfernt wurden.

In den bereits publizierten Arbeiten wurde anschließend der Sec61-Komplex sowohl über affinitätschromatographische, als auch Ionenaustauscher Säulen gereinigt (Panzner *et al.*, 1995). Da das Sss1p ein chromosomales HA-Tag trägt, wurde dieser Prozess modifiziert. So konnte eine für die anschließenden Bindungsstudien ausreichende Reinigung durch die Chromatographie an einer α -HA-Agarose Matrix erreicht werden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch das Waschen des Säulenmaterials mit Glycin unter sauren Bedingungen. Dieses Verfahren führte zu einer höheren Proteinausbeute bei gleichzeitiger Erhöhung des Reinheitsgrades der eluierten Sec61-Komplexe. Unerwarteter Weise konnte trotz einer ausreichend bemessenen Menge an Säulenmaterial nie das gesamte Sss1pHA aus der Probe an die Säulenmatrix gebunden werden. Dies könnte auf eine „Maskierung“ des Protein-Tag nach dem Einbau des Sec61-Komplexes in die Digitonin-Mizellen hindeuten. Weiterhin könnte die unterschiedliche Affinität des Sss1pHA durch die sechsmalige Insertion der HA-Sequenz in das Protein beeinflusst werden. So könnte die Bindungskapazität des Säulenmaterials durch die Interaktion von mehr als einer Kopie des Tags pro Sss1pHA Molekül sehr herabgesetzt werden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine feste Bindung des Proteins nur bei mehrfacher Interaktion des Sss1pHA mit je einem auf der Säulenmatrix immobilisiertem Antikörper möglich ist.

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die eluierten Proteine durch die Zentrifugation in einer Amicon Ultra Filtereinheit aufkonzentriert. Ein Nachteil dieser Methode zur Aufkonzentrierung von Proteinen ist, dass kein zusätzlicher Reinigungseffekt bis auf die Größendiskriminierung durch die Ultrafiltrationsmembran erreicht wird. Andererseits kann durch die Auswahl einer passenden Porengröße sichergestellt werden, dass vor allem intakte Komplexe aus den drei Proteinen Sec61p, Sbh1p und Sss1pHA innerhalb der Filtereinheit zurückgehalten werden. Zur abschließenden Kontrolle wurde dennoch eine Coimmunopräzipitation der Sec61-Komplexe mit der zuvor zur Reinigung benutzten α -HA-Agarose durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die gereinigten Bestandteile des Sec61-Komplexes am Ende der Reinigungsprozedur noch in einem Komplex vorlagen, der über das HA-Tag an die Matrix gebunden werden konnte.

4.4 Untersuchungen zur Bindung von Ribosomen an die zwei Populationen des Sec61-Komplexes

Neben der *in vitro* oder *in vivo* Untersuchung des cotranslationalen Proteintransports, stellt die Charakterisierung der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex eine Möglichkeit dar, die Funktion dieses Komplexes und somit den entscheidenden Schritt zu Beginn des cotranslationalen Transports besser zu verstehen. Hierzu wurden die gereinigten Sec61-Komplexe zunächst in Proteoliposomen rekonstituiert und die Bindung an Ribosomen über die Flotation durch ein hochkonzentriertes Sucrosekissen analysiert. Des Weiteren wurde diese Bindung auch durch zwei verschiedene Methoden in Detergenzlösung untersucht. Zum einen diente ein Sedimentationsassay dazu, die Bindung von Ribosomen an die Sec61-Komplexe qualitativ zu untersuchen, zum anderen wurde mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie die Bindung in Lösung auch quantitativ erfasst.

4.4.1 BINDUNG VON RIBOSOMEN AN IN PROTEOLIPOSOMEN REKONSTITUIERTE SEC61-KOMPLEXE

Zur Untersuchung der Bindung von Ribosomen an Proteoliposomen wird der gereinigte Sec61-Komplex zunächst in Liposomen rekonstituiert. Diese werden anschließend mit steigenden Mengen Ribosomen inkubiert. Ein Teil dieser Ribosomen ist mit radioaktivem Iod markiert. Dies ermöglicht die Auswertung der Experimente im γ -Counter. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten werden die gebundenen von den freien Ribosomen durch die Flotation der Proteoliposomen durch ein hochkonzentriertes Sucrosekissen getrennt (Prinz *et al.*, 2000a). Nach dem Fraktionieren der Proben wird die Radioaktivität des flotierten Anteils und der

sedimentierten freien Ribosomen bestimmt. Trägt man die so ermittelten Konzentrationen gegeneinander auf, lässt sich durch eine nichtlineare Regressionsanalyse der resultierenden Kurve die Dissoziationskonstante der Bindung bestimmen. Zusätzlich kann auch die Bindungskapazität der eingesetzten Sec61-Komplexe ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe dieses Testsystems untersucht werden, ob auch die aus Digitoninextrakt gereinigten fSec61-Komplexe genau wie auch die rSec61-Komplexe in der Lage sind, Ribosomen zu binden. Da die Dissoziationskonstanten für die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex bisher nur in diesem System bestimmt wurden (vgl. Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000a). Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten mit zuvor ermittelten, so kann man für den rSec61-Komplex einerseits Aussagen zur Funktion der isolierten Komplexe machen, andererseits erlauben diese Untersuchungen auch Rückschlüsse auf die grundsätzliche Fähigkeit des fSec61-Komplexes zur Ribosomenbindung.

Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ribosomen an die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt betrug etwa 50 nM. Die Bindungsversuche von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus RAMP ergaben eine Dissoziationskonstante von etwa 20 nM. Vergleicht man diese Werte mit bereits ermittelten, so zeigt sich, dass die in dieser Arbeit bestimmten Bindungskonstanten im Bereich der zuvor beobachteten liegen (Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000a; Schaletzky und Rapoport, 2006). Somit kann geschlossen werden, dass die isolierten rSec61-Komplexe eine normale Ribosomenbindungsaktivität besitzen. Die Dissoziationskonstante der fSec61-Komplexe liegt zwar etwas höher als die der rSec61-Komplexe, insgesamt scheint aber die Reinigung über eine α -HA-Matrix und die Elution mit Glycin keine negativen Auswirkungen auf die Ribosomenbindungseigenschaften der Sec61-Komplexe zu haben.

Die Untersuchung der Bindung von Ribosomen an Sec61-Komplexe im Flotationsassay bietet zusätzlich zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten die Möglichkeit die Sättigungsgrenze des Sec61-Komplexes mit Ribosomen zu bestimmen. Hierzu dient wiederum die nichtlineare Regressionsanalyse, die neben den Dissoziationskonstanten auch die Sättigung als Schnittpunkt der Asymptote mit der Y-Achse liefert. Der Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Sättigungswerte mit zuvor publizierten zeigt, dass die Sec61-Komplexe aus RAMP und Digitoninextrakt Ribosomen in etwa demselben Maße binden wie aus Hundepankreas gereinigte Komplexe (Kalies *et al.*, 1994). Auch die bereits für den Sec61-Komplex aus Hefe ermittelten Werte liegen im hier beobachteten Rahmen (Prinz *et al.*, 2000a).

4.4.2 BINDUNGSEXPERIMENTE IN DETERGENZLÖSUNG

Nachdem die Bindungsstudien mit Hilfe des Flotationsassays zeigten, dass die aus Digitoninextrakt und RAMP gereinigten Sec61-Komplexe Ribosomen binden konnten und sich die Charakteristik dieser Bindung nicht wesentlich von bisher untersuchten Ribosomen-Komplex-Bindungen unterschied, sollte im Folgenden ein Testsystem etabliert werden, dass eine genauere Analyse dieses Vorgangs zulässt.

Da bisher keine Bindung von Ribosomen an gereinigte Sec61-Komplexe aus *S. cerevisiae* in Digitoninlösung gezeigt werden konnte, war es für die Durchführung dieser Arbeit notwendig, eine Interaktion zu zeigen, um später die Bindung von Ribosomen an Sec61-Komplexe auch mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Spektroskopie zu untersuchen.

Bisher wurde die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex aus der Hefe nur in Anwesenheit von DeoxyBigCHAP untersucht (Prinz *et al.*, 2000a). Da außerdem der aus Digitoninextrakt isolierte Sec61-Komplex in bisher publizierten Studien nur nach der Rekonstitution in Proteoliposomen untersucht wurde, musste überprüft werden, ob auch dieser Komplex in der Lage ist, Ribosomen in Detergenzlösung zu binden (Hanein *et al.*, 1996).

In bereits durchgeführten Studien wurde ein Assay vorgestellt, bei dem die Bindung von Ribosomen an PK-RM und an in Proteoliposomen rekonstituierte Sec61-Komplexe aus Säugern mit Hilfe der Sedimentation der gebundenen und danach solubilisierten Komponenten durch einen Sucrosegradienten untersucht wurde (Schaletzky und Rapoport, 2006). Der dort vorgestellte Ansatz diente als Grundlage für die Entwicklung eines eigenen Testsystems, bei dem die Bindung von Ribosomen an die gereinigten Sec61-Komplex aus der Hefe in Detergenzlösung untersucht werden sollte. Anders jedoch als zuvor erfolgte die Bindung von Sec61-Komplexen an Ribosomen nicht an Proteoliposomen sondern in Anwesenheit von Digitonin an solubilisierter Sec61-Komplexe.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch in Digitoninlösung die Sec61-Komplexe an Ribosomen binden. Zur Analyse der Bindung wurden die Proben jeweils auf einen 10 % - 40 % Sucrosegradienten geschichtet und die gebundenen Proteine von den freien durch die Sedimentation durch diesen Gradienten getrennt. Es zeigte sich, dass bei der Bindung von Ribosomen das Maximum der an die Ribosomen gebundenen Sec61-Komplexe sich im Gradienten dort befindet, wo auch native 80s Ribosomen migrieren. Da die Auswertung der Versuche über einen Western Blot erfolgte, ist aber lediglich

eine semiquantitative Analyse der Bindung möglich. Es können also im Gegensatz zu den Bindungsstudien im Flotationsassay keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden.

4.4.3 UNTERSUCHUNGEN MIT HILFE DER SURFACE PLASMON RESONANCE SPEKTROSKOPIE

Die *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie bietet die Möglichkeit die Bindung eines Analyten an seinen Liganden in Echtzeit zu verfolgen. Seit der Einführung Ende der achtziger Jahre wurde sie benutzt, um mannigfaltige Interaktionsprozesse zu analysieren (zur Übersicht siehe Piliarik *et al.*, 2009; Rich und Myszka, 2002; Rich und Myszka, 2005; Rich und Myszka, 2008). Bisher wurden aber vor allem zytosolische Proteine und ihre Liganden untersucht. In Bezug auf die Translokation von Proteinen wurde bisher nur die Bindung des luminalen Chaperons BiP an ein immobilisiertes Sec63-GST-Hybridprotein untersucht (Tyedmers *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun erstmals die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex in Echtzeit analysiert werden.

Für die Messung der SPR musste zunächst eine geeignete Methode entwickelt werden, mit der die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex verfolgt werden konnte. Hierzu wurde zunächst ProteinA auf einem C1-Sensorchip immobilisiert. ProteinA bindet den Fc-Teil von IgG-Molekülen und wurde benutzt, um α -HA-Antikörper an die Oberfläche des Sensorchip zu binden.

