

Aus dem Institut für Biologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

**Untersuchungen zur Ribosomen-SecYEG-Interaktion  
und zur Funktion von RAMP4**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät -

vorgelegt von  
Petra Mai  
aus Hildesheim

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Kai-Uwe Kalies
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den

gez. Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. J. Prestin

*Falls Gott die Welt geschaffen hat,  
war seine Hauptsorge sicher nicht,  
sie so zu schaffen, dass wir sie verstehen*

*Albert Einstein*

*Falls Gott die Welt geschaffen hat,  
war seine Hauptsorge sicher nicht,  
sie so zu schaffen, dass wir sie verstehen*

*Albert Einstein*

*Wir wollen es nicht als selbstverständlich hinnehmen,  
dass das Leben sich voller in dem entfaltet,  
was man gewöhnlich für groß hält, als in dem,  
was man gewöhnlich für klein hält*

*Virginia Woolf*

*Wir wollen es nicht als selbstverständlich hinnehmen,  
dass das Leben sich voller in dem entfaltet,  
was man gewöhnlich für groß hält, als in dem,  
was man gewöhnlich für klein hält*

*Virginia Woolf*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG und ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Proteintranslokation an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und an der Cytoplasmamembran.....	1
1.1.1.1 <i>Der cotranslationale Transport</i> .....	2
1.1.1.2 <i>Der posttranslationale Transport</i> .....	4
1.1.2 Der proteinleitende Kanal.....	7
1.1.2.1 <i>Architektur des heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplexes</i> .....	7
1.1.2.2 <i>RAMP4 und weitere Bestandteile des proteinleitenden Kanals</i> .....	8
1.1.2.3 <i>Struktur des trimeren Komplexes und die Bildung der           proteinleitenden Pore</i> .....	9
1.1.3 Interaktion von Ribosomen mit der ER-Membran.....	12
<b>1.2 Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL und METHODEN</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Proteine.....	16
2.1.1.1 <i>Antikörper</i> .....	16
2.1.1.2 <i>Restriktionsendonukleasen</i> .....	16
2.1.1.3 <i>SecYEG-Komplex aus E. coli</i> .....	16
2.1.1.4 <i>Sonstige Proteine und Standards</i> .....	16
2.1.2 <i>Primer</i> .....	17
2.1.3 Ribosomen und ribosomale Untereinheiten.....	17
2.1.4 Raue Membranen vom Säuger.....	17
2.1.5 Plasmide.....	18
2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien.....	18
2.1.7 Wichtige Chemikalien und deren Bezugsquellen.....	20
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	20
2.2.2 Übernachtkulturen, Plasmidreinigung und Glycerinstocks.....	20
2.2.3 Restriktionsspaltung von Plasmiden.....	21
2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....	21
2.2.5 Aufkonzentrierung von Nukleinsäure durch Ethanolpräzipitation.....	21
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	22
2.2.7 Agarosegele.....	22
2.2.8 <i>In vitro</i> Transkription.....	22
2.2.9 <i>In vitro</i> Translation und <i>in vitro</i> Translokation.....	23
2.2.10 Präparation von Ribosomen aus Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums durch Puromycin-Hochsalz-Behandlung.....	23
2.2.11 Herstellung von salzbehandelten Membranen (K-RM).....	24

2.2.12	Präparation von gereinigten Sec61-Komplexen.....	24
2.2.13	Rekonstitution gereinigter Komplexe in Liposomen.....	25
2.2.13.1	<i>Lipidlösungen</i> .....	25
2.2.13.2	<i>Rekonstitution von gereinigten Sec-Komplexen in Proteoliposomen</i> .....	25
2.2.14	Ribosomenbindung an Proteoliposomen.....	25
2.2.15	Ribosomen-Komplex-Bindung in Detergenzlösung.....	26
2.2.16	rRNA-Footprinting.....	26
2.2.16.1	<i>Bindung</i> .....	27
2.2.16.2	<i>Chemische Modifizierung ribosomaler RNA, ribosomaler Untereinheiten und kompletter Ribosomen</i> .....	27
2.2.16.3	<i>Sequenzierung</i> .....	28
2.2.17	Proteinanalytische Methoden.....	29
2.2.17.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	29
2.2.17.2	<i>Westernblot und Antikörperinkubation</i> .....	29
2.2.17.3	<i>Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure</i> .....	29
2.2.17.4	<i>Coomassiefärbung</i> .....	30
2.2.17.5	<i>Silberfärbung</i> .....	30
2.2.18	Auswertung/Software.....	30
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung der Interaktion zwischen dem heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplex und Ribosomen mit Hilfe von RNA-Footprinting</b> .....	<b>31</b>
3.1.1	Direkte Sequenzierung ribosomaler RNA und Stabilität der Methode.....	32
3.1.2	Die Inkubation von isolierter 23S rRNA mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen führt zu <i>Footprints</i> und Basenverstärkungen.....	37
3.1.3	<i>In vitro</i> transkribierte 23S rRNA weist die gleiche Beeinflussung durch SecYEG-enthaltende Proteoliposomen auf wie isolierte rRNA.....	43
3.1.4	<i>Footprint</i> -Analysen mit kompletten Ribosomen und unterschiedlichen Lipiden... 45	
3.1.4.1	<i>Ribosomale Proteine bewirken eine andere Zugänglichkeit der rRNA, verhindern aber nicht lipidspezifische Effekte</i> .....	46
3.1.4.2	<i>Footprint-Analyse mit lipidfreien SecYEG-Komplexen in Lösung</i> .....	52
3.1.4.3	<i>Anionische Lipide sind notwendig für das Auftreten des Footprint-Pattern</i> ... 55	
3.1.4.4	<i>In PC/PE-Vesikel rekonstituiertes SecYEG verhält sich anders als mit 'E.coli Total Extrakt' rekonstituiertes SecYEG</i> .....	57
3.1.5	Führt der Austausch der Interaktionspartner auf rRNA- und Protein-Ebene zu gleichen Lipideffekten?.....	59
3.1.5.1	<i>Auch die 28S rRNA aus 80S Ribosomen wird durch die Inkubation mit proteinfreien Lipidvesikeln vor Modifizierungen geschützt</i> .....	59
3.1.5.2	<i>In 'E. coli Total Extrakt' rekonstituierte heterotrimere Sec61-Komplexe führten zu gleichen Modifikationsmustern wie SecYEG-Komplexe</i> .....	62
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 während der cotranslationalen Translokation</b> .....	<b>64</b>
3.2.1	Die Translokation ist in Abwesenheit von RAMP4 nicht beeinträchtigt.....	64

---

<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1 Untersuchung der Interaktion zwischen proteinleitenden Kanälen und rRNA/Ribosomen</b> .....	<b>68</b>
4.1.1 Mehrere Bereiche der 23S rRNA werden durch die Bindung mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und Lipidvesikeln in ihrer Zugänglichkeit beeinflusst.....	69
4.1.2 Ribosomale Proteine haben einen entscheidenden Einfluss auf das Modifikationsmuster, nicht aber auf die Lipideffekte.....	74
4.1.3 Lipide haben einen Einfluss auf die Ribosom-Kanal-Interaktion.....	76
4.1.4 Die Lipidzusammensetzung wirkt sich auf das Modifizierungsmuster aus.....	79
4.1.5 Kritische Betrachtung der Methode und Ausblick.....	83
<b>4.2 Untersuchungen des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 während der cotranslationalen Translokation</b> .....	<b>85</b>
4.2.1 RAMP4- <i>Knock-out</i> -Mäuse weisen eine verminderte Translation auf, aber keine beeinträchtigte Translokation.....	85
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>88</b>
<b>7. ABKKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>97</b>
<b>8. ANHANG</b> .....	<b>99</b>

# 1. EINLEITUNG und ZIELSETZUNG

## 1.1 Einleitung

Proteine sind zentrale Funktionsträger in allen zellulären Bereichen und gehören zu den Grundbausteinen aller Zellen. Die Synthese der meisten Proteine beginnt an freien Ribosomen im Cytoplasma. Nicht alle Proteine verbleiben jedoch dort. Als Folge der Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle mittels Ausbildung von Lipiddoppelschichten (Membranen) sind Mechanismen erforderlich, die einen selektiven Stoffaustausch ermöglichen und Proteine auf dem Weg zu ihrem Wirkort über verschiedene Membranen transportieren. Prokaryonten wie *Escherichia coli* (*E. coli*) weisen zwar eine weniger stark ausgeprägte Kompartimentierung auf, dennoch müssen auch hier Proteine in oder durch den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht der Cytoplasmamembran transportiert werden. Die meisten Proteine besitzen in ihrer Primärsequenz Signalsequenzen, die einen zielgerichteten Transport zu den jeweiligen Kompartimenten gewährleisten. Für den selektiven Transport sind spezielle Proteine selbst von zentraler Bedeutung. Sie bilden komplexe Translokationskanäle innerhalb der Membranen und ermöglichen so die Membranpassage der neu synthetisierten Proteine.

Proteine, die für Organellen des sekretorischen Weges (Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen) oder zur Sekretion bestimmt sind, werden bei Eukaryonten zunächst in das ER transportiert. Durch Vesikelabschnürung und anschließende Vesikelfusion mit der Membran der Zielorganellen erreichen sie schließlich ihren eigentlichen Zielort (Palade, 1975). Membranproteine, die nicht für die ER-Membran bestimmt sind, erreichen ebenfalls über Vesikeltransport ihren finalen Bestimmungsort. Der gerichtete Proteintransport zur Cytoplasmamembran der Prokaryonten ist in seinen zentralen Grundmechanismen und Bestandteilen homolog zu dem gerichteten Transport zur ER-Membran der Eukaryonten.

### 1.1.1 Proteintranslokation an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und an der Cytoplasmamembran

Proteine des sekretorischen Weges besitzen intrinsische Signalsequenzen (Blobel und Dobberstein, 1975), die als Sortierungssignal zur ER- bzw. Cytoplasmamembran dienen. Bei vielen Membranproteinen dienen diese Signalsequenzen neben der Zielsteuerung auch zur Verankerung der Proteine in der Membran, weswegen sie dort auch als Signalankersequenzen bezeichnet werden. Die Membranpassage bzw. -insertion der Proteine über/in die ER- bzw. Cytoplasmamembran erfolgt mit Hilfe eines Multi-Proteinkomplexes, der einen proteinleiten-

den Kanal bildet (Simon und Blobel, 1991, 1992). Der bei Eukaryonten als Sec61-Komplex (Translokton) und bei Eubakterien als SecY-Komplex (Translokase) bezeichnete Kanal ist evolutionär konserviert, woraus auf eine frühe evolutionäre Entwicklung des Translokationsapparates geschlossen werden kann (Hartmann *et al.*, 1994). Die eigentliche proteinleitende Pore wird von dem heterotrimeren Sec61-Komplex bzw. dem heterotrimeren SecYEG-Komplex gebildet. Die Existenz eines solchen Kanals wurde 1975 von Blobel und Dobberstein vorgeschlagen. Erste Indizien für diese Hypothese zeigten sich ab den späten 1980er Jahren durch eine Reihe biochemischer, genetischer sowie biophysikalischer Experimente (Deshaies und Schekman, 1987; Rothblatt *et al.*, 1989; Simon und Blobel, 1991; Görlich *et al.*, 1992). Durch die Rekonstitution gereinigter, heterotrimerer Komplexe in Proteoliposomen erfolgte der Beweis, dass es sich um die essentielle Membrankomponente für die Proteintranslokation handelt (Brundage *et al.*, 1990; Görlich und Rapoport, 1993).

Der Transport über bzw. in die ER-Membran oder die Cytoplasmamembran kann cotranslational oder posttranslational erfolgen. Im ersten Fall werden die Proteine noch während sie vom Ribosom translatiert werden über die Membran transportiert. Beim posttranslationalen Transport hingegen erfolgt die Translokation erst nach beendeter Translation.

#### ***1.1.1.1 Der cotranslationale Transport***

Der cotranslationale Transport von Proteinen wurde am detailliertesten im *in vitro* Säugersystem untersucht. Die meisten Proteine der Säuger und fast alle Cytoplasmamembranproteine der Bakterien gelangen cotranslational an die Membran. Der cotranslationale Transport beginnt mit der *Targeting*-Phase, bei der das *Signal Recognition Particle* (SRP) die N-terminale Signalsequenz der naszierenden Proteinkette erkennt und spezifisch bindet, sobald diese das Ribosom verlässt (Abb. 1.1; Walter *et al.*, 1981).

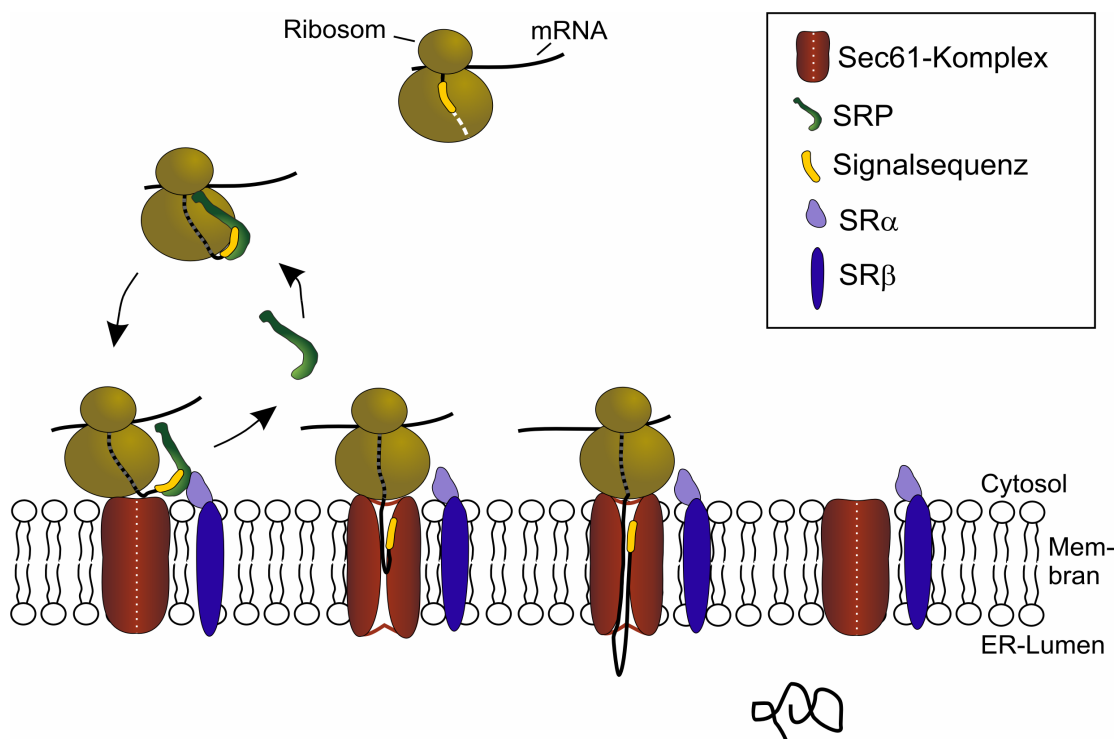
Das SRP ist ein Ribonukleoprotein, welches bei Eukaryonten aus sechs Proteinen und einer 7S RNA zusammengesetzt ist (Nagai *et al.*, 2003; Sauer-Eriksson und Hainzel, 2003). Neben der Bindung des SRP an die Signalsequenz kommt es zudem zu einem Kontakt zwischen dem SRP und dem Ribosom, wodurch die Elongation der Peptidkette verlangsamt wird (Walter und Blobel, 1981). Damit wird diese in einem translokationskompetenten Zustand gehalten und gelangt als SRP-Ribosom-naszierende-Kette-Komplex an die ER-Membran (Abb. 1.1). Dort interagiert das SRP mit einem aus zwei Untereinheiten bestehenden membranständigen Rezeptor, dem *Signal Recognition Particle Receptor* (SR). Dessen  $\alpha$ -Untereinheit ist ein peripheres Membranprotein, welches fest assoziiert mit der  $\beta$ -Untereinheit, einem integralen Membranprotein, vorliegt (Gilmore *et al.*, 1982). Die geordnete Abfolge des zielgerichteten

Transportes zur Membran und die anschließende Übertragung der naszierenden Kette an den proteinleitenden Kanal wird von den drei GTPasen SR $\alpha$ , SR $\beta$  und der 54 kDa-Untereinheit des SRP reguliert (Gilmore *et al.*, 1982; Connolly und Gilmore, 1989; Connolly und Gilmore, 1993). Die GTP-Form des SR $\alpha$  weist eine hohe Affinität zum SRP auf. Durch die Interaktion wird die Bindung des SRP für das Signalpeptid schwächer und die naszierende Kette wird an den heterotrimeren Sec61-Komplex übertragen. Nach GTP-Hydrolyse löst sich das SRP vom Ribosom, wodurch der Translationsarrest aufgehoben wird, und nach erfolgreicher Erkennung einer funktionellen Signalsequenz erfolgt die cotranslationale Translokation der Polypeptidkette (Jungnickel und Rapoport, 1995). Durch die Bindung des Ribosoms an den Translokationsapparat wird der unidirektionale Transport der naszierenden Kette durch den proteinleitenden Kanal garantiert. Im inaktiven Zustand ist der Kanal geschlossen, während der Translokation aber kommt es zu einer Weitung der Pore (Hamman *et al.*, 1997, 1998). Auf der luminalen Seite bleibt die Pore so lange verschlossen, bis die naszierende Kette eine Länge von etwa 70 Aminosäuren erreicht hat (Crowley *et al.*, 1994).

Als treibende Kraft für die Translokation dient die Elongation der Polypeptidkette (Jungnickel und Rapoport, 1995). Sobald die naszierende Kette in den Translokationskanal inseriert wird, wird die Bindung zwischen dem Ribosom und der Membran resistent gegenüber Hochsalzbedingungen (Kalies *et al.*, 1994). Die Signalsequenz sekretorischer Proteine wird meist nach Erreichen einer bestimmten Länge der naszierenden Kette auf der luminalen Seite abgespalten (Blobel und Dobberstein, 1975; Evans *et al.*, 1986). Signalankersequenzen besitzen keine Schnittstelle zur Entfernung des Sortierungssegmentes.

Bei Bakterien werden neben den meisten Membranproteinen auch einige sekretorische Proteine über den SRP-abhängigen Weg transportiert (Phillips und Silhavy 1992; Lührink *et al.*, 1994). Der Prozess des cotranslationalen *Targetings* und Proteintransportes zeigt sowohl in seinem Mechanismus als auch in den Bestandteilen Homologien zum *Targeting* und Transport der Säuger. Das SRP der Bakterien ist aus dem 48 kDa großen Protein Ffh (*Fifty four homologue*), welches homolog zur 54 kDa-Untereinheit des eukaryontischen SRP ist, sowie einer 4.5S RNA zusammengesetzt (Brown und Fournier, 1984; Phillips und Silhavy, 1992). Das Protein FtsY ist homolog zu dem SR $\alpha$  der Eukaryonten. Ein homologes Protein zur  $\beta$ -Untereinheit wurde bisher nicht identifiziert, dennoch liegt das FtsY neben der cytosolischen Form zu 30% als cytoplasmamembranassoziierte Form vor. Ungeklärt sind bisher noch die Funktion der löslichen Form und die Art der Assoziation des FtsY mit der Membran. Vermutlich erfolgt die Bindung durch den geladenen N-Terminus und dessen Interaktion mit den Lipiden der Membran (Lührink *et al.*, 1994; Zelazny *et al.*, 1997; Millmann *et al.*, 2001;

Angelini *et al.*, 2006). Trotz des Fehlens einer Transmembrandomäne (Gill und Salmond, 1990) ist das FtsY teilweise resistent gegenüber einer alkalischen Karbonatextraktion (Luirink *et al.*, 1994; de Leeuw *et al.*, 1997). Analog zum Säugersystem werden auch im bakteriellen System der zielgerichtete Transport zur Cytoplasmamembran und die korrekte Freisetzung des SRP durch GTP und die GTPasen Ffh und FtsY reguliert (Carson *et al.*, 1991). Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Frage nach der Existenz eines Translationsarrestes in der prokaryontischen Zelle, da die im Säugersystem für den Arrest verantwortlichen SRP-Bestandteile im Bakterien-SRP fehlen (Luirink und Sinning, 2004). Funktionell können *in vitro* das bakterielle SRP und SR wirkungsvoll die Säugerkomponenten ersetzen (Powers und Walter, 1997).



**Abb. 1.1: Modell des cotranslationalen Transportes im Säuger**

Sobald die naszierende Kette das Ribosom verlässt, kann SRP sowohl an die Signalsequenz als auch an das Ribosom binden. Der Ribosom-naszierende-Kette-SRP-Komplex bindet an die ER-Membran, indem es zu Wechselwirkungen zwischen dem SRP und dem SRP-Rezeptor (SR) kommt. Daraufhin wird die Signalsequenz vom SRP auf den Sec61-Komplex übertragen und es erfolgt die Translokation der naszierenden Kette durch die proteinleitende Pore. Nach erfolgter Translokation und Abspaltung der Signalsequenz (nicht dargestellt) liegt das Protein im Lumen des ER vor. Der Proteintransport in Bakterien ist in seinen Grundmechanismen und Bestandteilen homolog zu dem der Säuger. Zur näheren Erklärung siehe Text.

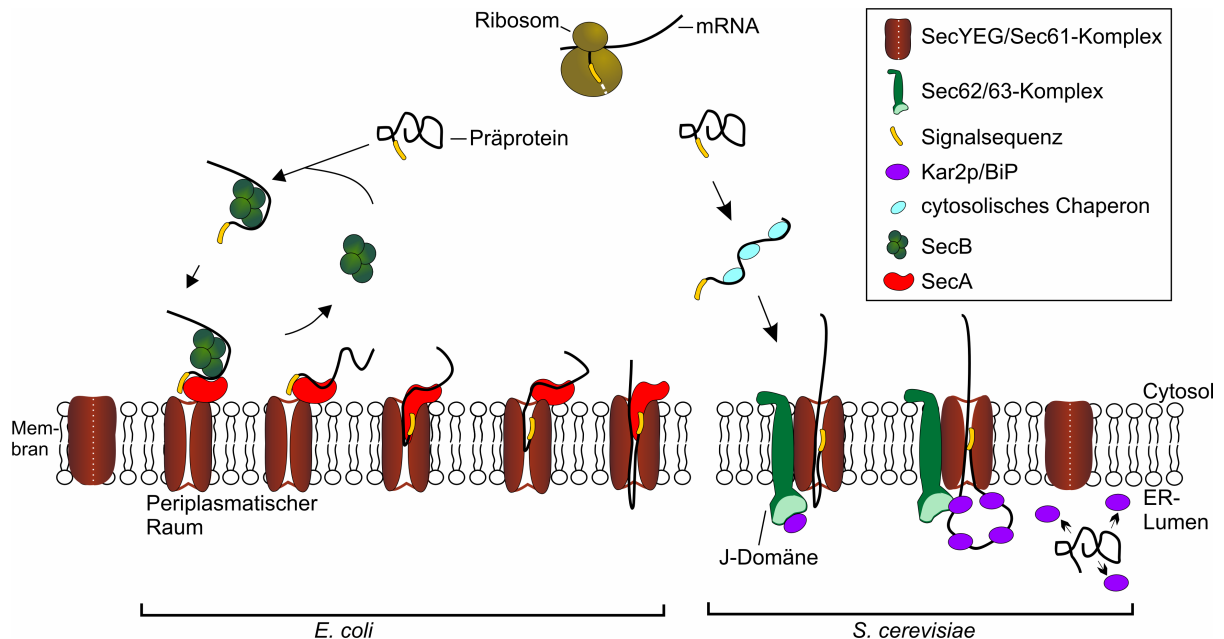
### 1.1.1.2 Der posttranslationale Transport

Bei der posttranslationalen Translokation werden die Proteine, nachdem sie vollständig synthetisiert und vom Ribosom freigesetzt wurden, durch Chaperone in einem translokationskompetenten Zustand gehalten, um den Transport durch die proteinleitende Pore zu gewährleisten (Abb. 1.2; Chirico, 1992).

Für Eukaryonten wurde der Großteil der Erkenntnisse zur posttranslationalen Translokation am Modellorganismus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) gewonnen (Matlack *et al.*, 1999). Proteine mit weniger hydrophoben Signalsequenzen als beim SRP-abhängigen *Targeting* werden in der Hefe bevorzugt posttranslational transloziert, einige Proteine können aber auch beide Wege nutzen (Ng *et al.*, 1996). Über das *Targeting* zur ER-Membran ist wenig bekannt. An der Membran interagiert die Signalsequenz der Polypeptidkette mit dem heptameren Translokationsapparat, der als Sec-Komplex bezeichnet wird. Der Sec-Komplex setzt sich aus dem heterotrimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/Sec63-Komplex, bestehend aus den essentiellen Proteinen Sec62p und Sec63p sowie Sec71p und Sec72p, zusammen (Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995). Die proteinleitende Pore wird wie beim cotranslationalen Transport vom trimeren Sec61-Komplex gebildet. Ein heptamerer Komplex dieser Kombination wurde bisher nur für die Hefe beschrieben. Im Säuger wurden nur die Proteine Sec62 und Sec63 identifiziert, deren genaue Funktion aber noch unbekannt ist (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Als treibende Kraft für die Translokation wird die Brownsche Molekularbewegung angesehen. Das passive Zurückgleiten des Proteins in den cytoplasmatischen Raum wird durch die Bindung des Chaperons Kar2p, bzw. BiP im Säuger, auf der luminalen Seite des ER unterbunden (Abb. 1.2). Die Rekrutierung und Aktivierung von Kar2p/BiP an den Sec-Komplex erfolgt durch die luminalen J-Domäne des Sec63p, vermittelt durch die Hydrolyse von ATP. Die ADP-Form von Kar2p/BiP bindet fest an das translozierende Präprotein und bewirkt, dass das Zurückgleiten in den cytoplasmatischen Raum durch den „Stopper“ Kar2p/BiP verhindert wird. Gleitet das Präprotein wiederholt weit genug in Richtung Lumen, bindet erneut ein Kar2p/BiP-Molekül. Somit kommt es zum sukzessiven, indirekt passiven Transport des Präproteins durch den Kanal („Brownsche Ratsche“) (Matlack *et al.*, 1999). Ob BiP beim Verschluss der luminalen Seite auch im cotranslationalen Transport eine Rolle spielt, ist bisher unklar, essentiell ist es jedoch nicht (Brodsky *et al.*, 1995; Hamman *et al.*, 1998).

Bei *E. coli* tragen die meisten posttranslational transportierten Proteine ebenfalls weniger hydrophobe Signalsequenzen und sind für den periplasmatischen Raum, die bakterielle Hüllmembran oder zur Sekretion bestimmt. Das Präprotein wird durch das homotetramere Chaperon SecB in einem translokationskompetenten Zustand gehalten (Randall *et al.*, 1990) und gelangt so an die Membran (Abb. 1.2; Weiss *et al.*, 1988; Kumamoto *et al.*, 1989; Shilton *et al.*, 1998; Randall und Hardy, 2000, 2002). Das Präprotein wird nachfolgend auf die ATPase SecA übertragen, welche als Homodimer mit hoher Affinität an den SecYEG-Komplex bindet (Hartl *et al.*, 1990; Snyders *et al.*, 1997). Die Bindungsaffinität hängt dabei

stark von dem geladenen Lipid Phosphatidylglycerol ab (Lill *et al.*, 1990; Hendrick und Wickner, 1992; Breukink *et al.*, 1992; Millmann *et al.*, 2001). Die Translokation des Proteins erfolgt im Gegensatz zur Hefe aktiv. Die Bindung von ATP an SecA bewirkt eine Konformationsänderung im SecA, die zu einer Insertion des SecA und des an ihm gebundenen Präproteins in die Membran am SecYEG führt. Die anschließende ATP-Hydrolyse verursacht die Deinsertion des SecA, während das Präprotein im SecYEG verbleibt. Erneute ATP-Bindung sowie -Hydrolyse und die damit verbundene zyklische Konformationsänderung des SecA am SecYEG führen so zu einer sukzessiven Translokation des Präproteins (20 - 30 Aminosäuren pro Insertion und Deinsertion) (Economou und Wickner, 1994; Uchida *et al.*, 1995; Yahr und Wickner, 2000). Ist das erste Segment des Präproteins über die Membran transportiert, kann sich das elektrochemische Membranpotential ebenfalls fördernd auf den Transport auswirken, *in vivo* ist es essentiell (Schiebel *et al.*, 1991). Obwohl das für die posttranslationale Translokation essentielle SecA für den cotranslationalen Transports nicht notwendig ist (Scotti *et al.*, 1999), wird eine Rolle von SecA bei der Integration von Membranproteinen mit stark ausgeprägten periplasmatischen Domänen auch für den SRP-abhängigen Weg diskutiert (Holland, 2004).



**Abb. 1.2: Modell des posttranslationalen Transportes**

Schematische Darstellung der posttranslationalen Translokation in *E. coli* (links) und *S. cerevisiae* (rechts). Die proteinleitende Pore wird ebenfalls vom Sec61-Komplex bzw. dem homologen bakteriellen SecYEG-Komplex gebildet. Nach der vollständigen Synthese des Proteins im Cytosol wird es durch Chaperone in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Bei *E. coli* erfolgt der Transport aktiv durch die ATPase SecA. In *S. cerevisiae* geschieht die Translokation des Proteins passiv durch die brownische Molekularbewegung und ist abhängig von Kar2p. Das Chaperon Kar2p verhindert durch die Bindung an das Protein auf der luminalen Seite des ER ein Zurückgleiten durch die Pore. Weitere Erläuterungen siehe Text.

## 1.1.2 Der proteinleitende Kanal

### 1.1.2.1 Architektur des heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplexes

Der heterotrimere Sec61-Komplex der Eukaryonten bzw. SecYEG-Komplex der Eubakterien ist die zentrale Komponente beim Transport von Proteinen über/in die ER-Membran der Eukaryonten bzw. Cytoplasmamembran der Eubakterien (Brundage *et al.*, 1990; Görlich und Rapoport, 1993). Beide Komplexe durchspannen die hydrophobe Membran und bilden eine wassergefüllte, proteinleitende Pore (Simon und Blobel, 1991; Crowley *et al.*, 1993, 1994). Bei Säugern setzt sich der heterotrimere Komplex aus den Untereinheiten Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  und Sec61 $\gamma$  zusammen und weist zum Teil Homologien sowohl zu den Untereinheiten des SecYEG-Komplexes der Eubakterien als auch zu den Untereinheiten des SecYE $\beta$ -Komplexes der Archaea auf (siehe Tabelle 1; Stirling *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1994). Der heterotrimere Sec61-Komplex zählt zusammen mit weiteren Membranproteinen zu den Ribosom-assoziierten-Membranproteinen (RAMPs), da er nach erfolgter Solubilisierung von Membranen an den Ribosomen assoziiert vorliegt (Görlich und Rapoport, 1993).

**Tabelle 1:** Komponenten des Translokationsapparates innerhalb der drei Reiche. Homologe Untereinheiten der heterotrimeren Sec-Komplexe von Eukaryonten, *E. coli* und Archaea sind jeweils in einer Zeile aufgeführt.

Reich	Eukaryonten		Eubakterien	Archaea
<i>Beispiel</i>	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i> ( <i>M. jannaschii</i> )
Komplex	Sec61	Sec61	SecYEG	SecYE $\beta$
Untereinheiten	Sec61 $\alpha$	Sec61p	SecY	SecY
	Sec61 $\beta$	Sbh1p		Sec61 $\beta$
	Sec61 $\gamma$	Sss1p	SecE	SecE
			SecG	

Die Hauptkomponente des proteinleitenden Kanals ist das SecY bzw. Sec61 $\alpha$ . Dabei handelt es sich um Membranproteine mit 10 membrandurchspannenden Bereichen (Transmembrandomänen, TMD), deren C- wie N-Termini im Cytoplasma lokalisiert sind (Mori und Ito, 2001). Mit Hilfe von Quervernetzungsstudien und photoreaktiven Sonden wurde gezeigt, dass die SecY/Sec61 $\alpha$ -Untereinheit die eigentliche Pore bildet. Bereiche der naszierenden Kette innerhalb der Membran konnten ausschließlich zu verschiedenen Domänen der SecY/Sec61 $\alpha$ -Untereinheit quervernetzt werden (Görlich *et al.*, 1992; Joly und Wickner, 1993; Mothes *et al.*, 1994).

SecE und die homologe Untereinheit der Eukaryonten Sec61 $\gamma$  besitzen in der Regel nur eine TMD, in einigen Bakterien wie *E. coli* liegen zwei zusätzliche TMD vor, welche aber nicht essentiell sind (Schatz *et al.*, 1991). Der C-Terminus des Proteins ist in das Lumen des ER bzw. des Periplasmas gerichtet, das N-terminale Ende ins Cytoplasma (Veenendaal *et al.*, 2004).

Die Untereinheiten Sec61 $\beta$  und SecE (eine TMD bei Eukaryonten und Archaea, zwei bei Eubakterien) sind nicht homolog zueinander (Hartmann *et al.*, 1994) und im Gegensatz zu den Untereinheiten Sec61 $\alpha$ /SecY und Sec61 $\gamma$ /SecE nicht essentiell (Deshaies und Schekman, 1987; Stirling *et al.*, 1992; Kalies *et al.*, 1998). In Proteoliposomen rekonstituierte SecYEG-Komplexe wiesen einen aktiven Proteintransport auf, das SecE wirkte sich lediglich translokationsfördernd aus ((Akimura *et al.*, 1991; Brundage *et al.*, 1992; Nishiyama *et al.*, 1993; Hanada *et al.*, 1994; Duong und Wickner, 1997).

#### **1.1.2.2 RAMP4 und weitere Bestandteile des proteinleitenden Kanals**

Neben dem heterotrimeren Sec61-Komplex wurden eine Reihe weiterer Proteine identifiziert, die ebenfalls mit den Ribosomen assoziiert vorliegen (Görlich und Rapoport, 1993). Dazu gehört unter anderem das Protein RAMP4 (*ribosom associated membran protein 4*). Die genaue Funktion des RAMP4 ist bisher noch ungeklärt. In *in vitro* Translokationsversuchen mit rekonstituierten Proteoliposomen wirkte es sich nicht translokationsfördernd aus, so dass keine essentielle Funktion von RAMP4 für die Translokation vermutet wurde (Görlich und Rapoport, 1993). Neuere Daten zeigten, dass Zellen unter Stressbedingungen RAMP4 überexprimieren, wodurch die Aggregation und/oder Degradierung von neu synthetisierten Membranproteinen verhindert wurde (Yamaguchi *et al.*, 1999). Zudem interagiert es vermutlich mit spezifischen Polypeptidketten (Schröder *et al.*, 1999). Lee *et al.* (2003) zeigten ferner, dass RAMP4 eines der Zielgene des Transkriptionsfaktors XBP-1 ist, welcher durch ER-Stress aktiviert wird. Die bisher erhobenen Daten zur Analyse der Funktion von RAMP4 lassen daher eine Rolle bei der Stabilisierung von ER-Proteinen während ER-Stress vermuten.

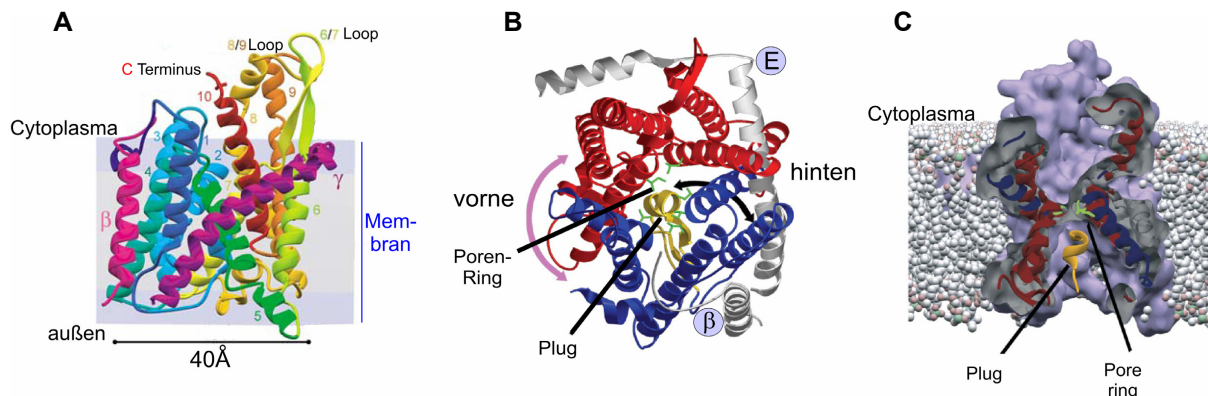
Für den Transport einiger Substrate ist neben dem heterotrimeren Sec61-Komplex und dem SRP-Rezeptor zudem das Membranprotein TRAM (*translocon associated membrane protein*) erforderlich, bei anderen Substraten wurde eine Steigerung der Translokationseffizienz durch TRAP (*translocon associated protein*) beobachtet (Hartmann *et al.*, 1993; Görlich und Rapoport, 1993; Oliver *et al.*, 1995).

Die genaue Funktion im Rahmen des Translokationsprozesses ist bisher nur für das Sec61/SecYEG gut verstanden. Sequenzanalysen der eukaryontischen Proteine TRAP, TRAM und RAMP4 lassen vermuten, dass es außerhalb der Eukaryonten keine homologen Proteine gibt und für TRAP und TRAM liegen bisher keine Hinweise für homologe Proteine in der Hefe vor (Kalie und Hartmann, 1998).

### 1.1.2.3 Struktur des trimeren Komplexes und die Bildung der proteinleitenden Pore

Kristallstrukturdaten der proteinleitenden Pore bestätigten die bereits vermutete Assemblierung zu einem trimeren SecYEG- bzw. Sec61-Komplex in einem äquimolaren Verhältnis aus seinen drei heterologen Untereinheiten (Görlich und Rapoport, 1993; van den Berg *et al.*, 2004). Hingegen wird die Anzahl der Komplexe, die zur Assemblierung der Pore notwendig sind, bis heute kontrovers diskutiert.

Der Aufbau eines trimeren SecYEG/Sec61-Komplex lässt sich aufgrund der Kristallstrukturdaten eines einzelnen, nichttranslozierenden, heterotrimeren SecYE $\beta$ -Komplexes (Abb. 1.3 A; van den Berg *et al.*, 2004) wie folgt beschreiben: Die SecY-Untereinheit mit ihren 10 TMD bildet zwei pseudosymmetrische Hälften, die sich in die Bereiche der TMD 1-5 und 6-10 unterteilen lassen. Das SecE formt eine Art Klammer und „umfasst“ die beiden Pseudo-Domänen des SecY auf zwei Seiten, häufig als Klappmuschelmodell beschrieben, in dem das SecE die Schale der Klappmuschel darstellt. SecG/ $\beta$  befindet sich an der dritten Seite, hat wenig Kontakt zur SecY-Untereinheit und lässt eine Seite unverdeckt, so dass sich diese Seite des SecY lateral zur Membran hin öffnen kann (Abb. 1.3 B). Dieses Modell ermöglicht eine gute Vorstellung von der lateralen Integration von Membranproteinen (Flower, 2007). Photocrosslinkexperimente stützen das Modell, dass der Translokationskanal sich seitlich öffnet, um Membranproteine in die Lipiddoppelschicht zu entlassen (Martoglio *et al.*, 1995).



**Abb. 1.3: Architektur des SecYE $\beta$ -Komplexes.**

(A) Anordnung der Transmembrandomänen (TMD) des SecYE $\beta$ -Komplexes innerhalb der Membran (van den Berg *et al.*, 2004; modifiziert). (B) Blick vom Cytoplasma auf den Komplex. (C) Querschnitt des Komplexes (Rapoport, 2007; modifiziert). In (B) und (C) Unterteilung in die TMD 1-5 (blau) und TMD 6-10 (rot) mit der ange deuteten lateralen Öffnung (lila Pfeil) und dem Plug (gelb), dessen Verlagerung während der Öffnung des Kanals durch den schwarzen Pfeil markiert ist. Die hydrophoben Reste des Poren-Ringes sind grün hervorgehoben.