Der Antikörper wurde wiederum genutzt, um den Sec61-Komplex zu immobilisieren. So sollte erreicht werden, dass die zytosolische Domäne des Sec61-Komplexes zur Flusskammer des BIAcore Systems hin exponiert wird. Da der Sec61-Komplex nur über seine zytosolischen Bereiche mit dem Ribosom direkt interagieren kann, sollten so die *in vivo* Bedingungen möglichst genau nachgestellt werden. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich dann, dass abhängig von der Menge des an den Sensorchip gebundenen Sec61-Komplexes nur etwa 1 % - 4 % aktiv in der Lage waren, Ribosomen zu binden, wobei der Anteil des aktiven Sec61-Komplexes sank, wenn die Menge des immobilisierten Sec61-Komplexes erhöht wurde.

Zur Kontrolle der Spezifität der Bindung von Ribosomen an Membranen, PK-RM, oder gereinigte Sec61-Komplexe wurde häufig die Salzabhängigkeit der Bindung bestimmt (Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000b). Aus diesem Grund wurde auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Bindung von Ribosomen an die fSec61- und rSec61-Komplexe durch die Steigerung der Salzkonzentration im Bindungspuffer verhindert werden konnte. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt sank die Menge der gebundenen Ribosomen mit steigender Salzkonzentration im Bindungspuffer und wurde bei einer Kaliumacetatkonzentration von 500 mM vollkommen

verhindert. In Vorversuchen konnte als weitere Kontrolle für die Spezifität der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex beobachtet werden, dass linearisierte Plasmid-DNA auch unter physiologischen Salzbedingungen nicht in der Lage ist an die immobilisierten Komplexe zu binden (Daten nicht gezeigt). In Anbetracht der Ergebnisse der durchgeführten Kontrollen kann also davon ausgegangen werden, dass die Bindung der Ribosomen an die immobilisierten Sec61-Komplexe spezifisch ist und der hier vorgestellte Versuchsansatz genutzt werden kann, um die kinetischen Konstanten dieser Bindung zu bestimmen.

Vorversuche zeigten, dass bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ der Verlauf der Bindung verfolgt werden konnte und der Verbrauch von Ribosomen noch in einem vertretbaren Bereich lag. Lag die Flussgeschwindigkeit unterhalb dieses Wertes, so konnte der Verlauf der Bindung nicht mehr aufgelöst werden. Zusätzlich wird durch die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit das Risiko verringert, dass Massentransfer-Effekte zu Fehlern in den Messungen führen (Piliarik *et al.*, 2009).

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte nach Durchführung der Messungen mit Hilfe der „*BIAeval*“ Software. Dieses Programm stellt mehrere Modelle zur Verfügung, die es erlauben, aus den aufgezeichneten Sensorgrammen die dynamischen Assoziations- und Dissoziationskonstanten, sowie die Gleichgewichtskonstanten zu bestimmen. Das Standardmodell ist hierbei die Berechnung der Bindung eines Liganden an den Analyten im Verhältnis eins zu eins. Die Auswertung der durchgeführten Analysen mit diesem Modell zeigte jedoch, dass die aufgezeichneten Sensorgramme nicht dem „eins zu eins Modell“ des Massenwirkungsgesetzes folgten. Zusätzlich zu diesem Verfahren besteht die Möglichkeit die kinetischen separat für jede einzelne injizierte Ribosomenkonzentration zu bestimmen. Dies führt zwar zu einer besseren Annäherung der berechneten Kurven an den tatsächlichen Verlauf der Bindungskurven, ergibt jedoch für jede eingesetzte Ribosomenkonzentration eine unterschiedliche Werte für die kinetischen Konstanten.

Da aber dennoch versucht werden sollte, die Bindung der Ribosomen an die gereinigten Sec61-Komplexe quantitativ zu erfassen, wurde die Menge der gebundenen Ribosomen am Ende der Assoziationsphase bestimmt. Die so gewonnenen Werte wurden gegen die Konzentration der eingesetzten Ribosomen aufgetragen. Mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism* wurde anschließend eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt, und die Dissoziationskonstanten für das Bindungsgleichgewicht bestimmt. Die ermittelten Werte zeigten, dass sich die

Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP in ihrem Ribosomenbindungsverhalten nicht unterscheiden.

Auffällig ist jedoch, dass die gemessenen Dissoziationskonstanten um etwa Faktor fünf bis zehn niedriger sind, als die im Flotationsassay ermittelten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Abwesenheit von Lipiden bei der Bindung oder aber die Kooperation mehrerer Sec61-Komplexe bei der Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierte Sec61-Komplexe.

Eine weitere Optimierung der Bindungsbedingungen im Flotationsassay könnte die dort ermittelten Dissoziationskonstanten senken, da aber dieser Assay nur als Kontrolle für die Funktionalität der gereinigten Sec61-Komplexe diente und K_D beobachtet werden konnten, die im Rahmen der zuvor beschriebenen lagen, wurde darauf verzichtet, die Bedingungen weiter zu optimieren.

Neben der Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten der Bindung von Ribosomen an die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP können separat auch weitere Parameter dieser Interaktion bestimmt werden. So ließen sich die Dissoziationsratenkonstanten der Bindungen ermitteln. Es zeigte sich, dass bei der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex keine Unterschiede zwischen den beiden Populationen des Sec61-Komplex zu beobachten waren. Die Halbwertszeit der Dissoziation von Ribosomen an die Sec61-Komplexe betrug für beide Populationen des Komplexes etwa 45 Minuten. Diese Werte sind deutlich kleiner als zuvor ermittelte. So konnte für die Bindung von Ribosomen an PK-RM gezeigt werden, dass nach zwei Stunden noch über 90 % der zuvor gebundenen Ribosomen an den Mikrosomen verblieben (Schaletzky und Rapoport, 2006). Die Unterschiede zu den in dieser Studie gefundenen Halbwertszeiten deuten darauf hin, dass zusätzlich zum Sec61-Komplex möglicherweise auch Lipide an der Membraninteraktion von Ribosomen in *S. cerevisiae* mitwirken. So konnte eine Beteiligung von Lipiden an der Interaktion von Ribosomen mit der Cytoplasmamembran erst kürzlich in *E. coli* gezeigt werden (Mai, 2008). Bei den Bindungsstudien im BIAcore sind diese Membranlipide nicht beteiligt, da die hier durchgeführten Versuche in Detergenzlösung stattfinden.

Wie oben bereits erwähnt, war es nicht möglich die Sensorgramme der Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex, die mit Hilfe des BIAcore Systems aufgezeichnet wurden, anhand des „eins zu eins Bindungsmodells“ des Massenwirkungsgesetzes zu analysieren. Eine mögliche Ursache hierfür können Änderungen des oligomeren Zustands der Sec61-Komplexe nach der Bindung von Ribosomen sein. So konnte bereits beobachtet werden, dass sich Sec61-

Komplex-Oligomere bilden, wenn Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierte Sec61-Komplexe gebunden werden (Hanein *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der ribosomengebundenen Fraktion des Sec61-Komplexes in rauen Membranen mehr Quervernetzungen zwischen zwei Sec61 β Molekülen auftreten als in den freien Sec61-Komplexen (Schaletzky und Rapoport, 2006). Studien zeigten auch, dass in PK-RM je ein 80s Ribosom an drei bis vier Sec61 α Moleküle binden kann, während des cotranslationalen Transports jedoch nur jeweils ein Sec61-Komplex den proteinleitenden Kanal durch die ER-Membran bildet (Kalies *et al.*, 2008). Jüngste Untersuchungen bestätigten zudem, dass die Translation einer Transmembranhelix innerhalb einer naszierenden Polypeptidkette zur Rekrutierung von RAMP4 hin zum Sec61-Komplex führt (Pool, 2009). Alle diese Befunde deuten darauf hin, dass sich die oligomere Struktur des Sec61-Komplexes während des *Targeting* bzw. während des cotranslationalen Transport ändern kann, oder dass weitere Protein hin zum Translokation rekrutiert werden können.

4.4.4 DIE SPR-SPEKTROSKOPIE ALS METHODE ZUR BESTIMMUNG DER KINETISCHEN KONSTANTEN DER BINDUNG VON RIBOSOMEN AN DEN SEC61-KOMPLEX

Die SPR-Spektroskopie mit dem BIAcore System stellt eine gute Methode zur Bestimmung von Bindungskinetiken dar. Mit ihr ist es möglich die Bindung eines Liganden an einen Analyten in Echtzeit zu verfolgen. Zusätzlich kann mit Hilfe dieser Methode ein breites Spektrum an Liganden und Analyten innerhalb relativ kurzer Zeit untersucht werden.

Bisher durchgeführte Untersuchungen zur Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex wurden immer nur in statischen Versuchsanordnungen durchgeführt. Häufig wurden Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierte Sec61-Komplexe gebunden (Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000a; Schaletzky und Rapoport, 2006). Dieser Versuchsaufbau lässt nur die Betrachtung der Start- und Endwerte der Bindung zu. Der Versuch die Kinetik der Assoziation aufzulösen scheiterte, da die Bindung auch nach sehr kurzen Inkubationszeiten schon nahezu vollständig abgelaufen ist (Borgese *et al.*, 1974; Schaletzky und Rapoport, 2006). Des Weiteren war es bisher nicht möglich die Ablösung der Ribosomen von den Sec61-Komplexen genauer zu beobachten. Auch hier ist es so, dass bisher durchgeführte Arbeiten nur sehr begrenzt die Dynamik dieses Vorgangs beschrieben haben (Schaletzky und Rapoport, 2006) oder ein Ablösen der Ribosomen gar nicht zu beobachten war (Potter und Nicchitta, 2002).

Bei der Analyse dieser Prozesse bietet die SPR-Spektroskopie somit erstmalig die Möglichkeit, durch die Betrachtung der Bindung und der Dissoziation von Ribosomen und Sec61-Komplexen in Echtzeit, einen genaueren Einblick in diese Vorgänge zu erlangen. Die im Rahmen der Bindungsstudien im BIAcore-System aufgenommenen Sensorgramme ließen sich zwar nicht mit Hilfe des „eins zu eins Bindungsmodells“ des Massenwirkungsgesetzes beschreiben, lassen jedoch Schlüsse auf die Natur der Bindung zu. So zeigt der Vergleich der in Abbildung 3.15 dargestellten Sensorgramme, dass die Assoziationsgeschwindigkeit von Ribosomen an die aus Digitoninextrakt gereinigten Sec61-Komplexe höher ist, als die an die aus RAMP gereinigten Proteinkomplexe. Der beobachtete Effekt könnte auf Unterschiede in der Ribosomenaffinität der beiden Sec61-Komplexe zurückzuführen sein. Ein ähnliches Verhalten konnte in PK-RM beobachtet werden (Schaletzky und Rapoport, 2006). In der zitierten Arbeit wurde gezeigt, dass eine bestimmte Sec61-Population in den Mikrosomen besser für die Komplexe aus Ribosomen, naszierender Kette und SRP zugänglich ist, als für Ribosomen alleine. Somit bietet auch die deskriptive Auswertung der Bindungen eine Möglichkeit, Unterschiede zwischen den Sec61-Komplexen aus Digitoninextrakt und aus RAMP zu identifizieren.