Neben dem „lateralen Tor“ sind anhand der Kristallstruktur zwei weitere wichtige strukturelle Komponenten identifiziert worden: Eine kurze helikale Struktur der TMD 2 (TMD 2a), welche als „Plug“ definiert wurde und den Kanal zur periplasmatischen Seite hin verschließt, sowie sechs hydrophobe Reste im engsten Bereich des Kanals, die eine Art

Poren-Ring bilden. Letzterer und der *Plug* werden für das Verschließen des Kanals verantwortlich gemacht (siehe Abb. 1.3 B, C; van den Berg *et al.*, 2004). Für den Verschluss des Kanals und die Aufrechterhaltung der Membranbarriere wurden zunächst das Ribosom auf der cytosolischen Seite und das eukaryontische Chaperon BiP auf der luminalen Seite verantwortlich gemacht (Hamman *et al.*, 1998). Strukturdaten von Ribosom-Kanal-Komplexen ließen jedoch einen  $\sim 12 - 15$  Ångström (Å) großen Spalt zwischen Ribosom und Kanal erkennen, so dass die Hypothese, dass das Ribosom als „Abdichtungselement“ dient, unwahrscheinlich ist (Beckmann *et al.*, 1997; Ménétret *et al.*, 2000). Durch die Identifizierung der *Plug*-Domäne innerhalb der SecY-Untereinheit wurde postuliert, dass der Kanal selbst für die Abdichtung verantwortlich ist (van den Berg *et al.*, 2004). Erstaunlicherweise brachten aber *Plug*-deletionen sowohl bei *E. coli* als auch bei *S. cerevisiae* lebensfähige Mutanten hervor (Li *et al.*, 2007; Junne *et al.*, 2006). Dies konnte damit erklärt werden, dass sich andere Bereiche innerhalb des SecY zu neuen *Plugs* formieren, womit sich die Relevanz des *Plugs* verdeutlichte (Osborne und Rapoport, 2007). Diese Schlussfolgerung wurde unter anderem dadurch unterstützt, dass der *Plug*-Domänen-Bereich der TMD 2 in seiner Sequenz nur schwach konserviert ist und es somit anderen Bereichen möglich ist, diese Funktion zu übernehmen (van den Berg *et al.*, 2004). Die Öffnung der Pore bei beginnender Translokation, die mit einer Weitung der Pore und einer Verlagerung des *Plugs* einhergeht, konnte mit Hilfe biochemischer Experimente und anhand von Computermodellen gut erklärt werden und unterstützt die *Plug*-theorie (Cannon *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005; Gumbart und Schulten, 2006; Tian und Andricioaei, 2006; Maillard *et al.*, 2007).

Erste Aufnahmen des proteinleitenden Kanals erfolgten mittels Elektronenmikroskopie (EM) und Negativkontrastierung von detergenten-solubilisierten Sec61-Heterotrimeren, rekonstituierter, gereinigter Proteinkomplexe sowie nativer ER-Membranen vom Hund (*Canis lupus familiaris*, *C. lupus familiaris*) und *S. cerevisiae* (Hanein *et al.*, 1996). Es zeigten sich ringartige Strukturen mit einem Gesamtdurchmesser von 85 - 100 Å und einer zentralen Ausstülpung von  $\sim 20$  Å in der Mitte des Ringes, die als proteinleitende Pore beschrieben wurde. Ähnliche Ringstrukturen mit einem Gesamtdurchmesser von 85 Å wurden ferner bei in SecYE-Komplexen beobachtet, die in Proteoliposomen rekonstituiert wurden (Meyer *et al.*, 1999). Anhand der Größe der beobachteten Ringstrukturen wurde vermutet, dass sich der Translokationskomplex aus zwei bis vier Kopien heterotrimerer SecYEG/Sec61-Komplexe zu Oligomeren zusammenlagert (Hanein *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1999; Manting *et al.*, 2000; Collinson *et al.*, 2001) und der Oligomerisierungsprozess durch Ribosomen oder dem Sec62/63-Komplex stimuliert wird (Hanein *et al.*, 1996). Auch für den SecYEG-Komplex

wurde für den Translokationsprozess eine Oligomerisierung beschrieben, die durch die Zugabe von SecA aktiviert wird (Manting *et al.*, 2000). Dies gilt sowohl für SecYEG-Komplexe in Lösung als auch für Komplexe innerhalb einer Lipiddoppelschicht (Bessonneau *et al.*, 2002).

Kryoelektronenmikroskopische (Kryo-EM) Aufnahmen von Sec61-Ribosomen-Komplexen zeigten ebenfalls eine oligomere, ringartige Zusammenlagerung von drei bis vier Komplexen mit einem Durchmesser von 100 - 125 Å und einer zentralen Porenweite von 15 - 35 Å (Beckmann *et al.*, 1997; Ménétret *et al.*, 2000). Der Bereich des Ribosoms, an dem die naszierende Polypeptidkette das Ribosom verlässt, wird als *Exit*-Tunnel bezeichnet (Bernabeu und Lake, 1982) und stellt die Mündung eines Tunnels dar, der die große Untereinheit durchzieht. Er hat seinen Ursprung im Peptidyltransferasezentrum und ist etwa 100 Å lang und 10 - 20 Å breit (Yonath *et al.*, 1987). Der *Exit*-Tunnel konnte mit der postulierten Pore des SecYEG/Sec61-Kanals zur Deckung gebracht werden (Beckmann *et al.*, 1997, 2001; Ménétret *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2002). Somit ergab sich ein Modell, in dem sich drei bis vier heterotrimere SecYEG- bzw. Sec61-Komplexe „donutartig“ zu einer aktiven Translokationspore zusammenlagern und die Pore an der Interphase aller SecYEG/Sec61-Komplexe ausgebildet wird (Beckmann *et al.*, 1997; Manting *et al.*, 2000; Breyton *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2002).

Kryo-EM Strukturen von Ribosom-Kanal-Komplexen mit detergenzsolubilisierten SecYEG/Sec61-Komplexen von *E. coli*, *S. cerevisiae* und Säugern mit verbesserter Auflösung ließen zwar weiterhin eine ringartige Zusammenlagerung mehrerer Komplexe erkennen. Der „*low density*“ Bereich im Zentrum des „Donuts“, der als Pore interpretiert wurde, war aber nicht mehr sichtbar (Beckmann *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2005; Ménétret *et al.*, 2007). Quervernetzungsstudien zeigten zudem, dass mehrere *Crosslinker* innerhalb einer SecY-Untereinheit nur Disulfid-Brücken mit dem cysteinhaltigen translozierenden Protein erzeugten, wenn sich das Protein an der engsten Stelle der Pore befand. Dies deutet darauf hin, dass sich die Translokationspore innerhalb einer SecY-Untereinheit befindet und nicht an der „Interphase“ von mehreren SecY-Komplexen (Cannon *et al.*, 2005; Osborne und Rapoport, 2007).

Der in Detergenzlösung als Monomer kristallisierte SecYE $\beta$ -Komplex von Archaea (van den Berg *et al.*, 2004) ließ sich sehr gut mit den 2D-Kryo-EM-Daten eines in eine Lipiddoppelschicht eingebetteten SecYEG-Dimers zur Deckung bringen (Breyton *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Tatsache und des hohen evolutionären Konservierungsgrades der eukaryontischen und bakteriellen SecYEG/Sec61-Komplexe wird angenommen, dass sich alle Komplexe strukturell ähnlich verhalten wie der SecYE $\beta$ -Komplex. Des Weiteren wurde daraus geschlossen, dass es für die Anordnung keinen Unterschied macht, ob der Komplex in Detergenzlösung vorliegt oder in eine Lipiddoppelschicht eingebettet ist. Zudem scheint die

Ausbildung von Dimeren bzw. die Oligomerisierung des Komplexes keinen Einfluss auf die Anordnung der TMD und damit auf die Konformation der SecYEG-Komplexe zu haben.

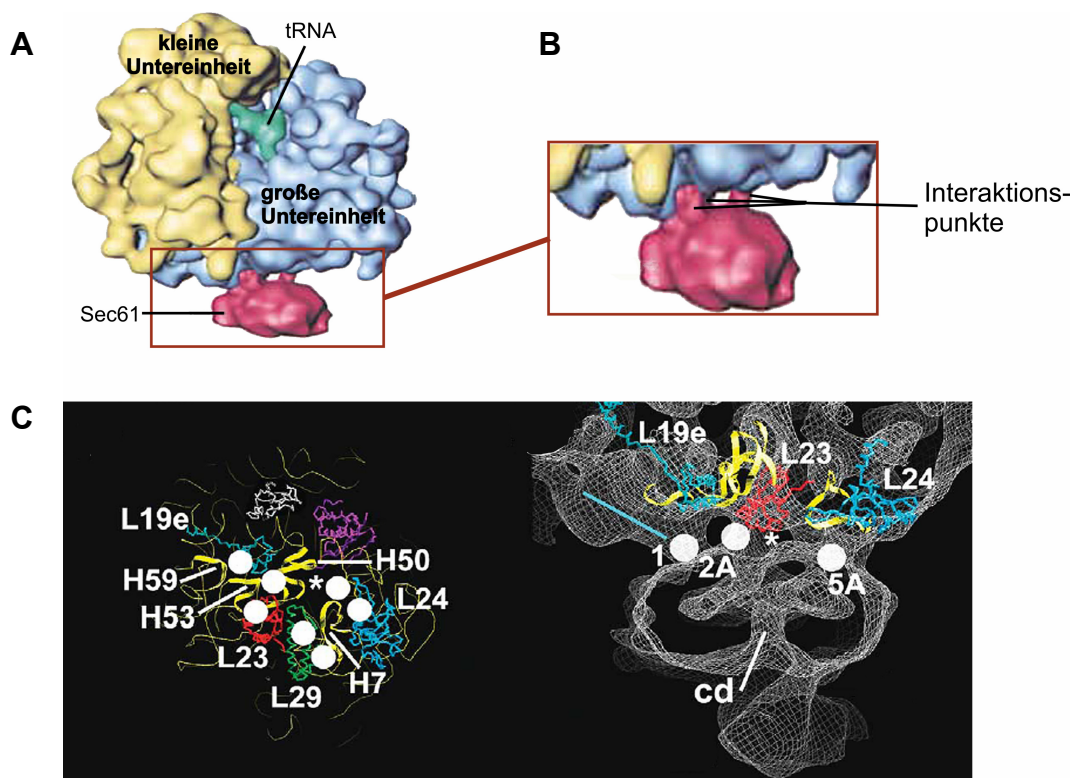
Die Fähigkeit der Selbstassemblierung zu Oligomeren aus Monomeren, Dimeren und Tetrameren (Bessonneau *et al.*, 2002; Scheuring *et al.*, 2005) und deren Bedeutung für die Translokation ist bisher unklar. Denkbar wären eine Rolle zur Stabilisierung der Ribosom-Kanal-Interaktionen oder/und das Präsentieren zusätzlicher Interaktionspunkte für weitere Komponenten des SecYEG/Sec61-Komplexes.

### 1.1.3 Interaktion von Ribosomen mit der ER-Membran

Während der cotranslationalen Translokation kommt es zu einer Interaktion des Ribosom mit der ER-Membran bzw. Cytoplasmamembran (Randall und Hardy 1983; Tai *et al.*, 1983; Walter und Johnson, 1994; Herskovits und Bibi, 2000; Prinz *et al.*, 2000). Durch die Verwendung gereinigter, rekonstituierter heterotrimerer Sec61-Komplexe konnte gezeigt werden, dass der heterotrimere Komplex den Hauptinteraktionspartner für das Ribosom darstellt (Kalies *et al.*, 1994). Der Komplex kann sowohl translatierende Ribosomen als auch Ribosomen ohne naszierende Kette binden (Kalies *et al.*, 1994). Als spezifischer Interaktionspartner konnte die 28S bzw. 23S rRNA der großen Untereinheit von eukaryontischen und prokaryontischen Ribosomen identifiziert werden (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003). Ob die Lipide der Membran für den Interaktionsprozess mit den Ribosomen eine Rolle spielen, ist bisher unklar. Für Bakterien konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von anionischen Phospholipiden für die funktionelle Rekonstitution notwendig ist und nicht-Bilayer-formende Lipide die Translokationseffizienz steigern (van der Does *et al.*, 2000). Bei Quervernetzungs-experimenten konnte die Signalsequenz während des Insertionsprozesses in den proteinleitenden Kanal sowohl mit Komponenten des Kanals als auch mit Lipiden der Membran verbunden werden, woraus geschlossen wurde, dass die Translokationspore sich seitlich zur Membran hin öffnet (Martoglio *et al.*, 1995; Mothes *et al.*, 1998). Inwiefern das Ribosom mit den Lipiden der Membran interagiert, bleibt dabei ungewiss. Neben hochaffinen Wechselwirkungen zwischen rRNA und heterotrimeren Komplexen könnten für die Interaktion auch niedrigaffine Wechselwirkungen zwischen Lipid und rRNA eine Rolle spielen.

Auch die Bindung der Ribosomen an die Membran ist evolutionär konserviert, da sowohl prokaryontische Ribosomen an das eukaryontische Translokon als auch eukaryontische Ribosomen an den prokaryontischen Translokationskomplex binden (Prinz *et al.*, 2000). Sequenzalignments und Sekundärstrukturvergleiche der 28S rRNA und 23S rRNA ließen innerhalb der ersten drei Domänen hochkonservierte Bereiche erkennen, die als mögliche Inter-

aktionspartner zwischen Ribosom und SecYEG/Sec61-Komplexen postuliert wurden (Prinz *et al.*, 2000). Konstrukte der in sechs Domänen einteilbaren prokaryontischen 23S rRNA (Brimacombe, 1995; Schnare *et al.*, 1996) zeigten, dass die Domänen I und II und/oder III (Nukleotide 1 - 1646) für eine effiziente Bindung mit dem proteinleitenden Kanal ausreichend sind (Behrens, 2003). Die Kryo-EM-Strukturdaten mit verbesserter Auflösung zeigten drei bis sieben stützenartige Interaktionspunkte zwischen der großen ribosomalen Untereinheit und den SecYEG/Sec61-Komplexen (Abb. 1.4). Diese befanden sich in der Nähe des *Exit*-Tunnels (Morgan *et al.*, 2002; Ménétret *et al.*, 2005, 2007). Durch die Überlagerung der 3D-Struktur der ribosomalen rRNA wurden mehrere rRNA Helices und ribosomale Proteine beschrieben, die in räumlicher Nähe zu den beobachteten Verbindungen lagen (Ménétret *et al.*, 2005, 2007). Folgende Helices und ribosomale Proteine wurden aufgrund der Überlagerung als Interaktionspartner postuliert: C1: Bereiche der Helix (H) 59 sowie das Protein L19; C2A: H50 und H53 mit L23; C2B: L23 und Bereiche der H53; C3: Bereich der H24; C4A: Bereiche der H7 mit L29; C4B: L29, H7; C5A: L24; C5B: L24 und H7 (Abb. 1.4; Ménétret *et al.*, 2005).



**Abb. 1.4: Kontaktstellen zwischen dem Ribosom und dem Translokator**

Darstellung von Kontaktstellen zwischen dem Ribosom und dem Translokator durch Kryo-EM-Strukturen (A) Ribosom-Kanal-Strukturen mit der kleinen ribosomalen Untereinheit in gelb und der großen Untereinheit in blau. Der proteinleitende Kanal, in rot dargestellt, zeigt mehrere stützenartige Verbindungen zur großen Untereinheit des Ribosoms; siehe Vergrößerung in (B) (Beckmann *et al.*, 2001). (C) Blick von der Membran auf die große, gebundene ribosomale Untereinheit (links) und Seitenansicht der Ribosom-Translokator-Interaktion (rechts) mit dem *Exit*-Tunnel des Ribosoms (weißer Stern) und der zentralen Vertiefung im Sec61-Komplex (*central depression*, cd), welche den proteinleitenden Kanal darstellt. Ribosomale Proteine (farbig) und rRNA (gelb), die sich in der Nähe der Verbindungen befinden, wurden hervorgehoben (Ménétret *et al.*, 2005).

Innerhalb des proteinleitenden Kanals wurden die cytosolischen *Loops* 6/7 und 8/9 der SecY-Untereinheit als essentiell für die Ribosomenbindung identifiziert, wie es ebenso für die Eukaryonten beobachtet wurde (Raden *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Ménétret *et al.*, 2007). Mutationen innerhalb dieser Bereiche verhinderten die Bindung zum Ribosom (Ménétret *et al.*, 2007). In der gezeigten Struktur dienen diese *Loops* zur Interaktion mit dem ribosomalen Protein L23 der großen Untereinheit der Bakterien, von dem bisher angenommen wurde, dass es an allen bekannten Interaktionen am *Exit*-Tunnel des Ribosoms beteiligt ist (Kramer *et al.*, 2002; Ferbitz *et al.*, 2004; Halic *et al.*, 2004; Schaffitzel *et al.*, 2006; Dalley *et al.*, 2008). Eine direkte Beteiligung von ribosomalen Proteinen im cotranslationalen Transport konnte zum einen durch *Crosslinks* zwischen L23 sowie L29 und *Trigger* Faktor gezeigt werden, ein Chaperon, das an der Faltung von cytosolischen Proteinen beteiligt ist (Kramer *et al.*, 2002). Zum anderen liegen Daten über eine Interaktion des SRP mit L25, dem homologen ribosomalen Protein zu L23 aus der Hefe, vor (Dalley *et al.*, 2008). Biochemische Daten über eine direkte Interaktion von ribosomalen Proteinen mit dem proteinleitenden Kanal fehlen allerdings bisher. Für eine effiziente Bindung der rRNA an den proteinleitenden Kanal scheinen die ribosomalen Proteine nicht notwendig zu sein, da die Dissoziationskonstanten zwischen isolierter rRNA, *in vitro* transkribierter 23S rRNA und 70S Ribosomen vergleichbar sind (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003).

## 1.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des RAMP Sec61 bzw. seines bakteriellen homologen Proteinkomplexes SecYEG sowie die Funktion von RAMP4 während der cotranslationalen Translokation eingehender untersucht werden.

Hauptbestreben dieser Arbeit war es, die bereits durch Bindungs- und Kompetitionsanalysen gezeigte hochaffine Bindung von Ribosomen mit proteinleitenden Kanälen durch die Anwendung der *Footprint*-Methode weiter auf rRNA-Ebene zu charakterisieren. Diese Methode ermöglicht es, die rRNA während der Interaktion mit einem Liganden direkt zu untersuchen, mit dem Ziel Bereiche der rRNA identifizieren zu können, die durch die Bindung vor Modifizierungen geschützt werden. Dies sollte unter anderem dazu genutzt werden, Bindungsstellen im Ribosom genauer zu lokalisieren. Durch die Verwendung von isolierter 23S rRNA aus ribosomalen Untereinheiten und nativen 70S Ribosomen sollte zudem analysiert werden, ob durch die Anwesenheit ribosomaler Proteine eine Veränderung im Modifizierungsmuster detektiert werden kann und somit ein Einfluss ribosomaler Proteine offensichtlich wird. Weiterhin sollte die Relevanz von Lipiden für den Kanal sowie ihr direkter Einfluss für die Interaktion untersucht werden.

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion des für den Transport von Proteinen nichtessentiellen RAMP4 zu erhalten, sollte die Proteintranslokation über die ER-Membran mit Membranen von RAMP4-*knock-out*-Mäusen im *in vitro* Translokations-Assay untersucht werden.

## 2. MATERIAL und METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Proteine

##### 2.1.1.1 Antikörper

Zielprotein	Peptid Sequenz (Bezeichnung)	Herkunft/Referenz
<b>Primäre Antikörper</b>		
Sec61 $\alpha$ (C-Terminus)	C-KEQSEVGSMSGALLF	Görlich <i>et al.</i> , 1992
Sec61 $\alpha$ (N-Terminus)	C-YPIKLFYISN	AG Hartmann
Sec61 $\beta$	DEQILKRRNV-C	AG Hartmann
SecE	ARTEVRKVIWPTRQE	AG Hartmann
Ribosomale Proteine	AK gegen humane ribosomale Proteine	USBiological (# R2031-25)
RAMP4	VAKQRIRMANC	Görlich und Rapoport, 1993
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Ziege anti-Human-IgG	Antiserum gegen humanes IgG	Sigma
Ziege anti-Kaninchen-IgG	Peroxidase (POD)-gekoppelte Ziege anti-Kaninchen-Antikörper	Sigma
<b>Tertiäre Antikörper</b>		
Kaninchen anti-Ziege-IgG	Peroxidase (POD)-gekoppelte Kaninchen anti-Ziege-Antikörper	Sigma

##### 2.1.1.2 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen (*Pst*I, *Not*I, *Pvu*II, *Xmn*I) sowie die entsprechenden Gebrauchspuffer wurden von der Firma NEB bezogen.