Vergleicht man die mit Hilfe der SPR-Spektroskopie gewonnenen Daten zur Ablösung der Ribosomen mit bisher gemachten Beobachtungen (vgl. Borgese *et al.*, 1974; Potter und Nicchitta, 2002; Schaletzky und Rapoport, 2006), so zeigte sich in diesem System eine vergleichsweise schnelle Dissoziation der Ribosomen von den Sec61-Komplexen. Zum ersten Mal konnten zudem Werte für die Dissoziationsratenkonstante bestimmt werden. Eine mögliche Erklärung für die schnelle Ablösung Ribosomen könnte das Fehlen von weiteren Membranproteinen im BIAcore-Assay sein, die in den zuvor durchgeführten Studien mit Mikrosomen in den PK-RM noch vorhanden waren.

4.5 Kritische Betrachtung der angewandten Methoden und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von Ribosomen an gereinigte Sec61-Komplexe analysiert. Obwohl dieser Prozess schon vielfach untersucht wurde und gut verstanden ist, gibt es immer noch Fragen, die einer genaueren Klärung bedürften. So ist bisher nicht gut beschrieben worden, warum in den ER-Membranen der bisher untersuchten Eukaryonten sowohl eine freie, als auch eine ribosomengebundene Form des Sec61-Komplex vorkommt. Betrachtet man den cotranslationalen Transport auf zellulärer Ebene ist es zwingend notwendig, dass freie Sec61-Komplexe in der Membran vorhanden sind, um als Rezeptor für Ribosomen zu dienen, die ein

sekretorisches Protein translatieren. Studien zeigten auch, dass der freie Sec61-Komplex eher Ribosomen-naszierende-Kette-SRP-Komplexe bindet als freie Ribosomen (Schaletzky und Rapoport, 2006). Jedoch wurde in dieser Studie keine Rücksicht auf die Bestandteile des Sec-Komplexes genommen und somit kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob nicht Bestandteile des Sec62/63-Komplexes die Ribosomenaffinität des freien Sec61 α beeinflussen. In der hier vorliegenden Studie wurde deswegen großen Wert auf die möglichst vollständige Entfernung der Komponenten des Sec62/63-Komplex aus den solubilisierten Membranen gelegt, bevor die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP weiter gereinigt wurden.

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Bindungsstudien in Detergenzlösung gelegt. Hierzu wurde zuerst getestet, ob Ribosomen überhaupt in der Lage sind in Detergenzlösung an Sec61-Komplexe aus der Hefe zu binden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass dies der Fall ist und dass sich auch die gebundenen von den ungebundenen Sec61-Komplexen trennen lassen. Werden in diesem Assay native aus Hefe oder anderen Organismen gewonnene Komponenten eingesetzt, bietet sich so die Möglichkeit die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Komplex semiquantitativ auch ohne markierte Komponenten zu untersuchen.

Diese Möglichkeit bietet prinzipiell auch die Untersuchung der Bindung eines Ligandens an einen immobilisierten Analyten mit Hilfe der SPR-Spektroskopie im BIAcore System. In dieser Arbeit wurde dieses System jedoch genutzt, um mit Hilfe des HA-Tag am Sss1p den Sec61-Komplex möglichst gerichtet auf dem Sensorchip zu immobilisieren. Dies ist ein kritischer Schritt in der Versuchsdurchführung, da aufgrund der Architektur der Chipoberfläche eine ausreichend große Menge des Sec61-Komplex in einem aktiven Zustand auf dem Chip gebunden vorliegen muss. Nach der Immobilisierung des Sec61-Komplexes wurden Ribosomen an diesen Komplex gebunden. Für die erfolgreiche Durchführung der Bindungsstudien ist es notwendig, dass gebundene Liganden auch wieder vom Chip entfernt werden können und somit der Analyt für einen neuen Messzyklus zur Verfügung steht. Dies konnte durch einen Waschschrift mit Hochsalzpuffer erreicht werden (vergl. Abb. 3.14). Somit war sichergestellt, dass nachfolgende Messungen nicht durch vorher gebundene Ribosomen verfälscht wurden. Die Analyse der durchgeführten Bindungsstudien zeigte, wie zuvor erwähnt, dass im BIAcore System die Bindung nicht dem „eins zu eins Modell“ des Massenwirkungsgesetzes folgt. Zur weitergehenden Auswertung bietet das Evaluationsprogramm auch die Möglichkeit die Freiheitsgrade bei der Berechnung der minimalen Fehlerabstände der Ausgleichsgeraden zu erhöhen. So können für

jede der in dem Versuch eingesetzten Ribosomenkonzentrationen die kinetischen Konstanten separat bestimmt werden oder eine Bindung von mehr als einem Sec61-Komplex an ein Ribosomen den Berechnungen zugrunde gelegt werden. In teilweise durchgeführten Berechnungen nach diesem Modell wurde auch eine bessere Annäherung der Ausgleichskurven an die gemessenen Werte erreicht. Da aber unbekannt ist, wie sich die Sec61-Komplexe auf dem Chip verhalten und führt eine Erhöhung der Freiheitsgrade zwar zu einer besseren Annäherung der Ausgleichskurven an die Sensorgramme, eine genauere Ermittlung der kinetischen Konstanten ist aber nicht möglich.

Zusammen genommen lässt sich also sagen, dass der hier vorgestellte Ansatz zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Ribosomen an gereinigte Sec61-Komplexe zum ersten Mal eine neue Methode beschreibt mit der die Bindung in Echtzeit verfolgt werden konnte. Bisher konnte die Dissoziationsrate von Ribosomen nur indirekt bestimmt werden. Auch hier bietet die Messung der SPR die Möglichkeit diesen Vorgang unmittelbar zu beobachten. So konnten Unterschiede in den Dissoziationsratenkonstanten zwischen Ribosomen aus Zytosol und von Membranen beobachtet werden, die vorher nicht erwartet wurden.

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie könnten diese Unterschiede genauer analysiert werden und die Untersuchungen etwa auf native Membranen und vorher nicht durch Puromycin/Hochsalz-Behandlung veränderte Ribosomen ausgeweitet werden. Solche Studien könnten auch klären, ob die Herkunft der Ribosomen oder die Translation zytosolischer bzw. sekretorischer Proteine die Affinität zu den freien Sec61-Komplexen in den ER-Membranen bestimmt, oder ob diese von der Membranseite aus reguliert wird.

5 Zusammenfassung

Die Bindung von Ribosomen an den Sec61-Translokationskomplex ist ein entscheidender Schritt während der cotranslationalen Translokation sekretierter Proteine. Hierbei bildet der trimere Sec61-Komplex die Pore, durch welche das naszierende Polypeptid in das Lumen des ER oder in dessen Membran inseriert wird. Neben den ribosomengebundenen Sec61-Komplexen (rSec61) wurden auch immer wieder freie Sec61-Komplexe (fSec61) in den Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums beobachtet. Sie bilden neben dem Sec-Komplex den Anteil der Translokationskomplexe, der nicht über seine Ribosomenassoziation isoliert werden kann.

In dieser Arbeit sollte dieser Anteil des Sec61-Komplexes genauer charakterisiert werden. Hierzu wurden sowohl die freie als auch die ribosomengebundene Population des Sec61-Komplexes aus rauen Membranen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert und analysiert. Im Anschluss wurde zuerst die Bindung von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituierte Komplexe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die rSec61-Komplexe als auch die fSec61-Komplexe in der Lage sind, Ribosomen zu binden. Es wurden jedoch keine substantiellen Unterschiede zwischen den Dissoziationskonstanten der rSec61- und der fSec61-Komplexe gefunden, die beide im Bereich von zuvor publizierten Werten liegen.

Zur genaueren Charakterisierung der Bindung von Ribosomen an die gereinigten Sec61-Komplexe wurden auch zwei weitere Methoden benutzt. So wurden Ribosomen in Detergenzlösung an die gereinigten Sec61-Komplexe gebunden und diese Bindung semiquantitativ über die Sedimentation durch einen Sucrosegradienten analysiert. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Populationen der Sec61-Komplexe. Schließlich wurde die Ribosomenbindung an die Sec61-Komplexe aus Digitoninextrakt und RAMP mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Spektroskopie im BIAcore System analysiert. So konnte zum ersten Mal die Bindung und die Dissoziation von Ribosomen an Sec61-Komplexe in Echtzeit untersucht werden. Die Dissoziationskonstanten dieser Bindung wurden bestimmt. Die Untersuchungen ergaben wiederum keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Sec61-Komplexpopulationen.

6 Literaturverzeichnis

- Adelman, M.R., Sabatini, D.D. und Blobel, G.** (1973). Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. *J Cell Biol*, **56**, 206-229.
- Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armanche, J-P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E.C. und Beckmann, R.** (2009). Structure of Monomeric Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome. *Science*, **328**, 1369-1373.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J.** (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, **278**, 2123-2126.
- Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J. und Blobel, G.** (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell*, **107**, 361-372.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.-
- Blobel, G. und Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, **67**, 835-851.
- Borgese, N., Mok, W., Kreibich, G. und Sabatini, D.D.** (1974). Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol*, **88**, 559-580.
- Boy, D. und Koch, H.** (2009). Visualization of distinct entities of the SecYEG translocon during translocation and integration of bacterial proteins. *Mol Biol Cell*, **20**, 1804-1815.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T.A., Kühlbrandt, W. und Collinson, I.** (2002). Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature*, **418**, 662-665.
- Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J. und Wickner, W.** (1990). The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, **62**, 649-657.

- Bullock, W.O., Fernández, J.M. und Short, J.M., (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques*, **4**, 376-378.
- Cannon, K.S., Or, E, Clemons, W M, Jr, Shibata, Y und Rapoport, T.A (2005).** Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol*, **169**, 219-225.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1992).** YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell*, **71**, 1143-1155.
- Cheng, Z., Jiang, Y., Mandon, E.C. und Gilmore, R. (2005).** Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation. *J Cell Biol*, **168**, 67-77.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 2110-2114.
- Connolly, T. und Gilmore, R. (1993).** GTP hydrolysis by complexes of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol*, **123**, 799-807.
- Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1987).** A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **105**, 633-645.
- Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1989).** SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **109**, 2653-2664.
- Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1990).** Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol*, **10**, 6024-6035.
- Duong, F. (2007).** Cell biology: fraternal twins. *Nature*, **446**, 741-743.
- Egea, P.F., Shan, S.O., Napetschnig, J., Savage, D.F., Walter, P. und Stroud, R.M. (2004).** Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature*, **427**, 215-221.
- Esnault, Y., Blondel, M.O., Deshaies, R.J., Schekman, R. und Kepes, F. (1993).** The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **12**, 4083-4093.

- Feldheim, D. und Schekman, R.** (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol*, **126**, 935-943.
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R.** (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol*, **12**, 3288-3296.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E. und Sommer, T.** (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *Embo J*, **15**, 1482-1494.
- Flower, A.M.** (2007). The SecY translocation complex: convergence of genetics and structure. *Trends Microbiol*, , .
- Focia, P.J., Shepotinovskaya, I.V., Seidler, J.A. und Freymann, D.M.** (2004). Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science*, **303**, 373-377.
- Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T. und Spang, A.** (2005). New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **22**, 1-12.
- Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P.** (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol*, **95**, 463-469.
- Görlich, D. und Rapoport, T.A.** (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. und Rapoport, T.A.** (1992a). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, **357**, 47-52.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. und Rapoport, T.A.** (1992b). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, **71**, 489-503.
- Green, N., Fang, H. und Walter, P.** (1992). Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **116**, 597-604.
- Gumbart, J. und Schulten, K.** (2006). Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J*, **90**, 2356-2367.