##### 2.1.1.3 SecYEG-Komplex aus *E. coli*

Der SecYEG-Komplex aus *E. coli* wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Tom A. Rapoport (Harvard Medical School; Boston, USA) überlassen. Der Komplex wurde aus dem *E. coli*-Stamm C43 aufgereinigt.

##### 2.1.1.4 Sonstige Proteine und Standards

Proteine	Bezugsquelle
BSA, <i>Purified</i> [10mg/ml] (für Coomassie/Silber-Gele)	NEB
<i>MassRuler</i> <sup>TM</sup> <i>DNA Ladder, Mix, ready-to-use</i> Marker für Agarose Gele	Fermentas
MMLV-Reverse Transkriptase [200U/ $\mu$ l]	Promega

<i>PageRuler</i> ; Proteinstandard für SDS-PAGE	Fermentas
RNasin [20U/μl]	Promega
RQ1-RNase free DNase [1U/μl]	Promega
T7 RNA-Polymerase	Promega

### 2.1.2 Primer

Die für die Sequenzierung und die Sequenzreaktionen der modifizierten Proben (*Footprint*-versuche, siehe 2.2.16.3) verwendeten *Primer* wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert (Reinigungsgrad HPLC). Sie tragen am 5'-Ende eine Fluoreszenzfarbstoffmarkierung (IRD 800).

Bezeichnung <i>Primer</i>	Sequenz 5' → 3'
Für die 23S rRNA:	
Sp1a	GCC TCA TTA ACC TAT GGA TTC
Sp1b	CTC GGT TGA TTT CTT TTC CTC
Sp2	CAT CGA GCT CAC AGC ATG TGC
Sp4	TAA GTC GCT GTC CCA TTA TAC
Sp5	ACC TGT TTC CCA TCG ACT ACG
Sp6	TCG CCC GGC CAA CAT AGC CTT C
Sp8	CGA TTT GAT GTT ACC TGA TGC
TP2	TAG CCC CGT TAC ATC TTC CGC
TP3	CCG CTT TAT CGT TAC TTA TGT C
Für die 28S rRNA:	
PM-Mus1a	CGA CGC TCA GAC AGG CGT AG
PM-Mus2b	TAG ATG GAG TTT ACC ACC CGC
PM-Mus3	TGA ATC CTC CGG GCG GAC TGC
PM-Mus6	CCG CGA CGC TTT CCA AGG C
PM-MusTP2	CAG CGC CAT CCA TTT TCA GG

### 2.1.3 Ribosomen und ribosomale Untereinheiten

Prokaryontische ribosomale Untereinheiten sowie 70S Ribosomen (*E. coli*) wurden uns freundlicher Weise von Dr. R. Brimacombe (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) überlassen. Eukaryontische 80S Ribosomen wurden durch Puromycin-Hochsalz (PK)-Behandlung rauer Hundemembranen (hRM) gewonnen (siehe 2.2.10).

### 2.1.4 Raue Membranen vom Säuger

Als Ausgangsmaterial zur Präparation so genannter rauer Membranen (RM) von Maus (*Mus musculus*, *M. musculus*) und Hund (*C. lupus familiaris*) wurde das Pankreas verwendet. Endprodukte der Präparationen sind Mikrosomen des rauen endo-plasmatischen Retikulums. Die Präparation erfolgte nach Walter und Blobel (1983). Raue Mausmembranen (mRM)

wurden uns freundlicher Weise von Dr. Osamu Hori (Abteilung für Neuroanatomie, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa City, Ishikawa, Japan) überlassen. Die Präparation rauer Hundemembranen (hRM) erfolgte innerhalb der Arbeitsgruppe. Die Endkonzentration der RM wurde so eingestellt, dass 1 µl eine OD<sub>280</sub> von 50 hat, was einem Äquivalent (1 eq) entspricht (Walter *et al.*, 1981).

### 2.1.5 Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Herkunft
pGEMppL	codierende Sequenz für das Präprolaktin, Amp <sup>r</sup>	AG Hartmann
pGEMT7ppα30-6xHis	codierende Sequenz für den Präpro-α-Faktor, Amp <sup>r</sup>	AG Hartmann
pTNT/rGH	codierende Sequenz für das Wachstumshormon rGH ( <i>rat Growth Hormone</i> ), mit <i>XhoI</i> und <i>NotI</i> in den Vektor pTNT inseriert, Amp <sup>r</sup>	Dr. O. Hori (Kanazawa City, Japan)
pTNT/mIns	codierende Sequenz für Insulin mins ( <i>mouse Insulin</i> ), mit <i>XhoI</i> und <i>NotI</i> in den Vektor pTNT inseriert, Amp <sup>r</sup>	Dr. O. Hori (Kanazawa City, Japan)
pXBwt	Gen der 23S-rRNA; <i>XbaI/BamHI</i> -Fragment des <i>rrnB</i> -Operons aus <i>E.coli</i> ; Vektor pXB (Derivat von pSPT-19, Pharmacia), Amp <sup>r</sup>	Prof.Dr.J. Remme, Tartu, Estland

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck, Roth oder Roche bezogen (Reinheitsgrad p.a.). Puffer, Lösungen und Medien wurden sterilfiltriert (0.2 µm) oder, wenn möglich, bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

#### *Allgemeine Puffer, Lösungen und Medien*

#### **0.1% DEPC-Wasser:**

1 ml DEPC ad 1000 ml Aqua bidest (A. bidest); über Nacht bei 37 °C inkubiert, 2-mal autoklaviert

#### **Ampicillin-Stock-Lösung:**

100 mg/ml (Na-Salz) in A. bidest

#### **dNTP-Mix:**

je 7.5 mM

#### **ddNTP/dNTP-Mix:**

je dNTP 7.5 mM, jeweils ein ddNTP 4 mM

#### **Detergenzien:**

*Digitonin*: 5%ige Stammlösung in A. bidest, präpariert nach Görlich *et al.*, 1992

*Deoxy BIGCHAP*: 10%ig (w/v) in A. bidest oder Methanol

#### **Elektrophorese-Puffer (einfach):**

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS

#### **LB-Medium (Luria-Bertani):**

1% (w/v) Trypton; 0.5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl

**LB-Platten:**

LB-Medium mit 2% (w/v) Bacto-Agar

**Membranpuffer (MB):**

50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 250 mM Saccharose; 1 mM DTT

**MS<sub>5+150</sub>-Puffer:**

50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 150 mM KAc; 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; 250 mM Saccharose, 1mM DTT

**MS<sub>5+150</sub>-OSOD-Puffer:**

MS<sub>5+150</sub>-Puffer, ohne Saccharose und ohne DTT

**MS<sub>5+120</sub>-OSOD-Puffer:**

50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 120 mM KAc; 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>

**rNTP-Mix:**

je rNTP 25mM

**Protease-Inhibitoren (PI)-Mix:**

10 mg/ml Aprotinin in A. bidest; 10 mg/ml Leupeptin in A. bidest; 5 mg/ml Pepstatin in DMSO;  
4 mg/ml Chymostatin in DMSO

**SDS-Proben/Ladepuffer (2-fach) (2 x PP/DTT):**

125 mM Tris-HCl pH 8.8; 4% SDS; 20% (v/v) Glycerin; 200 mM DTT; 0.02% (w/v) Bromphenolblau

**TAE (50-fach):**

2 M Tris; 50 mM EDTA-(Na)<sub>2</sub>; 5.7% (v/v) Eisessig pH 8.5

**TBE (10-fach):**

890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 25 mM EDTA-(Na)<sub>2</sub>

**TBT (10-fach):**

500 mM Tris-HCl pH 7.5; 1.5 M NaCl; 1% (v/v) Tween

*Puffer und Lösungen für die Footprint-Experimente:***Extraktionspuffer:**

300 mM NaAc pH 6.5; 0.5% SDS; 5 mM EDTA pH 8.0

**DMS-Stopp-Puffer:**

1 M Tris-HCl pH 7.5; 100 mM EDTA pH 8.0; 1 M 2-Mercaptoethanol

*Lösungen zum Anfärben von Proteinen in SDS-Gelen:***Coomassie-Färbelösung:**

45.5% Methanol; 9.2% Essigsäure; 0.25% Brilliant Blue R 250

**Entfärber für coomassiegefärbte Gele:**

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

**Thiosulfat-Lösung:**

0.02% Natriumthiosulfat

**Silbernitrat-Lösung:**

0.2% Silbernitrat; 0.02% Formaldehyd (37%ig)

**Entwickler:**

3% Natriumcarbonat; 0.05% Formaldehyd (37%ig); 0.0005% Natriumthiosulfat

**Stopp-Lösung:**

0.5% Glycin

### 2.1.7 Wichtige Chemikalien und deren Bezugsquellen

Chemikalie	Bezugsquelle
BIGCHAP, Deoxy	Calbiochem
BioBeads <sup>®</sup> SM-2 Adsorbent (20-50mesh)	Bio-Rad
Digitonin	Sigma
DMS [10.6 M]	Merck
<sup>35</sup> S-Methionin [37MBq/100µl]	Hartmann Analytik
<i>Lipide:</i>	Avanti
<i>E. coli Polar Lipid Extract</i> (# 100600C, 25mg/ml)	PolarLipids
DOPC (# 850375C, 10mg/ml)	
DOPE (# 850725C, 10mg/ml)	
DOPS (# 840035C, 10mg/ml)	
DOPG (# 840475C, 10mg/ml)	
PI (# 840044C, 10mg/ml)	
<i>Chemikalien für die Sequenzgele</i>	
Borsäure, PlusOne	Pharmacia Biotech
EDTA disodium salt, PlusOne	Pharmacia Biotech
RapidGel <sup>™</sup> - XL-40% Concentrate	USB, Ohio, USA
Sequitherm Stop/Gel-Loading Buffer for LI-COR <sup>®</sup>	Epicentre
TRIS, PlusOne	Amersham Biosciences
Urea, PlusOne	Amersham Biosciences

## 2.2 Methoden

Alle angegebenen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel (2001) ausgeführt.

### 2.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

100 µl chemokompetente *E. coli* Zellen (DH5α) wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt, für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend einem 1 - 2 minütigen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach anschließender 1 - 2 minütiger Inkubation auf Eis wurden zum Transformationsansatz 800 µl LB-Medium gegeben und für 30 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Aliquots des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (0.1 mg/ml Endkonzentration) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht (ü.N.) inkubiert.

### 2.2.2 Übernachtskulturen, Plasmidreinigung und Glycerinstocks

Nach erfolgreicher Transformation wurde eine Einzelkolonie des gewünschten Klons mittels Impföse in 20 ml LB-Medium überführt. Die Zellen wurden ü.N. bei 37 °C in Selektivmedium (Ampicillin [0.1 mg/ml] Endkonzentration) angezogen (180 rpm). Die Reinigung der

Plasmide erfolgte mit dem *Nucleo Spin Plasmid Kit* (Macherey & Nagel) nach den Angaben des Herstellers. Zur dauerhaften Lagerung der Klone wurden 975 µl der ü.N.-Kultur mit 225 µl 80%igem Glycerin (v/v) gemischt und bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.3 Restriktionsspaltung von Plasmiden

Die Linearisierung der Plasmide erfolgte nach Standardmethoden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *Nucleo Spin Extract Kit II* (Macherey & Nagel) nach den Angaben des Herstellers. Qualität und Quantität (mittels MassRuler™ DNA Ladder) der Spaltung wurden mittels Agarosegel überprüft.

Liste verwendeter Restriktionsendonukleasen und Genprodukte nach erfolgter *in vitro* Transkription bzw. *in vitro* Translation:

<u>Genprodukt</u>	<u>Endonuklease</u>
Präprolaktin	<i>Pst</i> I
Präpro- $\alpha$ -Faktor	<i>Kpn</i> I
Wachstumshormon ( <i>Rattus norvegicus f. domestica</i> )	<i>Not</i> I
InsulinII ( <i>M. musculus</i> )	<i>Not</i> I
23S rRNA ( <i>E.coli</i> ), 3163 nt	<i>Xmn</i> I

### 2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung ribosomaler RNA aus 50S Untereinheiten der Ribosomen von *E.coli* und zur Aufreinigung von *in vitro* Transkripten wurden die Volumina der Proben mit A. bidest auf 150 µl eingestellt. Die Probe wurde mit 1 Vol. Phenol (Roti®-Aqua-Phenol, ROTH) versetzt, gemischt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (3 min, 14000 rpm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5415D). Die wässrige Phase wurde wie zuvor beschrieben zunächst mit ½ Vol. Phenol und ½ Vol. Chloroform (Trichlormethan/Chloroform, Rotipuran, ROTH) und abschließend mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend der Ethanolpräzipitation unterzogen. Im Falle der Aufreinigung und Aufkonzentrierung der modifizierten RNA bei den *Footprint*versuchen siehe 2.2.16.

### 2.2.5 Aufkonzentrierung von Nukleinsäure durch Ethanolpräzipitation

Die zu präzipitierende Probe wurde mit 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2.5 Vol. bzw. 0.6 Vol. (für Proben nach der *in vitro* Transkription) absolutem Ethanol gemischt und bei -20 °C für 20 min gefällt. Die RNA wurde sedimentiert (15 min, 14000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5417R, 4 °C) und das Pellet mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 0.1% DEPC-Wasser resuspendiert.

### 2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA, mRNA, rRNA, Ribosomen und modifizierter rRNA erfolgte photometrisch durch Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260nm}$ ). Die Messung der RNA erfolgte in 1% SDS, die von DNA in A. bidest. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1.0 bei einer Schichtdicke von 1 cm bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml, bei DNA von 50 µg/ml.

### 2.2.7 Agarosegele

Zur Analyse von isolierter ribosomaler RNA bzw. Ribosomen, linearisierten Plasmiden und Transkripten wurden die Proben mit 5 x DNA-Lade-Puffer (1 x TAE mit 60% Saccharose; 0.05% Bromphenolblau) versehen und in 0.8%igen bis 1%igen (w/v; in 1 x TAE) Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Der Gellauf erfolgte bei 100 V und 500 mA. Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert und die gefärbten Nukleinsäuren mit Hilfe von UV Licht (312 nm) sichtbar gemacht.

### 2.2.8 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden eingesetzt:

3-5	µg linearisierte Plasmid-DNA
5	µl T7-Polymerase
2.5	µl rNTP-Mix
10	µl 100mM DTT
10	µg BSA
200	U RNasin
20	µl 5-fach Transkriptionspuffer (Promega)
ad 100	µl mit A. bidest

Die Transkription erfolgte für insgesamt 4 h bei 37 °C, wobei nach 2 h erneut 2 µl rNTP-Mix und 2 µl T7-Polymerase zugegeben wurden. Nach der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion sowie Ethanolpräzipitation wurde die mRNA in 0.1% DEPC-Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die optimale Konzentration des Transkriptes für die Translation wurde mit Hilfe des Retikulozyten-Lysates austitriert (2.2.9).

Nach erfolgter *in vitro* Transkription des geschnittenen Plasmides pXBwt wurde dem Ansatz 2 µl 'RQ1 RNasefreie DNase' hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließend gereinigte und aufkonzentrierte RNA konnte direkt für die rRNA-*Footprint*-Versuche eingesetzt werden.

### 2.2.9 *In vitro* Translation und *in vitro* Translokation

Für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markierten Proteinen wurde das '*Rabbit-Retikulo-cyte-Lysat-System, Nuclease Treated*' (RRL, Promega) verwendet. Endogene Membranen des Lysates wurden zuvor sedimentiert (5 min, 4 °C, 14000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5417R).

Für die mRNA-Titration wurden eingesetzt:

- 7 µl RRL
- 0.2 µl Aminosäure-Mix (je 1mM) ohne Methionin
- 0.5 µl <sup>35</sup>S-Methionin
- 0.25-2 µl Transkript
- ad 10 µl mit A. bidest

Die Translation erfolgte für 30 min bei 30 °C. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Translationsansätze bei -20 °C eingefroren oder mit 2 x PP/DTT versehen und denaturiert.

Für die cotranslationale Translokation wurde bei konstanter Menge an mRNA von Beginn an steigende Mengen (0.25 eq - 1.5 eq) raue (RM) oder hochsalzbehandelte (K-RM) Membranen zugesetzt (2.2.11). Die Menge an RRL, Aminosäure-Mix, <sup>35</sup>S-Methionin entsprach der mRNA Titration. Zur Aufnahme von Translations/Translokations-Kinetiken wurde die Reaktion im Abstand von 30 s durch Entnahme von Aliquots aus einem Mehrfachansatz und direkte Denaturierung bei 80 °C mit 2 x PP/DTT oder Einfrieren bei -20 °C gestoppt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Gele wurden fixiert (15%ige Essigsäure, 10 min), gewässert und getrocknet (Geltrockner 538, Bio-Rad). Über Nacht erfolgte die Exposition der Gele auf Phosphoimagerplatten (*Image Platte* BAS-SR 2040, Fuji). Die Radioaktivität wurde mittels dem Phosphoimager FLA-3000 (Fujifilm, Software Fujifilm BAS) sichtbar gemacht.

### 2.2.10 Präparation von Ribosomen aus Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums durch Puromycin-Hochsalz-Behandlung

Zur Gewinnung von 80S Ribosomen wurden raue ER-Membranen vom Hund (hRM; 2.1.4) mit Puromycin und Hochsalz behandelt. 1 Vol. hRM (in MB-Puffer) wurde mit 1 Vol. Puffer A (50 mM HEPES-KOH pH 7.6; 150 mM KAc; 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; 250 mM Saccharose; 1 mM DTT) gemischt und mit 1.5 mM Puromycin, 0.2 mM GTP und je 1/1000 Vol. RNasin und PI-Mix versetzt. Nach Inkubation für 60 min auf Eis wurde 1/1000 Vol. GTP [100mM] hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde auf 500 mM KAc und 10 mM Mg(Ac)<sub>2</sub> eingestellt und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (50 mM HEPES-KOH pH 7.6; 500 mM KAC; 10 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; 1600 mM Saccharose) in TLA-100.3-Röhrchen geschichtet. Das Verhältnis von Saccharose-Kissen zur Probe betrug ungefähr 1 : 2. Nach

einer Zentrifugationsdauer von 2 h (60 min 20 °C, 60 min 4 °C, 100000 rpm, TLA-100.3-Rotor) wurden die Membranen aus der Interphase abgenommen und die sedimentierten Ribosomen fünfmal durch wiederholtes Resuspendieren und Sedimentieren mit MS<sub>5+150</sub>-Puffer gewaschen und in selbigem aufgenommen. Die Membranen wurden etwa im Verhältnis 1:4 mit 50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 500 mM KAc; 10 mM Mg(Ac)<sub>2</sub> verdünnt und nach dem Pelletieren (TLA-100.3-Rotor, 100000 rpm, 30 min, 4 °C) zweimal mit MS<sub>5+150</sub>-Puffer gewaschen, so dass von Ribosomen befreite raue Membranen (PK-RM) aus der Präparation hervorgingen. Die Konzentration der Ribosomen wurde photometrisch bestimmt.