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. und Akey, C.W. . (1996).** Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-732.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T.A. (1994).** Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, **367**, 654-657.
- Holm, C., Meeks-Wagner, D.W., Fangman, W.L. und Botstein, D. (1986).** A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*, **42**, 169-173.
- Ish-Horowicz, D. und Burke, J.F. (1981).** Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*, **9**, 2989-2998.
- Jermy, A.J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B.M. und Stirling, C.J. (2006).** The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem*, **281**, 7899-7906.
- Jung, K.H., Trivedi, V.D. und Spudich, J.L. (2003).** Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol Microbiol*, **47**, 1513-1522.
- Jungnickel, B. und Rapoport, T.A. (1995).** A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **82**, 261-270.
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V. und Spiess, M. (2006).** The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Mol Biol Cell*, **17**, 4063-4068.
- Kalies, K., Stokes, V. und Hartmann, E. (2008).** A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 2375-2383.
- Kalies, K.U. und Hartmann, E. (1998).** Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur J Biochem*, **254**, 1-5.
- Kalies, K.U., Görlich, D. und Rapoport, T.A. (1994).** Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol*, **126**, 925-934.
- Kreibich, G., Ulrich, B.L. und Sabatini, D.D. (1978).** Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristics of rough microsomes. *The Journal of Cell Biology*, **77**, 464-487.

- Kurihara, T. und Silver, P.** (1993). Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. *Mol Biol Cell*, **4**, 919-930.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J. und Rapoport, T.A.** (2007). The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Mol Cell*, **26**, 511-521.
- Mai, P.** (2008). Dissertation: Untersuchungen zur Ribosomen-SecYEG-Interaktion und zur Funktion von RAMP4.
- Maillard, A.P., Lalani, S., Silva, F., Belin, D. und Duong, F.** (2007). Deregulation of the SecYEG translocation channel upon removal of the plug domain. *J Biol Chem*, **282**, 1281-1287.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T.A.** (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, **97**, 553-564.
- Ménétret, J., Hegde, R.S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Park, E., Rapoport, T.A. und Akey, C.W.** (2008). Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure*, **16**, 1126-1137.
- Ménétret, J.F., Hegde, R.S., Heinrich, S.U., Chandramouli, P., Ludtke, S.J., Rapoport, T.A. und Akey, C.W.** (2005). Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J Mol Biol*, **348**, 445-457.
- Ménétret, J.F., Schaletzky, J., Clemons, W.M.J., Osborne, A.R., Skanland, S.S., Denison, C., Gygi, S.P., Kirkpatrick, D.S., Park, E., Ludtke, S.J., Rapoport, T.A. und Akey, C.W.** (2007). Ribosome Binding of a Single Copy of the SecY Complex: Implications for Protein Translocation. *Mol Cell*, **28**, 1083-1092.
- Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U. und Hartmann, E.** (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem*, **275**, 14550-14557.
- Middendorf, L.R., Bruce, J.C., Bruce, R.C., Eckles, R.D., Grone, D.L., Roemer, S.C., Sloniker, G.D., Steffens, D.L., Sutter, S.L., und Brumbaugh, J.A.** (1992). Continuous, on-

- line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis*, **13**, 487-494.
- Misselwitz, B., Staeck, O. und Rapoport, T.A.** (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell*, **2**, 593-603.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., Ban, N. und Frank, J.** (2005). Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, **438**, 318-324.
- Mori, H., Tsukazaki, T., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Johnson, A.E., Kimura, Y., Akiyama, Y. und Ito, K.** (2003). Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem*, **278**, 14257-14264.
- Morrow, M.W. und Brodsky, J.L.** (2001). Yeast ribosomes bind to highly purified reconstituted Sec61p complex and to mammalian p180. *Traffic*, **2**, 705-716.
- Mothes, W., Prehn, S. und Rapoport, T.A.** (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J*, **13**, 3973-3982.
- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C. und Jovine, L.** (2003). Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *Embo J*, **22**, 3479-3485.
- Ng, D.T., Brown, J.D. und Walter, P.** (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 269-278.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T.A.** (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-570.
- Piliarik, M., Vaisocherová, H. und Homola, J.** (2009). Surface plasmon resonance biosensing. *Methods Mol Biol*, **503**, 65-88.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. und Rapoport, T.A.** (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, **94**, 795-807.
- Pohlschröder, M., Hartmann, E., Hand, N.J., Dilks, K. und Haddad, A.** (2005). Diversity and Evolution of Protein Translocation. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 91-111.

- Pool, M.** (2009). A trans-membrane segment inside the ribosome exit tunnel triggers RAMP4 recruitment to the Sec61p translocase. *J Cell Biol*, **185**, 889-902.
- Potter, M.D. und Nicchitta, C.V.** (2000). Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **275**, 33828-33835.
- Potter, M.D. und Nicchitta, C.V.** (2002). Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 23314-23320.
- Potter, M.D., Seiser, R.M. und Nicchitta, C.V.** (2001). Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol*, **11**, 112-115.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E. und Kalies, K.U.** (2000a). Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J*, **19**, 1900-1906.
- Prinz, A., Hartmann, E. und Kalies, K.U.** (2000b). Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **381**, 1025-1029.
- Raden, D., Song, W. and Gilmore, R.** (2000). Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *J Cell Biol*, **150**, 53-64.
- Rapoport, T.A.** (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450**, 663-669.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. und Kutay, U.** (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 271-303.
- Rich, R.L. und Myszka, D.G.** (2002). Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*, **15**, 352-376.
- Rich, R.L. und Myszka, D.G.** (2005). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*, **18**, 431-478.
- Rich, R.L. und Myszka, D.G.** (2008). Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*, **21**, 355-400.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. und Schekman, R.** (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol*, **109**, 2641-2652.

- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. und Silver, P.** (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J Cell Biol*, **109**, 2665-2675.
- Sanders, S.L., Whitfield, K.M., Vogel, J.P., Rose, M.D. und Schekman, R.W.** (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell*, **69**, 353-365.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sambrook, J., und Russell, D.W.,** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed, *Cold Spring Harbor, N.Y., CSHL Press*.
- Sauer-Eriksson, A.E. und Hainzl, T.** (2003). S-domain assembly of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 64-70.
- Savitz, A.J. und Meyer, D.I.** (1990). Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. *Nature*, **346**, 540-544.
- Schaletzky, J. und Rapoport, T.A.** (2006). Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*, **17**, 3860-3869.
- Schatz, P.J., Bieker, K.L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J. und Beckwith, J.** (1991). One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *E. coli* secretion machinery. *EMBO J*, **10**, 1749-1757.
- Scheuring, J., Braun, N., Nothdurft, L., Stumpf, M., Veenendaal, A.K., Kol, S., van der Does, C., Driessen, A.J. und Weinkauff, S.** (2005). The oligomeric distribution of SecYEG is altered by SecA and translocation ligands. *J Mol Biol*, **354**, 258-271.
- Shan, S.O. und Walter, P.** (2005). Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett*, **579**, 921-926.
- Shaw, A.S., Rottier, P.J. und Rose, J.K.** (1988). Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7592-7596.
- Simon, S.M. und Blobel, G.** (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **65**, 371-380.
- Simon, S.M. und Blobel, G.** (1992). Signal peptides open protein-conducting channels in *E. coli*. *Cell*, **69**, 677-684.
- Snapp, E.L., Reinhart, G.A., Bogert, B.A., Lippincott-Schwartz, J. und Hegde, R.S.** (2004). The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol*, **164**, 997-1007.

- Tam, P.C., Maillard, A.P., Chan, K.K. und Duong, F.** (2005). Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *Embo J*, **24**, 3380-3388.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M.H., Haas, I.G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R.** (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7214-7219.
- Unger, C.** (2000). Dissertation: Analyse funktioneller Domänen von SEC71 und SEC72 im posttranslationalen Translokationsprozeß von *Saccharomyces cerevisiae*.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C. und Rapoport, T.A.** (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36-44.
- Walter, K.** (2004). Dissertation: Eine genetische Studie zur Integration von C-terminal verankerten Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums.
- Walter, P. und Blobel, G.** (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, **91**, 557-561.
- Walter, P., Ibrahimi, I. und Blobel, G.** (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, **91**, 545-550.
- Wessel, D. und Flügge, U.I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.
- Wittke, S., Dunnwald, M., Albertsen, M. und Johnsson, N.** (2002). Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2223-2232.

7 Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-fluoro-orotic acid
μ	Mikro; 10 ⁻⁶
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton; Massenzahl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hepes	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp70	<i>heat shock protein</i> 70 kDa
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
K-RM	mit Hochsalz behandelte raue Membranen
LiOAc	Lithiumacetat
m	Meter
m	Milli; 10 ⁻³
M	Molar
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
min	Minute

mol	Stoffmenge
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano; 10^{-9}
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD ₂₆₀	optische Dichte gemessen bei 260 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
Pi	Proteaseinhibitor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK-RM	mit Puromycin und Hochsalz behandelte raue Membranen
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
RAMP	ribosome associated membran protein
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNC	ribosome nascent chain complex
rpm	<i>rounds per minutes</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>SBH1</i>	<i>Sec sixty-one beta Homolog 1</i>
<i>SBH2</i>	<i>Sec sixty-one beta Homolog 2</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecylsulfate
<i>SSH1</i>	<i>Sec sixty-one Homolog 1</i>
SR	SRP-Rezeptor
SRP	<i>signal recognition particle</i>
<i>SSS1</i>	<i>Sec sixty-one supressor 1</i>
TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
TRAM	<i>translocon associated protein</i>
TRAP	<i>translocating chain associating membrane protein</i>
<i>TRP1</i>	<i>TRP1</i> Selektionsmarker für Hefe

tRNA	transfer Ribonukleinsäure
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
W	Watt
Wt	Wildtyp
w/v	weight per volume
YPD	Vollmedium für Hefe mit Glukose versetzt (<i>yeast peptone dextrose</i>)

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Enno Hartmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das zur Verfügung gestellte Material. Seine Anregungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft während der gesamten Zeit waren stets hilfreich.

Priv.-Doz. Dr. Kai-Uwe Kalies danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Arbeit sowie das kritische Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Prof. Dr. Norbert Tautz danke ich für die freundliche Bereitschaft, der zweite Berichterstatter meiner Arbeit zu sein.

Bei der Bewältigung der experimentellen Arbeiten standen mir Ulrike Eickhoff und Susanne Allan hilfreich zur Seite. Besonders hervorheben möchte ich ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft und die freundliche Unterstützung, die sich bei weitem nicht nur auf die tägliche Laborarbeit beschränkten. Gerade dafür möchte ich mich besonders bedanken. Die Arbeit mit ihnen war mir eine große Freude! Danken möchte ich auch allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für die Hilfsbereitschaft, das nette Arbeitsklima und die vielen netten und bestärkenden Gespräche weit über das Thema dieser Arbeit hinaus. Besonders danken möchte ich zudem all denen, die sehr ausdauernd und kritisch das Manuskript dieser Arbeit durchgesehen haben.

All meinen Freunden danke ich für die Unterstützung, die Hilfe und das Verständnis während der gesamten Zeit. Ihr habt damit mindestens genauso viel Ausdauer bewiesen wie ich!

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mich immer unterstützt haben und an mich geglaubt haben.

Stephanie Wolff danke ich für die kritische Geduld während der gesamten Zeit.

„Eigentlich geht es darum, dass das Leben groß, wunderbar, wütend, verzweifelt, gigantisch, aggressiv, verblödet, melancholisch und albern ist. Alles, nur nicht klein und Scheiße!“

Sebastian Schipper

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Nicolas Danzenbächer, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Nicolas Danzenbächer