### **2.2.11 Herstellung von salzbehandelten Membranen (K-RM)**

Hochsalzbehandelte raue Membranen der Maus (mK-RM) wurden nach Walter und Blobel (1983) präpariert (modifiziert). 50 µl mRM (2.1.4) in MB-Puffer wurden mit 25 µl einer eiskalten Salzlösung (1.5 M KAc pH 7.5; 15 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>) in TLA-100-Röhrchen langsam gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Hochsalzansatz wurde mit 50 µl Kissen (50 mM Hepes-KOH pH 7.6, 500 mM KAc pH 7.5, 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>, 500 mM Saccharose, 1 mM DTT) unterschichtet und für 6 min bei 50000 rpm zentrifugiert (4 °C, TLA-100-Rotor). Das Membranpellet wurde in 50 µl MB-Puffer resuspendiert und erneut durch ein Kissen (MB-Puffer mit 500 mM Saccharose) sedimentiert (6 min, 50000 rpm, 4 °C, TLA-100-Rotor). Das Pellet wurde in 200 µl MB-Puffer resuspendiert und nach erneuter Sedimentation (20 min, 14000 rpm, 4 °C, Eppendorf Zentrifuge 5417R) in 25 µl MB-Puffer resuspendiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels SDS-PAGE und quantitativen Immunoblot gegen Sec61α.

### **2.2.12 Präparation von gereinigten Sec61-Komplexen**

Die Eigenschaft von Sec61-Komplexen an Ribosomen zu binden wurde dazu genutzt, den Komplex aus hRM zu isolieren. Die Reinigung erfolgte wie bei Görlich und Rapoport (1993) beschrieben. Abweichend vom Protokoll erfolgte nach der Ionenaustauschchromatographie die Elution von der SP-Sepharose in 6 Schritten. Es wurde mit je 3 ml 50 mM KAc, 150 mM KAc, 300 mM KAc, 500 mM KAc, 750 mM KAc und 1000 mM KAc in 50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 10% Glycerin; 5 mM DTT; 2.5% Digitonin bei RT und ohne Peristaltikpumpe eluiert. Die Reinheit des Komplexes wurde mittels Coomassie-Gel bzw. Silbergel analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch SDS-PAGE und quantitativen Immunoblot. Große Volumina wurden zuvor mittels Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert.

## 2.2.13 Rekonstitution gereinigter Komplexe in Liposomen

### 2.2.13.1 Lipidlösungen

Für die Rekonstitution gereinigter SecYEG/Sec61-Komplexe in künstliche Liposomen diente in der Regel *E.coli Polar Lipid Extract* (*E.coli* Total Extrakt'). Ferner wurde ein Lipid Mix aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) im Verhältnis 80% : 20% verwendet. Als protein-freie Lipidvesikel wurden des Weiteren PC/PE/Phosphatidylserin(PS)-Vesikel (Verhältnis 60% : 20% : 20%) und PC/PE/PS/Phosphatidylinositol(PI)-Vesikel (Verhältnis 60% : 20% : 5% : 15%) sowie reine PS- und PI-Vesikel hergestellt. Die in Chloroform vorliegenden Lipide wurden in einer Gesamtkonzentration mit 10mM DTT und 6 mg Deoxy BIGCHAP (in Methanol) gemischt und das Lösungsmittel in der Speedvac (Univapo 150H, Airbus; UnijetII refrigerated Aspirator) entfernt. Die Pellets wurden in 96%igem Ethanol resuspendiert und ü.N. erneut bei RT eingedampft. Es wurde in 200 µl 50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 16% (v/v) Glycerin für 15 min im Thermomixer (1400 rpm, RT) resuspendiert, so dass sich eine Endkonzentration von 20 µg/µl Lipid einstellte.

### 2.2.13.2 Rekonstitution von gereinigten Sec-Komplexen in Proteoliposomen

Die Rekonstitution gereinigter Sec61/YEG-Komplexe erfolgte nach Görlich und Rapoport (1993). Das Verhältnis von Lipid zu Protein betrug für SecYEG-Komplexe 400 µg Lipid (*E. coli* Total Extrakt'-Lipid; PC und PE im Verhältnis 80% : 20%) und 250 pmol SecYEG in 50 µl Reaktionsvolumen. Für die Rekonstitution von Sec61-Komplexe wurden etwa 115 pmol Protein mit 200 µg Lipid (*E. coli* Total Extrakt') mit einem Festvolumen von 100 µl SM2-Biobeads in einem Reaktionsvolumen von 100 µl inkubiert. Der Entzug des Detergenzes durch die Biobeads und die damit einhergehende Bildung von Vesikeln erfolgte bei 8 °C ü.N. (1000 rpm). Die durch Zentrifugation pelletierten Proteoliposomen wurden in MS<sub>5+120</sub>OSOD-Puffer resuspendiert. Die Quantifizierung der inkorporierten Proteinmenge erfolgte mittels SDS-PAGE und quantitativer Immunoblotanalysen.

### 2.2.14 Ribosomenbindung an Proteoliposomen

300 pmol rekonstituierter SecYEG-Komplex wurden mit 15 pmol isolierter rRNA oder 70S-Ribosomen für 10 min bei 0 °C und nachfolgend 30 min bei 30 °C in einem Endvolumen von 30 µl MS<sub>5+150</sub>-Puffer inkubiert. Wurden Lipidvesikel ohne rekonstituierten Komplex für die Bindung verwendet, wurden gleiche Volumina wie von dem rekonstituierten Komplex verwendet. Die Proben wurden anschließend mit 75 µl 2.3 M Saccharose in MS<sub>5+150</sub>-Puffer gemischt und unter einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet (60 µl 1.4 M

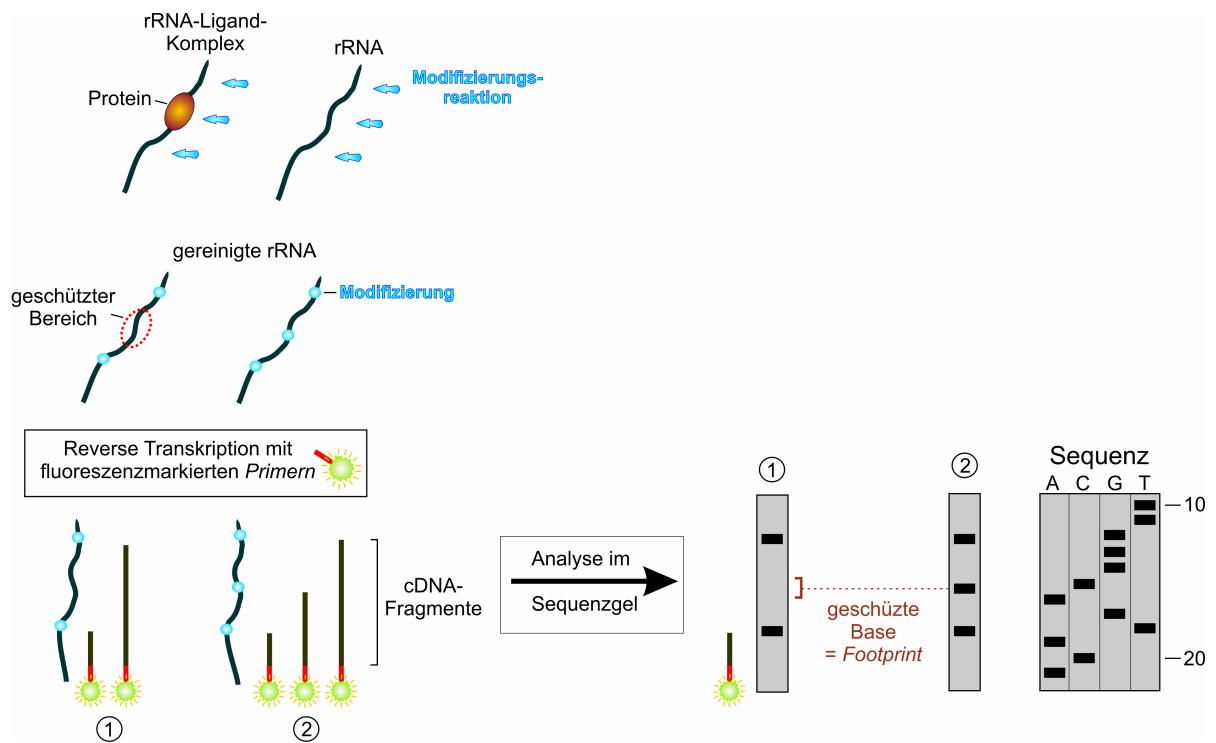
Saccharose in MS<sub>5+150</sub>-Puffer und 55 µl MS<sub>5+150</sub>-Puffer). Die Trennung von ungebundener und gebundener rRNA/Ribosomen durch Flotation erfolgte für 60 min bei 100000 rpm (4 °C, TLA-100-Rotor). Die Proben wurden in eine obere (100 µl) und eine untere Fraktion (115 µl) geteilt. Die Menge an flotierter rRNA/Ribosomen wurde photometrisch bestimmt.

### 2.2.15 Ribosomen-Komplex-Bindung in Detergenzlösung

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Ribosomen mit heterotrimeren Komplexen in Lösung wurde der Bindungsassay nach Prinz *et al.* (2000) angewendet. Die Ribosomen (70S, *E.coli*) wurden in 3-fachem Überschuss mit gereinigtem Sec61 bzw. SecYEG in digitoninhaltigem Puffer gemischt (50 mM Hepes-KOH pH 7.6; 125 mM KAc; 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; 250 mM Saccharose; 1.25 mM DTT; 0.625% Digitonin) und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden für 30 s bei 14000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5417R, 4 °C) zentrifugiert, um Aggregate zu pelletieren. Der Überstand wurde auf ein 100 µl-Kissen (50mM Hepes-KOH pH 7.6; 100mM KAc, 5mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; 500mM Saccharose; 1mM DTT; 0.625% Digitonin) geschichtet und für 6 min bei 75000 rpm im TLA-100-Rotor bei 4 °C zentrifugiert. Die Ansätze wurden in 2 Fraktionen (obere = 65 µl; untere = 70 µl) separiert und photometrisch sowie mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

### 2.2.16 rRNA-Footprinting

Das Prinzip des rRNA-Footprinting besteht darin, rRNA mit einem Interaktionspartner/Liganden zu binden und diesen RNA-Ligand-Komplex einer chemischen Modifikation zu unterziehen. Spezifische Chemikalien greifen die Nukleotide der rRNA an. Ziel ist es, Bereiche der RNA zu identifizieren, welche durch die Interaktion mit dem Liganden (hier: heterotrimerer SecYEG/Sec61-Komplex) vor diesen Modifikationen geschützt wurden. Im Anschluss an die Modifizierung erfolgte die Identifizierung der Modifikationsstellen durch *Primerverlängerung* mittels Reverser Transkriptase, da modifizierte Nukleotide zu einem Abbruch der Reaktion führen. Die dadurch entstehenden neuen cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Sequenzgelen unter Verwendung des automatischen Sequenzierapparates '*LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200*' detektiert. Die verwendeten DNA-Oligonukleotidprimer waren am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, so dass im Falle eines neuen cDNA-Fragmentes dieses durch das Entstehen einer neuen Bande erkennbar wurde (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Footprint-Methode**

Durch die Bindung eines Liganden an die rRNA wird während der anschließenden Modifizierung durch nukleotidspezifische Chemikalien die rRNA vor Modifizierungen geschützt. Die Modifizierungen bzw. geschützten Nucleotide werden durch die reverse Transkription der rRNA mit anschließender Auftrennung der Proben im Sequenzgel sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Nucleotidposition der modifizierten Basen erfolgt ein paralleler Auftrag der dideoxy-Sequenzierung der rRNA (Bahnen A, C, G und T). Weitere Erläuterungen siehe Text.

### 2.2.16.1 Bindung

Die Bindung von isolierter rRNA, ribosomalen Untereinheiten und Ribosomen mit heterotrimeren SecYEG- bzw. Sec61-Komplexen (rekonstituiert oder in Lösung) und mit Lipid (als Vesikel oder in Lösung [200 µg]) erfolgte in  $MS_{5+120}OSOD$ -Puffer wie unter 2.2.14 angegeben. Bei der Verwendung von Lipidvesikeln wurden Volumina entsprechend der eingesetzten Menge an SecYEG- bzw. Sec61-enthaltenden Proteoliposomen eingesetzt. Erfolgte die Bindung von Proteinen oder Lipiden in Lösung, wurde dem Ansatz 1% Detergenz zugesetzt. Nach der Inkubation auf Eis und bei 30 °C erfolgte die Modifizierung mit Dimethylsulfat (DMS).

### 2.2.16.2 Chemische Modifizierung ribosomaler RNA, ribosomaler Untereinheiten und kompletter Ribosomen

Die Modifizierung mit DMS erfolgte modifiziert nach Merryman und Noller (1998) und sollte im statistischen Mittel in jedem rRNA-Molekül maximal eine Modifizierung hervorrufen. Nach der Bindungsreaktion wurden die Ansätze mit 1.2 µl einer auf 880 mM frisch angesetzten DMS-Lösung (in Ethanol, Stocklösung 10.6 M) versetzt, für 10 min bei 37 °C modifiziert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 15 µl Stopp-Puffer beendet. Folgend wurden je

174 µl Extraktionspuffer hinzugefügt und sofort dreimal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert, wobei die Phasen durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm (RT) getrennt wurden. Durch die Zugabe von 3 Vol. Ethanol (96%ig) und einer Inkubation für 50 min bei -80 °C wurde die rRNA präzipitiert und anschließend sedimentiert (10 min, 13200 rpm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5415D). Die rRNA wurde in 8 µl 0.1% DEPC-Wasser resuspendiert, 1:100 in 1% SDS verdünnt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.2.16.3 Sequenzierung

Um die Position von geschützten bzw. modifizierten Basen zu identifizieren, wurde eine direkte Sequenzierung der behandelten rRNA, ribosomalen Untereinheiten oder kompletter Ribosomen nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Es wurde die *Moloney Murine Leukemia Virus*-Reverse Transkriptase (MMLV-RT, Promega) verwendet.

Für die Sequenzierung der rRNA wurden 4 pmol isolierte rRNA, ribosomalen Untereinheiten oder 70S Ribosomen mit 8 pmol des IRD-800 markierten *Primers* in einem Volumen von 17 µl mit 10 mM Hepes-KOH (pH 7.6) und 30 mM KCl denaturiert und hybridisiert und folgend auf 4 x 4 µl aufgeteilt. Für jedes Nukleotid wurde bei der Sequenzierung ein eigener Enzym-ddNTP/dNTP-Mix angesetzt, der neben den vier dNTPs jeweils eines der vier ddNTPs enthielt („A“, „C“, „G“ oder „T“-Ansatz). Pro 4 µl-Ansatz wurden 1 µl MMLV-RT, 1 µl 5-fach MMLV-RT-Puffer und 0,5 µl ddNTP/dNTP-Mix eingesetzt.

Für die Analyse der modifizierten Proben wurden 1 pmol aufgereinigte rRNA mit 2 pmol *Primer* in einem Volumen von 4.25 µl (10 mM Hepes-KOH pH 7.6; 30 mM KCl) denaturiert und hybridisiert. Da bei den modifizierten Proben der Abbruch der Reversen Transkriptase durch die modifizierten Basen erfolgte, wird nach der Denaturierung und Hybridisierung ein Enzym-dNTP-Mix zugesetzt, der lediglich alle 4 dNTPs enthielt.

Die Denaturierung und Hybridisierung erfolgte für 5 min bei 70 °C mit nachfolgender Inkubation auf Eis (5 min). Nach der Zugabe des jeweiligen Enzym-Mixes erfolgte die *Primer*-Verlängerung für 60 min bei 42 °C. Anschließend wurden die Proben mit einem ½ Vol. Formamid-Stopp/Lade-Puffer (Epicentre) versehen und bis zur weiteren Analyse mittels Sequenziergel bei -20 °C gelagert. Zur Auftrennung der Proben wurden 6%ige Acrylamid Gele (41 cm Länge, Spacer-Dicke 0.2 mm) verwendet. Es wurden 21 g Urea, 7.5 ml RapidGel-XL, 5 ml 10 x TBE-Puffer und 500 µl DMSO in einem Gesamtvolumen von 50 ml A. bidest bei RT gelöst und für 10 min entgast. Anschließend wurde die Gellösung mit 30 µl TEMED und 350 µl 10%ige APS-Lösung versetzt und mit Hilfe einer Spritze durch einen 0.45 µm Millipore-Filter zwischen die Glasplatten gegossen. Die Polymerisation erfolgte in horizontaler Lage für 1 ½ - 2 h.

Nach einer Vorelektrophorese (30 min, ohne Laser) wurden je 1,1 µl der zuvor für 2 min bei 95 °C denaturierten Proben aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0.8 x TBE-Puffer. Sowohl der Vorlauf als auch der Hauptlauf erfolgte bei 1500 V, 35 mA, 40 W und 45 °C.

## **2.2.17 Proteinanalytische Methoden**

### **2.2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Unter denaturierenden Bedingungen können Proteine mittels Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Zur Denaturierung wurde die Proteinprobe mit 2 x PP/DTT versehen und für 5 - 10 min bei 60 °C bzw. 80 °C (Translations/Translokation-Proben) denaturiert. Die Elektro-phorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

### **2.2.17.2 Westernblot und Antikörperinkubation**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von peptidspezifischen Antiköpern (AK) quantitativ nachgewiesen. Dafür erfolgte der Transfer aus dem Gel auf synthetische Membranen (*Immunblot<sup>TM</sup>PVDF Membrane*, 0.45 µM, Bio-Rad) im Nasszellen-Transfer-Verfahren nach den Angaben des Herstellers (Criterion Kammer, Bio-Rad). Der Transfer erfolgte für 45 min in 1 x CAPS-Puffer (10 mM CAPS, pH 11 (NaOH); 20% Methanol) bei konstant 100 V. Anschließend wurde die Membran bei RT für 1 h entsprechend dem primären AK mit 3% BSA (für SecE) oder 10% Magermilchpulver geblockt (je in 1 x TBT). Die Inkubation des primären AK erfolgte ü.N. Die Verwendung der sekundären und tertiären AK erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL-System von PerkinElmer. Die Entwicklung der Immunoblots erfolgte in einer FujiFilm Intelligent Dark Box mittels einer FujiFilm LAS-1000 Kamera.

### **2.2.17.3 Präzipitation von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Die Probe wurde mit einer 40%igen Trichloressigsäure (TCA)-Lösung auf eine Endkonzentration von 15% eingestellt und für 30 min auf Eis inkubiert. Befanden sich Detergenzien in der zu präzipitierenden Lösung, wurde zuvor Triton X-100 in einer Endkonzentration von 2% zugegeben und für 15 min (RT) inkubiert. Die Proteine wurden sedimentiert (60 min, 14000 rpm, 4 °C, Eppendorf Zentrifuge 5417R), das Pellet mit 80%igem kaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert (30 min, 14000 rpm, 4 °C, Eppendorf Zentrifuge 5417R). Das Pellet wurde in 2 x PP/DTT resuspendiert.

#### **2.2.17.4 Coomassiefärbung**

Nach beendetem Gellauf wurde das Gel 10 min in 15% Essigsäure fixiert und in Coomassie-Färbelösung bei RT inkubiert, bis das Gel tiefblau gefärbt war. Mittels Entfärber wurde das Gel bis zur gewünschten Intensität wieder entfärbt, wobei die letzten Entfärbeschritte mit heißem A. bidest erfolgten. Lag die Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze für Coomassie (200 - 400 µg), wurden die Gele vollständig entfärbt und anschließend eine Silberfärbung durchgeführt.

#### **2.2.17.5 Silberfärbung**

Die Silberfärbung erfolgte modifiziert nach Blum *et al.* (1987). Nach Coomassieentfärbung wurde das Gel in 30% Ethanol (3 x 20 min) gewaschen. Folgend wurde 1 min in Thiosulfat-Lösung inkubiert und 3 x 20 s mit A. bidest gewaschen. Die anschließende Inkubation mit der Silbernitrat-Lösung erfolgte für 20 min. Nach erneutem Waschen mit A. bidest (3 x 20 s) wurde mit dem Entwickler bis zur gewünschten Färbung entwickelt (ca. 3 - 5 min), wobei die Entwicklung durch zweimaliges Waschen mit A. bidest à 30 s unterbrochen und durch 5 minütiges Schwenken in der Stopp-Lösung beendet wurde. Wurde das Gel zuvor nicht Coomassie gefärbt/entfärbt, erfolgte eine Fixierung des Gels für 1 h in 40% Methanol/10% Essigsäure.

#### **2.2.18 Auswertung/Software**

Die Quantifizierung von Banden der Autoradiogramme und Immunoblots erfolgte mit dem Programm *Advanced Image Data Analyzer* (AIDA), Version 3.52.046. Die Auswertung der Sequenzgele erfolgte mit den Programmen *Base ImagIR Data Collection* und *Base ImagIR Image Analysis*.

Die Darstellung und Bearbeitung von Ribosomen-Strukturen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes *Pymol* (<http://pymol.sourceforge.net>). Die Strukturen wurden von der RCSB-Daten-Bank (*RCSB Protein Data Bank*; <http://www.rcsb.org>) bezogen.

### 3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei Ribosomen-assoziierten Membranproteinen bzw. homologen bakteriellen Bestandteilen gearbeitet. Ziel war es, die Interaktion zwischen Ribosomen und dem heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplex auf rRNA-Ebene mit Hilfe der *Footprint*-Methode näher zu charakterisieren. Des Weiteren wurde die Rolle des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 während der cotranslationalen Translokation untersucht.

#### 3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen dem heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplex und Ribosomen mit Hilfe von RNA-*Footprinting*

Der kanalbildende heterotrimere SecYEG/Sec61-Komplex ist Interaktionspartner der Ribosomen während der cotranslationalen Translokation (Kalies *et al.*, 1994). Bindungs- und Kompetitionsanalysen zeigten weiterhin, dass isolierte ribosomale RNA (rRNA) spezifisch an den Kanal binden kann (Prinz *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Tatsache ergab sich die Fragestellung, ob die Charakterisierung der Proteinbindungsstellen der rRNA während der Ribosom-Kanal-Interaktion mit Hilfe der *Footprint*-Methode möglich ist. Diese Fragestellung stellt einen zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Die *Footprint*-Methode erlaubt eine direkte Beprobung der 23S rRNA während der Interaktion mit dem proteinleitenden Kanal und sollte zur Identifizierung von Nukleotiden führen, die durch die Bindung mit dem SecYEG-Komplex vor chemischen Modifizierungen geschützt werden. Erste Versuche erfolgten zunächst mit isolierter 23S rRNA aus 50S Untereinheiten von *Escherichia coli* (*E. coli*). Weiterhin wurden die Untersuchungen mit 70S Ribosomen (*E. coli*) durchgeführt, so dass ein eventueller Einfluss ribosomaler Proteine auf das Bindungsverhalten der rRNA analysiert werden konnte. Ferner wurde mittels *Footprint*-Assay der Einfluss von Lipiden auf die Interaktion zwischen trimerem Komplex und Ribosomen untersucht, indem die Inkubation von Ribosomen mit Proteinkomplexen in Abwesenheit von Lipiden sowie in Anwesenheit unterschiedlicher Lipide erfolgte.

Um dies zu erreichen, wurden isolierte 23S rRNA bzw. 70S Ribosomen an den trimeren Komplex gebunden und sowohl die Bindungsansätze als auch ungebundene 23S rRNA bzw. 70S Ribosomen der *Footprint*-Analyse unterzogen. Das verwendete Modifizierungsreagenz DMS (Dimethylsulfat) führt zur Methylierung der Basen Adenin, Cytosin und Guanin und erwies sich im Vergleich zu anderen Modifizierungschemikalien am geeignetsten. Um die Modifizierungen sichtbar machen zu können, wurden die rRNAs anschließend direkt revers transkribiert, wobei

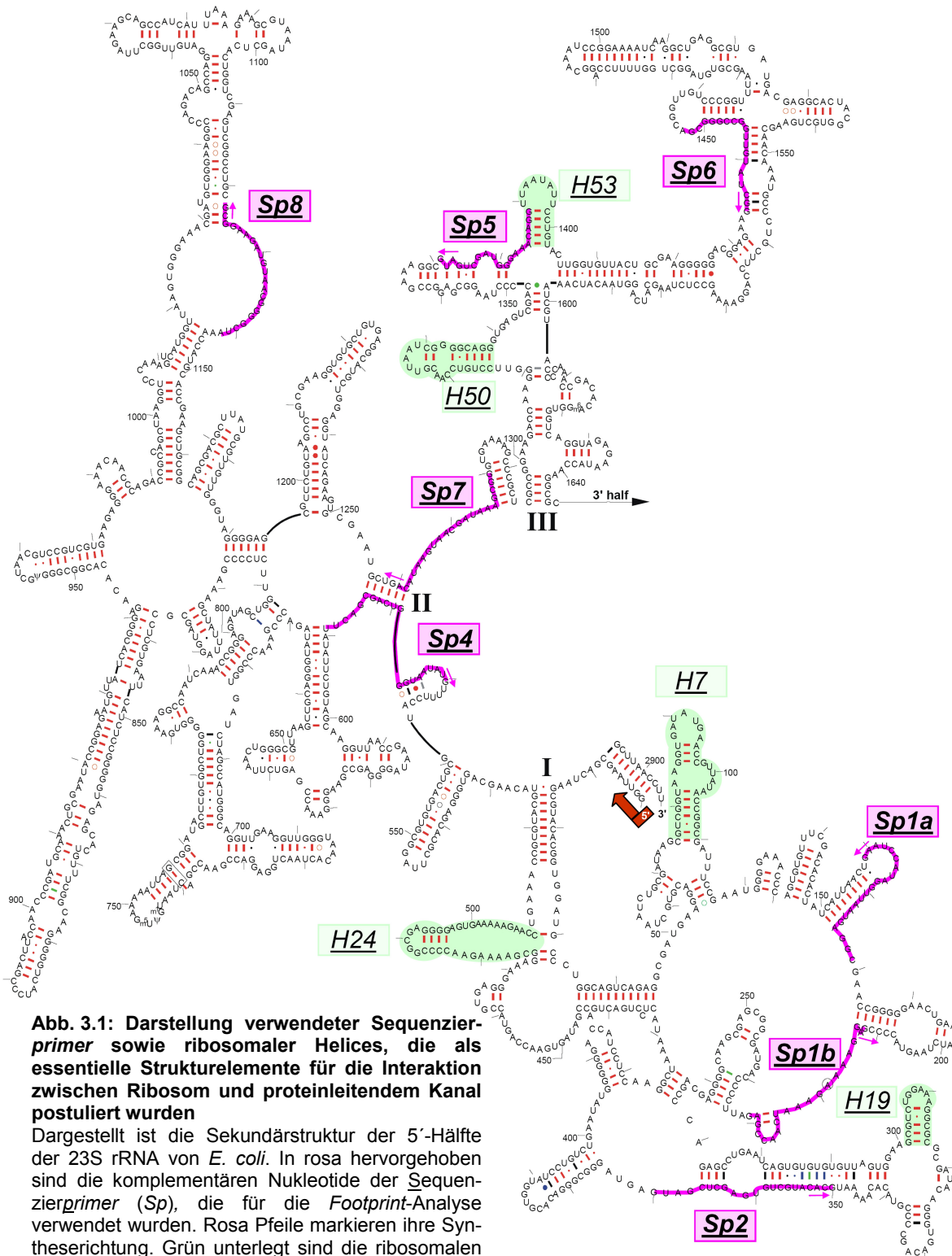
modifizierte Basen zum vorzeitigen Abbruch der Transkriptionsreaktion und damit zu verkürzten cDNA-Fragmenten führten. Durch den Einsatz fluoreszenzfarbstoffmarkierter *Primer* und die Auftrennung der Proben in hochauflösenden Sequenzgelen nach ihrer Größe, wurden die verkürzten cDNA-Fragmente, und damit die Modifizierungsstellen, durch das Entstehen einer neuen Bande erkennbar. Im Gegensatz dazu wies eine durch die Inkubation mit dem heterotrimeren Komplex geschützte Base im direkten Vergleich zu ungebundener, modifizierter rRNA an derselben Position keine neue Bande auf. Eine solche in ihrer Intensität abgeschwächte Base entspricht dem so genannten *Footprint* (siehe auch Abb. 2.1).

Die ausführliche Beprobung der gebundenen rRNA erforderte große Mengen des gereinigten Komplexes. Infolgedessen wurden die intensiven Untersuchungen im eubakteriellen System durchgeführt, da die Präparation von SecYEG-Komplexen aus *E. coli* in großem Maßstab möglich war.

### 3.1.1 Direkte Sequenzierung ribosomaler RNA und Stabilität der Methode

Die Basis für die Durchführung der *Footprint*-Analysen war die Sequenzierbarkeit der rRNA. Daher wurde in Vorversuchen zunächst die direkte Sequenzierung der aus ribosomalen 50S Untereinheiten (*E. coli*) isolierten 23S rRNA nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (1977) getestet. Die optimale Menge an *Template*, *Primer* und Nukleotiden wurde bestimmt sowie die reverse Transkription durch die Verwendung verschiedener Reverser Transkriptasen optimiert (Daten nicht gezeigt). Somit ergaben sich für die reverse Transkription der isolierten 23S rRNA die in Abschnitt 2.2.16 angegebenen Mengen und Reaktionszeiten.

Die für die *Footprint*-Analyse verwendeten DNA-Oligonukleotid-*Primer* wurden komplementär zu Bereichen innerhalb der ersten drei Sekundärstrukturdomänen gestaltet, da von Behrens (2003) gezeigt wurde, dass dieser Bereich der 23S rRNA ausreichend für eine hochaffine Bindung an den proteinleitenden Kanal ist. Sie enthalten demnach wahrscheinlich die SecYEG/Sec61-Bindungsstellen (Behrens, 2003). Ferner kommen evolutionär konservierte Bereiche innerhalb der Domänen als Bindungsstellen für den trimeren Sec-Komplex in Frage (Prinz *et al.*, 2000). Abbildung 3.1 zeigt die Sekundärstruktur der 23S rRNA von *E. coli* mit den für die Interaktion postulierten Bereichen (H = Helices, grün unterlegt) und die Lage der Sequenzier*primer* (Sp, rosa unterlegt). Die Lage der *Primer* wurde so gewählt, dass sie bei der reversen Transkription der 23S rRNA in 5'-Richtung die für die Interaktion möglichen Interaktionsstellen erfassten. Durch die Verwendung der angegebenen acht *Primer* war es zudem möglich, fast den gesamten Bereich der drei Sekundärstrukturdomänen (Nukleotide (nt) 1 - 1646) zu sequenzieren.



**Abb. 3.1: Darstellung verwendeter Sequenzierprimer sowie ribosomaler Helices, die als essentielle Strukturelemente für die Interaktion zwischen Ribosom und proteinleitendem Kanal postuliert wurden**

Dargestellt ist die Sekundärstruktur der 5'-Hälfte der 23S rRNA von *E. coli*. In rosa hervorgehoben sind die komplementären Nukleotide der Sequenzierprimer (Sp), die für die Footprint-Analyse verwendet wurden. Rosa Pfeile markieren ihre Syntheserichtung. Grün unterlegt sind die ribosomalen Helices (H), für welche eine Rolle bei der Bindung mit dem proteinleitendem Kanal postuliert wurde. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass die Helices bei der reversen Transkription erfasst wurden. (Quelle: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>; *E. coli*, J01695)

23s rRNA	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sp1a	GGTTAAGCGA	CTAAGCGTAC	ACCGTGGATG	CCCTGGCAGT	CAGAGGCGAT	GAAGGACGCTG	CTAATCTGCG	ATAAGCGTGC	GTAAGGTGAT	ATGAACCGTT
Sp1b	TAAAGCGA	CTAAGCGTAC	ACCGTGGATG	CCCTGGCAGT	CAGAGGCGAT	GAAGGACGCTG	CTAATCTGCG	ATAAGCGTGC	GTAAGGTGAT	ATGAACCGTT
23s rRNA	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190
Sp1a	ATAACCGGCG	ATTTCGGAAT	GGGGAAACCC	AGTGTGTTTC	GACACACTAT	CATTAACCTGA	ATCCATAGGT	TAATGAGGCG	AACCGGGGA	ACTGAAACAT
Sp1b	ATAACCGGCG	ATTTCGGAAT	GGGGAAACCC	AGTGTGTTTC	GACACACTAT	CATTAACCTGA	ATCCATAGGT	TAATGAGGCG	AACCGGGGA	ACTGAAACAT
Sp2		G ATTTCGGAAT	GGGGAAACCC	AGTGTGTTTC	GACACACTAT	CATTAACCTGA	ATCCATAGGT	TAATGAGGCG	AACCGGGGA	ACTGAAACAT
Sp4										CAT
23s rRNA	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290
Sp1b	CTAAGTACCC	CGAGGAAAAG	AAATCAACCG	AGATTCCCCC	AGTAGCGGCG	AGCGAACGGG	GAGCAGCCCA	GAGCCTGAAT	CAGTGTGTGT	GTTAGTGGAA
Sp2	CTAAGTACCC	CGAGGAAAAG	AAATCAACCG	AGATTCCCCC	AGTAGCGGCG	AGCGAACGGG	GAGCAGCCCA	GAGCCTGAAT	CAGTGTGTGT	GTTAGTGGAA
Sp4	CTAAGTACCC	CGAGGAAAAG	AAATCAACCG	AGATTCCCCC	AGTAGCGGCG	AGCGAACGGG	GAGCAGCCCA	GAGCCTGAAT	CAGTGTGTGT	GTTAGTGGAA
23s rRNA	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Sp2	GCGTCTGGAA	AGGCGCGCA	TACAGGGTGA	CAGCCCCGTA	CACAAAAATG	CACATGCTGT	GAGCTCGATG	AGTAGGGCGG	GACACGTGGT	ATCCTGTCTG
Sp4	GCGTCTGGAA	AGGCGCGCA	TACAGGGTGA	CAGCCCCGTA	CACAAAAATG	CACATGCTGT	GAGCTCGATG	AGTAGGGCGG	GACACGTGGT	ATCCTGTCTG
23s rRNA	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490
Sp4	AATATGGGGG	GACCATCCTC	CAAGGCTAAA	TACTCCTGAC	TGACCGATAG	TGAACCAAGTA	CCGTGAGGGA	AAGCGAAAAA	GAACCCCGGG	GAGGGGAGTG
23s rRNA	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590
Sp4	AAAAAGAACC	TGAAACCGTG	TACGTACAAG	CAGTGGGAGC	ACGCTTAGGC	GTGTGACTGC	GTACCTTTTG	TATAATGGGT	CAGCGACTTA	TATTCTGTAG
23s rRNA	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690
Sp4	CAAGGTAAAC	CGAATAGGGG	AGCCGAAGGG	AAACCGAGTC	TTAAC TGGGC	GTTAAGTTGC	AGGGTATAGA	CCCGAAACCC	GGTGATCTAG	CCATGGGCAG
23s rRNA	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790
Sp8	GTTGAAGGTT	GGGTAAACAT	AAC TGGAGGA	CCGAACCGAC	TAATGTTGAA	AAATTAGCCG	ATGACTTGTG	GCTGGGGGTG	AAAGGCCAAT	CAAACCGGGA
Sp7						AGCGG	ATGACTTGTG	GCTGGGGGNG	AAAGGCCAAT	CAAACCGGNG
23s rRNA	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890
Sp8	GATAGCTGGT	TCTCCCCGAA	AGCTATTTAG	GTAGCGCCTC	GTGAATTCAT	CTCCGGGGGT	AGAGCACTGT	TTCGGCAAGG	GGGTATCCCC	GACTTACCAA
Sp7	GATAGCTGGT	TCTCCCCGAA	AGCTATTTAG	GTAGCGCCTC	GTGAATTCAT	CTCCGGGGGT	AGAGCACTGT	TTCGGCAAGG	GGGTATCCCC	GACTTACCAA
Sp5										CCAA
23s rRNA	901	910	920	930	940	950	960	970	980	990
Sp8	CCCAGTCAA	ACTGCGAATA	CCGGAGAATG	TTATCACGGG	AGACACACGG	CGGGTGCTAA	CGTCCGTCGT	GAAGAGGGAA	ACAACCCAGA	CCGCCAGCTA
Sp7	CCCAGTCAA	ACTGCGAATA	CCGGAGAATG	TTATCACGGG	AGACACACGG	CGGGTGCTAA	CGTCCGTCGT	GAAGAGGGNA	ACAACCCAGA	CCGCCAGCTA
Sp5	CCCAGTCAA	ACTGCGAATA	CCGGAGAATG	TTATCACGGG	AGACACACGG	CGGGTGCTAA	CGTCCGTCGT	GAAGAGGGNA	ACAACCCAGA	CCGCCAGCTA
23s rRNA	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
Sp8	AGGTCCCAA	GTCATGGTTA	AGTGGGAAAC	GATGTGGGAA	GGCCAGACAC	GCCAGGATGT	TGGCTTAGAA	GCAGCCATCA	TTTAAAGAAA	GGCTAATAGC
Sp7	AGGTCCCAA	GTCATGGTTA	AGTGGGAAAC	GATGTGGGNN	GGCCAGACAC	GCCAGGATGT	TGGCTTAGAA	GCAGCCATCA	TTTAAAGAAA	GGCTAATAGC
Sp5	AGGTCCCAA	GTCATGGTTA	AGTGGGAAAC	GATGTGGGNN	GGCCAGACAC	GCCAGGATGT	TGGCTTAGAA	GCAGCCATCA	TTTAAAGAAA	GGCTAATAGC
Sp6			A AGTGGGAAAC	GATGTGGGNN	GGCCAGACAC	GCCAGGATGT	TGGCTTAGAA	GCAGCCATCA	TTTAAAGAAA	GGCTAATAGC
23s rRNA	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
Sp8	TCACTGGTGC	AGTCGGCCTG	CGCGGAAGAT	GTAACGGGGC	TAAACCATGC	ACCGAAGCTG	CGGCAGCGAC	GCTTATGCGT	TGTTGGGTTAG	GGGAGCGTTC
Sp7	TCACTGGTGC	AGTCGGCCTG	CGCGGAAGAT	GTAACGGGNN	TAAACCATGC	ACCGAANNNTG	CGGCNNCGAC	NNNNNTGTGT	TGTTGGGTTAG	GGNNNCGTTT
Sp5	TCACTGGTGC	AGTCGGCCTG	CGCGGAAGAT	GTAACGGGNN	TAAACCATGC	ACCGAANNNTG	CGGCNNCGAC	NNNNNTGTGT	TGTTGGGTTAG	GGNNNCGTTT
Sp6	TCACTGGTGC	AGTCGGCCTG	CGCGGAAGAT	GTAACGGGNN	TAAACCATGC	ACCGAANNNTG	CGGCNNCGAC	NNNNNTGTGT	TGTTGGGTTAG	GGNNNCGTTT
23s rRNA	1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290
Sp7	TGTAAGCCTG	CGAAGGTGTA	CTGTGAGGCA	TGCTGGAGGT	ATCAGAAGTG	CGAATGCTGA	CATAAGTAAC	GATAAAGCCG	GTGAAAAGCC	CGCTCGCCGG
Sp5	TGTAAGCCTG	CGAAGGTGTA	CTGTGAGGTA	TGCTGGAGGT	ATCAGAAGTG	CGAATGCTGA	CATAAGTAAC	GATAAAGCCG	GTGAAAAGCC	CGCTCGCCGG
Sp6	TGTAAGCCTG	CGAAGGTGTA	CTGTGAGGTA	TGCTGGAGGT	ATCAGAAGTG	CGAATGCTGA	CATAAGTAAC	GATAAAGCCG	GTGAAAAGCC	CGCTCGCCGG
23s rRNA	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390
Sp5	AAGACCAAGG	GTTCTGTGCC	AACGTTAATC	GGGGCAGGGT	GAGTCGACCC	CTAAGGCGAG	GCCGAAAGGC	GTAGTCGATG	GGAAACAGGT	TAATATTCCCT
Sp6	AAGACCAAGG	GTTCTGTGCC	AACGTTAATC	GGGGCAGGGT	GAGTCGACCC	CTAAGGCGAG	GCCGAAAGGC	GTAGTCGANG	GGAAACAGGT	TAATATTCCCT
23s rRNA	1401	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490
Sp6	GTAAGTGGTG	TTACTGCGAA	GGGGGACGG	AGAAGGCTAT	GTTGGCCGGG	CGACGGTTGT	CCCGGTTTAA	GCCTGTAGGC	TGGTTTTCCA	GGCAAATCCG
23s rRNA	1501	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590
Sp6	GAAATCAAG	GCTGAGGCGT	GATGACGAGG	CACTACGGTG	CTGAAGCAAC	AAATGCCTCG	CTTCCAGGAA	AAGCCTCTAA	GCATCAGGTA	ACA...

Abb. 3.2: Die direkte Sequenzierung der 23S rRNA ist möglich

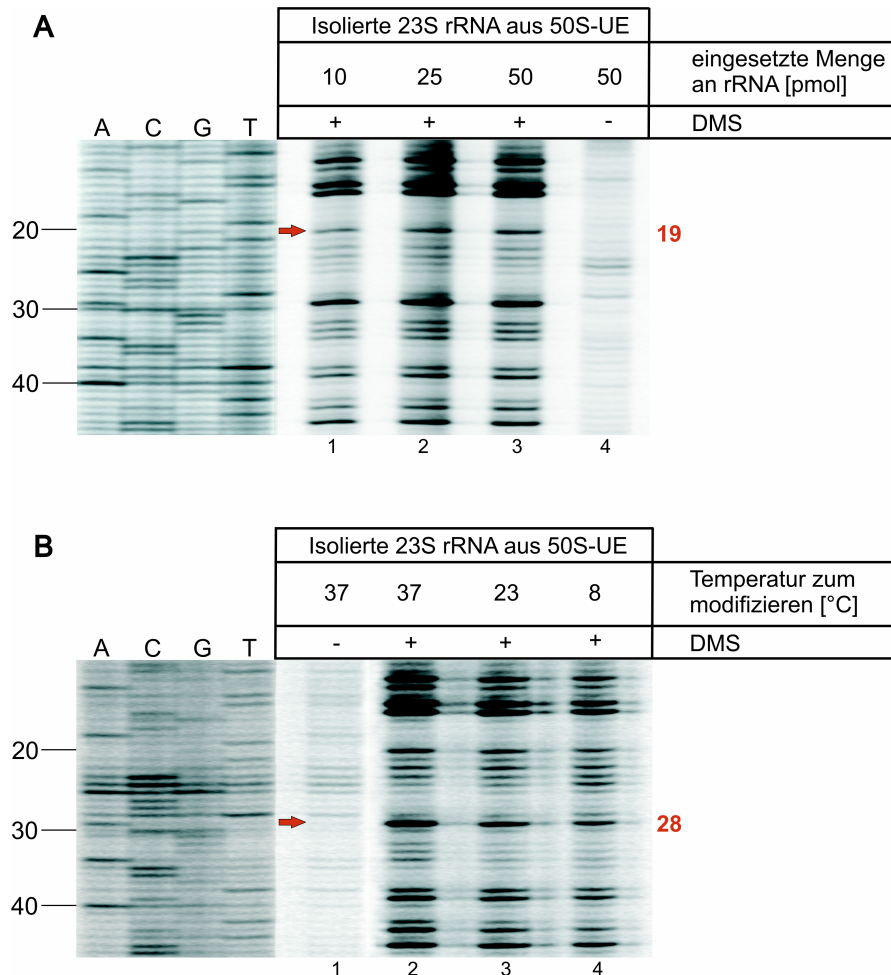
Die isolierte 23S rRNA aus 50S Untereinheiten von *E. coli* wurde unter Verwendung der angegebenen *Primer* (Sp1a, Sp1b, Sp2, Sp4 - 8) und Reverser Transkriptase direkt sequenziert. Die Lage der *Primer* (rosa) wurde dabei so gewählt, dass sie die für die Interaktion zwischen rRNA und proteinleitenden Kanal postulierten Bereiche (grün markiert) bei der Synthese der cDNA (rosa Pfeile) erfassen. Die jeweils erhaltene Nukleotidsequenz jedes *Primers* wurde mit einer 23S rRNA-Sequenz (23S rRNA) aus einer Datenbank abgeglichen, um die Qualität der Sequenzierung zu überprüfen. Unspezifische Strangabbrüche der Reversen Transkriptase sind rot dargestellt. Basen, die nicht mit der Sequenz aus der Datenbank übereinstimmen, wurden blau markiert.

Es konnten cDNA-Stränge mit einer Länge von bis zu 500 Nukleotiden synthetisiert werden, die in Abbildung 3.2 im Vergleich zu einer 23S rRNA von *E. coli* aus einer Datenbank dargestellt sind. Rot dargestellte Basen kennzeichnen nicht lesbare Bereiche, die zum Abbruch der Reaktion der Reversen Transkriptase führten. Blau dargestellte Basen zeigen Positionen, die keine Übereinstimmung mit der Sequenz der Datenbank aufweisen. Die Sequenzierungen erfolgten mit Übereinstimmungen von 93 - 100 %. Lediglich die Stammschleifenstruktur im Bereich 1150 - 1180 führte verstärkt zu unspezifischen Abbrüchen der Reversen Transkriptase.

Bevor die *Footprint*-Analysen durchgeführt wurden, wurde vorab die Sensibilität und Stabilität der Methode getestet. Zunächst wurde das Modifizierungsverhalten von DMS gegenüber unterschiedlichen rRNA Mengen bei konstanten Versuchsbedingungen untersucht. Dazu wurden 10 pmol, 25 pmol und 50 pmol isolierter 23S rRNA in je 30 µl Endvolumen mit DMS in einer Endkonzentration von 33.8 mM modifiziert. Darüber hinaus wurde analysiert, ob unterschiedliche Temperaturen einen Einfluss auf das Modifizierungspattern haben. Konstante Mengen isolierter 23S rRNA (50 pmol) wurden in einem Endvolumen von 30 µl parallel bei 8 °C, 23 °C und 37 °C mit DMS (33.8 mM) modifiziert. Die reverse Transkription erfolgte für beide Versuchsansätze mit dem *Primer* Sp1a nach den zuvor getesteten Bedingungen für die direkte Sequenzierung der rRNA. Die reverse Transkriptionsreaktion modifizierter rRNA unterliegt wie die direkte Sequenzierung dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens. Die Abbrüche der Reversen Transkriptase entstehen hier allerdings durch die chemischen Modifizierungen der rRNA durch das DMS und nicht durch Zugabe von ddNTP (siehe 2.2.16).

Die Analyse mit dem *Primer* Sp1a und die Auftrennung der Proben im Sequenzgel sind teilweise in Abbildung 3.3 dargestellt. Sowohl unterschiedliche Mengen an eingesetzter rRNA (Abb. 3.3 A) als auch Modifikationen bei unterschiedlichen Temperaturen (Abb. 3.3 B) führten qualitativ zu dem gleichen Modifizierungsmuster. Hingegen stieg die Intensität einer Bande von modifizierten Basen an derselben Position leicht an, wenn größere Mengen an rRNA eingesetzt wurden (vergleiche 3.3 A, Bahn 1 - 3). Ähnlich verhielt es sich bei der Erhöhung der Modifizierungstemperatur (Abb. 3.3 B, Bahn 2 - 4). Um Banden, die durch die Modifizierungen der rRNA produziert wurden von denen unterscheiden zu können, die durch spontane Abbrüche der Reversen Transkriptase entstanden, wurde unmodifizierte rRNA unter gleichen Bedingungen wie die modifizierte rRNA revers transkribiert und analysiert (Abb. 3.3. A Bahn 4, Abb. 3.3 B Bahn 1). Gründe für spontane, nicht durch Modifizierungen hervorgerufene Abbrüche der reversen Transkription können beispielsweise ausgeprägte Sekundärstrukturen der rRNA sein.

Ein paralleler Auftrag der dideoxy-Sequenzierung der rRNA (Bahnen A, C, G und T) ermöglichte durch horizontalen Vergleich der Banden die Bestimmung der Nukleotidposition der modifizierten Basen. Dabei ist zu beachten, dass die modifizierte Base aufgrund ihrer Modifizierung nicht mehr transkribiert werden konnte und die Reaktion ein Nukleotid in 3'-Richtung vor der modifizierten Base abbricht. Die im Pattern mittels starken Signals detektierte Base ist demzufolge die Position vor der Modifizierungsstelle (siehe Abb. 3.3, rote Pfeile und Zahlen).



**Abb. 3.3: Keine Veränderungen im DMS-Modifizierungspattern durch unterschiedliche Modifizierungstemperaturen und rRNA-Mengen**

(A) *Modifizierung unterschiedlicher Mengen 23S rRNA.* Unterschiedliche Mengen isolierter 23S rRNA wurden mit je gleichen Mengen an DMS modifiziert, gereinigt, revers transkribiert (*Primer* Sp1a) und im Sequenzgel analysiert (Bahn 1 - 3). Um Spontanabbrüche der Reversen Transkriptase von Abbrüchen aufgrund von Modifizierungen unterscheiden zu können, wurde unbehandelte rRNA unter gleichen Bedingungen wie modifizierte rRNA revers transkribiert (Bahn 4). Für die Zuordnung der Positionen der modifizierten Basen erfolgte ein paralleler Auftrag einer dideoxy-Sequenzierung der 23S rRNA (Bahnen A, C, G und T). Die Zahlen links neben der Sequenz entsprechen der Nukleotidposition von *E. coli* 23S rRNA.

(B) *Modifizierung bei unterschiedlichen Temperaturen.* Konstante Mengen isolierter 23S rRNA (50 pmol) wurden bei unterschiedlichen Temperaturen mit jeweils gleichen Mengen DMS modifiziert, gereinigt und mit dem *Primer* Sp1a revers transkribiert (Bahn 2 - 4). Bahn 1 entspricht der Kontrolle zur Bestimmung von Spontanabbrüchen, links ist die Sequenz mit den entsprechenden Nukleotidpositionen angegeben. Jeweils rechts neben den Sequenzgelen ist die Position für die durch den roten Pfeil markierte modifizierte Base angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die direkte Sequenzierung der rRNA möglich ist und qualitativ gute Ergebnisse liefert. Für die qualitative Auswertung der anschließenden *Footprint*-Analysen dienten meist die Bereiche der ersten 200 - 300 Nukleotide eines Sequenzdurchlaufes. Die beobachteten Verstärkungen durch Erhöhung der Modifizierungstemperatur oder durch größere Mengen an rRNA befanden sich in einem tolerierbaren Bereich, wenn man berücksichtigt, dass die diesem Effekt zu Grunde liegenden Variationsbreiten der Parameter deutlich über den Schwankungsbreiten eines typischen Experimentes lagen. Der Einsatz gleicher rRNA-Mengen für die einzelnen Reaktionen war dennoch eine Grundvoraussetzung für die Analyse (Bindung, Modifizierung, Sequenzierung) und wurde photometrisch für jeden Schritt bestimmt. Die Modifizierungsreaktion erfolgte zudem immer mit dem gleichen Thermoblock bei gleicher Temperatureinstellung. Potentielle systematische Fehler konnten somit ausgeschlossen und daher eine qualitative Auswertung mit guter Reproduzierbarkeit gewährleistet werden.

### **3.1.2 Die Inkubation von isolierter 23S rRNA mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen führt zu *Footprints* und Basenverstärkungen**

Ziel der *Footprint*-Analysen war die Untersuchung, ob eine Bindung von rRNA an SecYEG zum Schutz einzelner rRNA-Bereiche/-Nukleotide vor Modifizierungen mit DMS führt. Um sterische Behinderung durch ribosomale Proteine für die Modifizierungsreaktion sowie durch ribosomale Proteine hervorgerufene mögliche Variabilitäten ausschließen zu können, wurden erste Versuche mit isolierter rRNA durchgeführt. Isolierte 23S rRNA bindet nachweislich an den SecYEG-Komplex (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003).

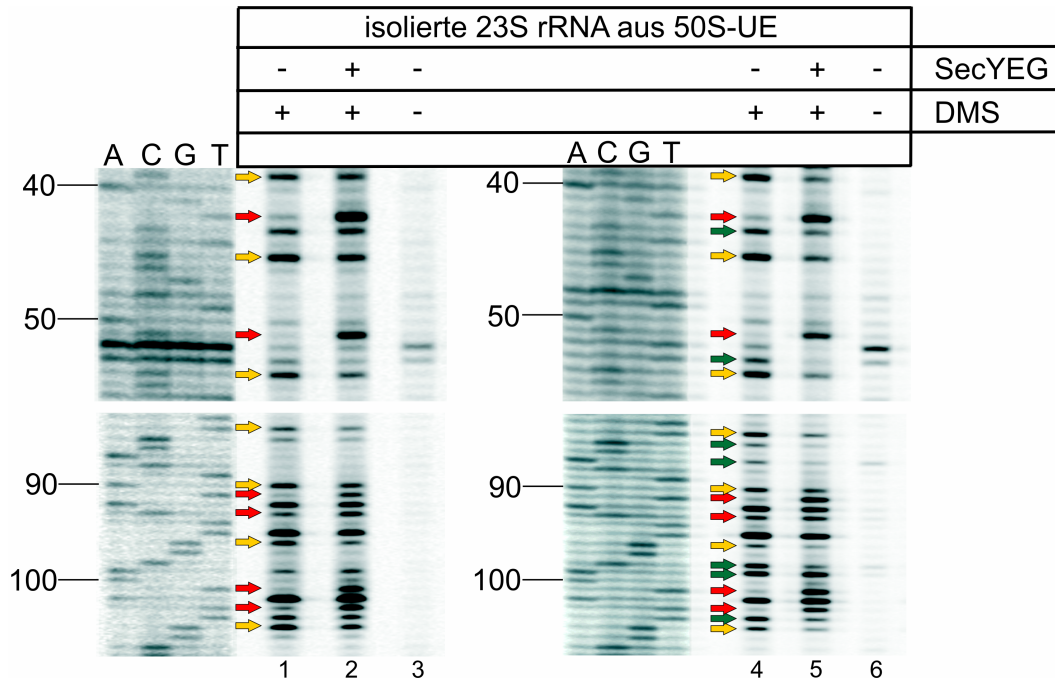
Für die Experimente wurde gereinigtes SecYEG in Proteoliposomen bestehend aus '*E. coli* Total Extrakt'-Lipid (Polar-Extrakt) rekonstituiert. Um alle Bindungsstellen in den Proteoliposomen durch isolierte 23S rRNA abzusättigen, wurden anschließend jeweils 300 pmol SecYEG-enthaltende Proteoliposomen mit 15 pmol isolierter 23S rRNA gebunden und mit DMS modifiziert. Unter gleichen Bedingungen wurde rRNA ohne die vorherige Inkubation mit SecYEG analysiert. Die Darstellung möglicher *Footprints* erfolgte wie zuvor beschrieben mittels Auftrennung der cDNA-Fragmente in einem Sequenzgel. Die Domänen I - III der 23S rRNA wurden mit insgesamt acht *Primern* analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 exemplarisch für zwei *Primer* dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden hier sowie in allen folgenden Abbildungen nur relevante Teilbereiche der Sequenzgele und nicht die kompletten Gele dargestellt.

Die Abbildung 3.4 zeigt die Analyse zweier unabhängiger Versuche mit dem *Primer* Sp1a. Für die Identifizierung von geschützten Basen durch die Anwesenheit des SecYEG-Komplexes muss das Bandenmuster ungebundener, modifizierter rRNA (Bahn 1 bzw. 4) direkt mit dem von gebundener, modifizierter rRNA (Bahn 2 bzw. 5) verglichen werden. Im Bandenmuster der modifizierten rRNA zeigten sich an einer Reihe von Positionen abgeschwächte Bandenintensitäten, wenn die rRNA vor der Modifizierung mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen inkubiert wurde (Vergleich Bahn 1 und 2 bzw. 4 und 5; gelbe Pfeile). Dies zeigt einen durch die Bindung mit den SecYEG-Proteoliposomen bedingten Schutz vor der Modifizierung mit DMS an. Die geschützten Basen waren nur teilweise in ihrer Intensität abgeschwächt. Ein komplettes Verschwinden von Banden konnte nicht beobachtet werden. Das Auftreten dieser Hintergrundbanden bei den geschützten Banden ist vermutlich auf ungebundene rRNA-Moleküle in dem Reaktionsansatz zurückzuführen. Dieser Effekt beeinflusst die Schlussfolgerung nicht, wenn er offensichtlich und reproduzierbar ist. Kontrollproben mit unmodifizierter, unbehandelter isolierter 23S rRNA wurden mitgeführt, um Spontanabbrüche zu identifizieren (Abb. 3.4, Bahn 3 bzw. 6). Keiner der beobachteten Effekte fiel mit Spontanabbrüchen zusammen. Somit resultierten die neu entstandenen Fragmente aus Abbrüchen der Reversen Transkriptase aufgrund der spezifischen Basenmodifizierungen.

Neben einer Abschwächung der Bandenintensität führte die Bindung von SecYEG an die rRNA nach der schon beschriebenen Prozedur im Modifikationsmuster auch zu Basenverstärkungen (Abb. 3.4, rote Pfeile). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung innerhalb der rRNA führt und die Basen so für eine Reaktion mit dem DMS zugänglicher werden. Da es sich hier ebenfalls um durch die Bindung des SecYEG-Komplexes hervorgerufene Veränderungen handelt, sind diese Effekte für eine Interpretation des Bindungseffektes ebenfalls von großer Bedeutung.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus den zwei unabhängigen Versuchen zeigten sich trotz der in 3.1.1 beschriebenen geringen Anfälligkeit der Methode Schwankungen im Pattern (Abb. 3.4, grüne Pfeile). Basen, die in analogen Versuchen in ihrer Reaktivität gegenüber DMS sowohl als *Footprint* als auch als Basenverstärkung detektiert wurden, traten hingegen nicht auf. Faktoren, die eine unterschiedliche Modifizierungseffizienz hervorrufen könnten, sind z.B. eine ineffiziente Bindung zwischen den Proteoliposomen und der rRNA oder Verunreinigungen durch verbliebene ribosomale Proteine. Einige Basen konnten oft erst durch Wiederholungen als *Footprints* oder Basenverstärkungen identifiziert werden. Alle weiteren Experimente wurden

daher in mindestens sieben Wiederholungen pro *Primer* durchgeführt, um eine sichere Identifikation der Modifikationsstellen zu gewährleisten. *Footprints* oder Basenverstärkungen wurden als solche gewertet und gelten als signifikant, wenn der Effekt in mindestens 50% der Fälle auftrat.

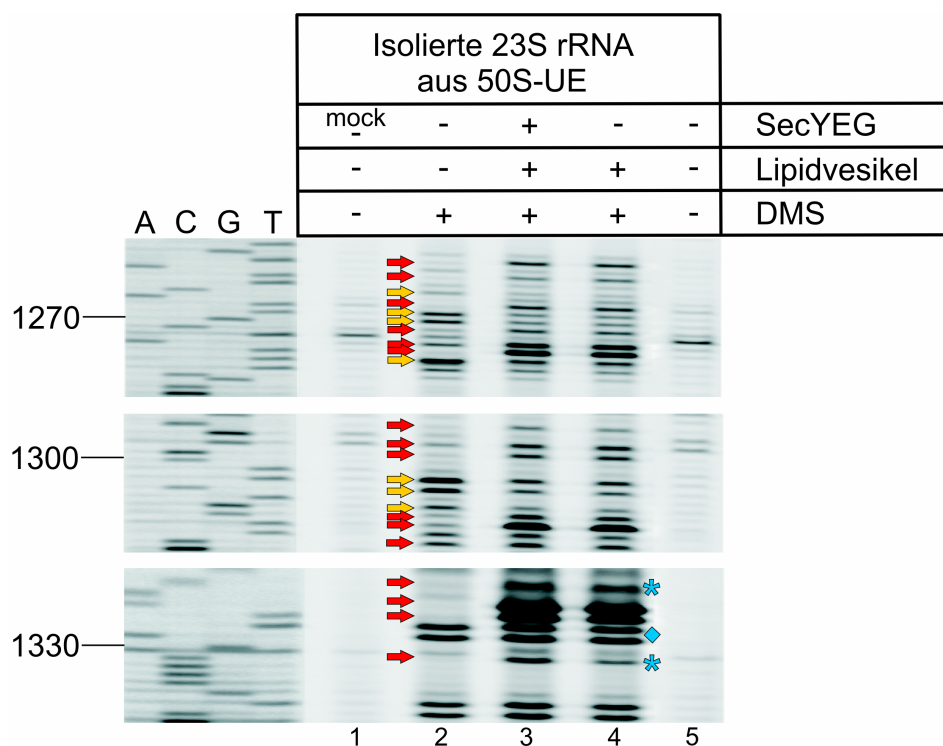


**Abb. 3.4: Reproduzierbarkeit von *Footprints* und Basenverstärkungen der 23S rRNA, die durch in Proteoliposomen rekonstituiertes SecYEG verursacht wurden**

Die isolierte 23S rRNA aus 50S Untereinheiten (50S-UE) wurde ohne (Bahn 1 und 4) und mit in Proteoliposomen rekonstituiertem SecYEG inkubiert (Bahn 2 und 5) und mit DMS behandelt. Nach der reversen Transkription mit dem *Primer* Sp1a wurden die Proben durch die Auftrennung im Sequenzgel und dem LI-COR-Sequenzierautomaten analysiert. Die Bahnen 3 und 6 zeigen die Kontrollen für Spontanabbrüche der Reversen Transkriptase, die nicht aufgrund von DMS-Modifizierungen erfolgten. *Footprints* wurden durch gelbe Pfeile markiert, Basenverstärkungen durch rote Pfeile. Basen, die in den zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ein unterschiedliches Modifizierungsverhalten aufwiesen, sind durch grüne Pfeile angezeigt. Die Nummerierung der dideoxy-Sequenzierung (Bahnen A, C, G und T) entspricht den Nukleotidpositionen bezogen auf die Nummerierung der 23S rRNA von *E. coli*.

Abbildung 3.5 zeigt die Analyse mit dem *Primer* Sp5, der zu den Nukleotiden 1390 - 1371 der 23S-rRNA komplementär ist und den Bereich der Helix 50 (1314 - 1338) während der reversen Transkription erfasst. Die Basen 1268, 1269, 1301, 1302 und 1304 weisen einen eindeutigen Schutz vor der Modifizierung mit DMS auf, wenn SecYEG-enthaltende Lipidvesikel vorhanden sind (gelbe Pfeile). Bei den Basen 1266 und 1274 hingegen handelt es sich um schwächer ausgeprägte Unterschiede, die in weiteren Versuchen als *Footprints* bestätigt werden konnten. Basenverstärkungen sind an mehreren Positionen zu detektieren und durch rote Pfeile markiert. Als zusätzliche

Kontrolle wurde in diesem Experiment auch mit SecYEG-freien Lipidvesikeln inkubierte rRNA analysiert (Abb. 3.5, Bahn 4). Erstaunlicherweise zeigte sich hier das gleiche Pattern wie mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen. Alle aufgeführten *Footprints* und Basenverstärkungen traten sowohl bei der Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen als auch bei SecYEG-freien Liposomen auf. Dies ist insbesondere bemerkenswert, weil frühere Experimente keinen Einfluss von Lipidvesikeln auf die Bindung zwischen Ribosomen und proteinleitenden Kanälen zeigten (Behrens, 2003). Allerdings waren sowohl der Schutz als auch die Verstärkungen von Basen für die Modifizierbarkeit bei Verwendung von SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen häufig stärker ausgeprägt, als bei proteinfreien Lipidvesikeln (Abb. 3.5, blaue Sterne).



**Abb. 3.5: Footprints und Basenverstärkungen im Bereich der Helix 50 der 23S rRNA**

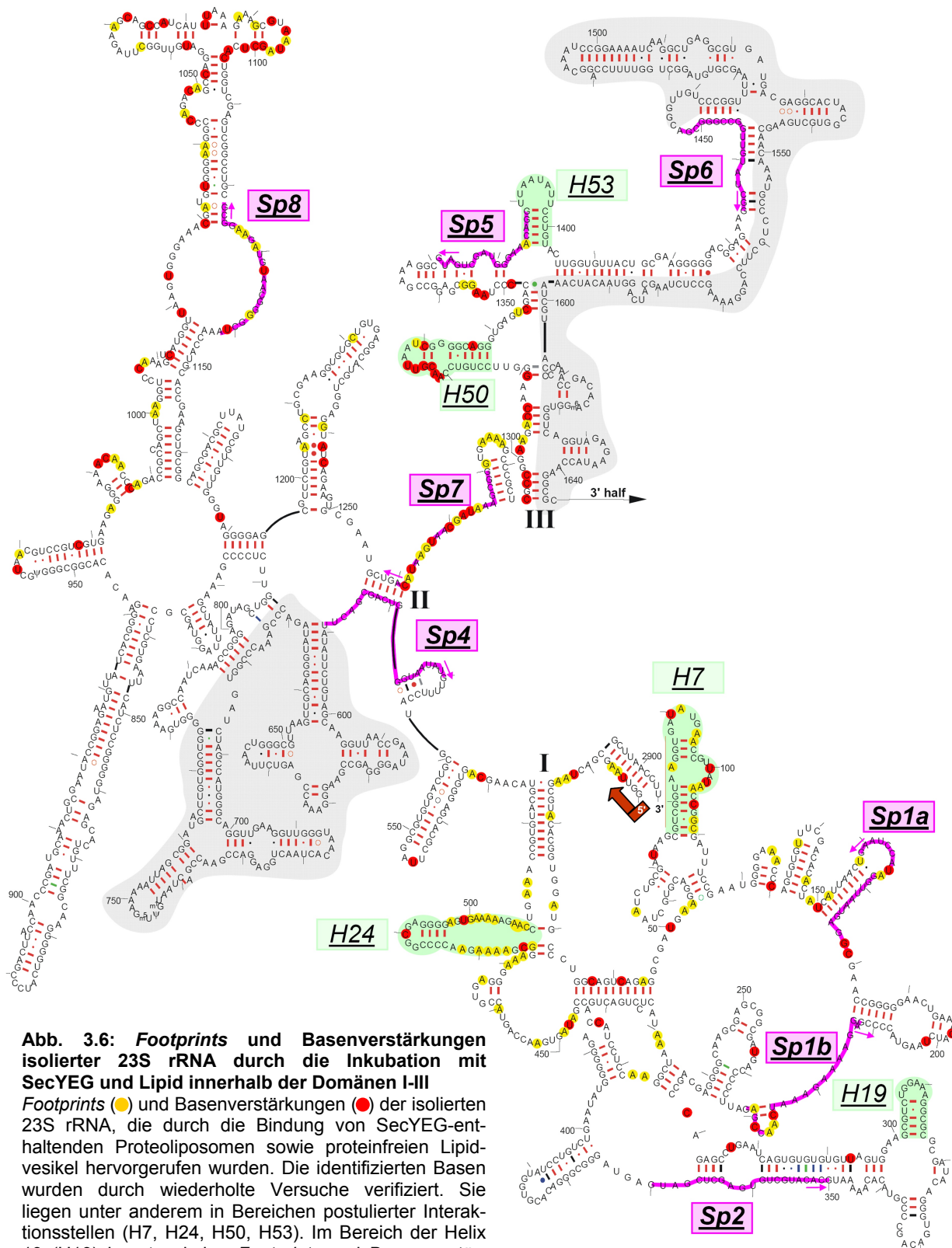
Isolierte 23S rRNA wurde mit (Bahn 3) und ohne (Bahn 2) SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen inkubiert. Parallel erfolgte die Inkubation mit proteinfreien Lipidvesikeln (Bahn 4) sowie die analoge Inkubation isolierter 23S rRNA ohne die Zugabe von Protein und DMS (Bahn 1, mock). Bahn 5 dient zur Bestimmung von Spontanabbrüchen der Reversen Transkriptase durch reverse Transkription un behandelter rRNA. Die Analyse erfolgte mit dem *Primer* Sp5 und Auftrennung der Proben im Sequenzgel. Die Bahnen A, C, G und T entsprechen der dideoxy-Sequenzierung der rRNA. Gelbe Pfeile entsprechen *Footprints*, rote Pfeile Basenverstärkungen. Lipidvesikel führten zu abgeschwächten Effekten im Vergleich zu SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen (Stern). Gleich stark ausgeprägte Bandenintensitäten modifizierter Nukleotide dienten als interne Kontrolle der Modifizierungseffizienz (Raute; siehe Text).

Für die zuverlässige Identifikation von Unterschieden in der Reaktivität gegenüber DMS beim Vergleich von reiner rRNA und an Proteoliposomen gebundene rRNA ist eine

vergleichbare Effizienz sowohl der cDNA-Synthese als auch der Modifizierungsreaktion in allen Ansätzen Grundvoraussetzung. Gleiche Bandenintensitäten an Positionen modifizierter Nukleotide, die nicht durch die Bindung des Liganden beeinflusst wurden, dienten als interne Kontrolle für die Modifizierungseffizienz der rRNAs und deuteten auf eine gleichstarke Modifizierung der verschiedenen Ansätze hin (Abb. 3.5, blaue Raute). Die Effizienz der reversen Transkription wurde durch die Intensität von Spontanabbrüchen der Reversen Transkriptase bestimmt. Vergleichbare Bandenintensitäten in allen revers transkribierten rRNA-Proben deuteten auf eine vergleichbare Anzahl revers transkribierter *Templates* hin (nicht gezeigt).

Durch die Verwendung der angegebenen *Primer* konnte ein Großteil der 5'-Hälfte der 23S rRNA sequenziert und mit Hilfe der *Footprint*-Methode analysiert werden. Abbildung 3.6 fasst die Ergebnisse der Experimente mit isolierter 23S rRNA mit acht *Primern* zusammen. Dargestellt sind durch SecYEG-Proteoliposomen bzw. proteinfreie Lipidvesikel hervorgerufene reproduzierbare und im Sinne der hier gemachten Definition signifikante *Footprints* (gelb markiert) und Basenverstärkungen (rot markiert). Bereiche, die nicht erfasst wurden und über die hier keine Aussage getroffen werden kann, sind grau unterlegt. Im Bereich der womöglich an der Bindung beteiligten Helices 7 (H7) und 24 (H24) wurden verstärkt Basen durch die Bindung mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und proteinfreien Lipidvesikeln vor Modifizierungen geschützt. Basenverstärkungen treten mit geringerer Häufigkeit auf. Die Helices 50 und 53 zeigten innerhalb der Bereiche oder in den angrenzenden Nukleotiden eine Beeinflussung. Der Bereich der Helix 19, die ebenfalls als Interaktionsbereich vorgeschlagen wurde (persönliche Mitteilung Prof. Dr. E. Hartmann), wies keine Basenveränderungen auf. Auffällig war die starke Beeinflussung der Nukleotide innerhalb der Positionen 1030 - 1110, die durch die Bindung mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen sowie proteinfreien Lipidvesikeln sowohl *Footprints* als auch Basenverstärkungen aufwies.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe der *Footprint*-Analyse sowohl *Footprints* als auch Basenverstärkungen innerhalb der 23S rRNA aufgrund der Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen bei Behandlung mit einem basenmodifizierenden Agens hervorgerufen und diese durch cDNA-Synthese und Analyse im Sequenzgel identifiziert werden konnten. Die beobachteten Veränderungen konnten erstaunlicherweise auch bei der Inkubation mit proteinfreien Lipidvesikeln beobachtet werden, so dass im weiteren Verlauf der Arbeit der Aspekt der Beeinflussung der Bindung durch Lipide untersucht wurde. Die zuvor ohne Bindungsinkubation nachgewiesene Stabilität der Methode ist während der *Footprint*-Analyse leider nicht in



**Abb. 3.6: Footprints und Basenverstärkungen isolierter 23S rRNA durch die Inkubation mit SecYEG und Lipid innerhalb der Domänen I-III**  
 Footprints (●) und Basenverstärkungen (●) der isolierten 23S rRNA, die durch die Bindung von SecYEG-enthaltenen Proteoliposomen sowie proteinfreien Lipid-vesikeln hervorgerufen wurden. Die identifizierten Basen wurden durch wiederholte Versuche verifiziert. Sie liegen unter anderem in Bereichen postulierter Interaktionsstellen (H7, H24, H50, H53). Im Bereich der Helix 19 (H19) konnten keine Footprints und Basenverstärkungen detektiert werden. Grau unterlegt sind die Bereiche, welche bei der Analyse nicht erfasst wurden. (Weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.1)

gleicher Weise reproduzierbar. Die Schwankungen könnten auf ineffiziente Bindungen zwischen rRNA und den Proteoliposomen bzw. Lipidvesikeln oder verbleibende ribosomale Proteine zurückzuführen sein. *Footprints* und Basenverstärkungen lassen sich aber durch Wiederholungen zuverlässig identifizieren. Einige der als Bindungsstellen postulierten Bereiche weisen verstärkt *Footprints* und Basenverstärkungen auf, was die Wahrscheinlichkeit für ihre Beteiligung an der Interaktion erhöht.

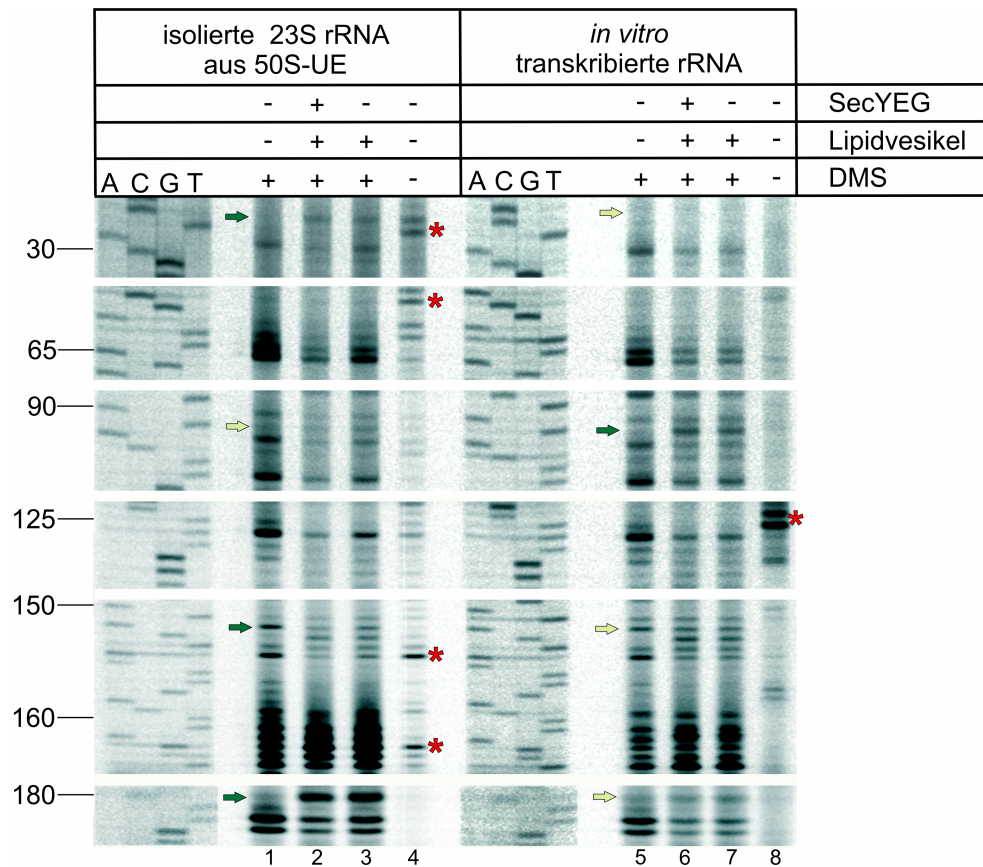
### 3.1.3 *In vitro* transkribierte 23S rRNA weist die gleiche Beeinflussung durch SecYEG-enthaltende Proteoliposomen auf wie isolierte rRNA

Um zu untersuchen, wie sehr die *Footprint*-Analyse durch nach der Reinigung noch vorhandene ribosomale Proteine oder *in vivo* Modifizierungen der rRNA, wie sie nur bei aus Organismen gereinigter rRNA vorkommen können, beeinflusst werden, wurden die Untersuchungen mit *in vitro* transkribierter 23S rRNA wiederholt.

Zur Synthese von *in vitro* transkribierter 23S rRNA diente der Vektor pXBwt, der ein Teil des *rrnB* Operons von *E. coli* enthält. Es handelt sich um das *XbaI/BamHI* Fragment, welches die Genregion des 3'-Ende der tRNA<sup>Glu2</sup> sowie die gesamte Region der 23S rRNA und 5S rRNA mit den jeweils zwischen den einzelnen Genen liegenden Sequenzen ITS2 und ITS3 (interne transkribierte Spacer) umfasst. Durch die *in vitro* Transkription des linearisierten Vektors pXBwt erhält man ein rRNA-Fragment, in dem die Sequenz der 23S rRNA in vollständiger Länge vorhanden ist. Im 5'-Bereich befindet sich zur Stabilisierung der RNA-Struktur eine Teilsequenz der tRNA<sup>Glu2</sup> sowie die Zwischensequenz ITS2 und am 3'-Ende ein Teil der ITS3 Region. Die 5S rRNA Sequenz wurde durch die Linearisierung des Plasmides mit den Restriktionsendonukleasen abgespalten. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* transkribierte rRNA zur Inkorporation in aktive Ribosomen befähigt und funktionsfähig ist (Saarma und Remme, 1992; Lewicki *et al.*, 1993). Zudem verhielt sie sich in Wettbewerbsversuchen genauso wie isolierte 23S rRNA, 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen. Sie kann also spezifisch an den SecYEG-Komplex binden (Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) isolierter 23S rRNA: 10 - 30 nM;  $K_D$  *in vitro* transkribierter rRNA: 23 - 32 nM; Behrens, 2003). Demnach ist die rRNA in der Lage, auch ohne faltungsunterstützende ribosomale Proteine die für die Bindung notwendige funktionsfähige Struktur auszubilden.

Für die vergleichende Untersuchung wurden *in vitro* transkribierte 23S rRNA und isolierte 23S rRNA in An- und Abwesenheit von SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen sowie Lipid-

vesikeln modifiziert. Das Ergebnis der Analyse mit dem *Primer* Sp1b ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen führte bei beiden rRNAs zu einem vergleichbaren Fragmentmuster (Bahnen 2 und 6). Basen, die bei den rRNA-Typen unterschiedlich reagierten, wurden in erster Linie bei isolierter rRNA detektiert. So wurden im Bereich des *Primers* Sp1b insgesamt 28 *Footprints* und Basenverstärkungen für die isolierte und die *in vitro* transkribierte rRNA identifiziert. An 11 Positionen waren Unterschiede zwischen den beiden RNAs detektierbar, wovon 8 bei der isolierten rRNA auftraten (Abb.3.7, dunkelgrüne Pfeile markieren Positionen einer auftretenden Basenveränderung, hellgrüne Pfeile die gleiche Position innerhalb des anderen rRNA-Typen ohne Effekt). Die beobachteten Schwankungsbreiten der Intensitäten zwischen den beiden rRNA-Typen sind in etwa so groß wie die Schwankungsbreiten



**Abb. 3.7: *In vitro* transkribierte 23S rRNA führt zu einem ähnlichen *Footprint*-Muster wie isolierte 23S rRNA**  
Isolierte 23S rRNA aus 50S Untereinheiten von *E.coli* und *in vitro* transkribierte 23S rRNA wurden mit (Bahnen 2 und 6) und ohne (Bahnen 1 und 5) SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen inkubiert und modifiziert. Als Kontrolle dienten Lipidvesikel die kein SecYEG enthielten (Bahnen 3 und 7). Ungebundene, unmodifizierte rRNA diente zur Bestimmung von Spontanabbrüchen der Reversen Transkriptase. Abhängig vom verwendeten *Template* kam es zu unterschiedlichen Spontanabbrüchen (Bahnen 4 und 8, Sterne). Die Nukleotidpositionen der Sequenzen (Bahnen A, C, G und T) von isolierter 23S rRNA bzw. *in vitro* transkribierter rRNA entsprechen der Nummerierung der 23S rRNA der Datenbank (links angegeben). Unterschiede zwischen isolierter und *in vitro* transkribierter 23S rRNA sind durch grüne Pfeile gekennzeichnet: dunkelgrüne Pfeile markieren die Positionen einer auftretenden Basenveränderung, hellgrüne Pfeile die gleiche Position innerhalb der jeweils anderen rRNA ohne Effekt.

Von Experimenten mit isolierter 23S rRNA. Bei den Bahnen 4 und 8 handelt es sich um die Kontrollbahnen zur Bestimmung von Spontanabbrüchen der reversen Transkription. Sie zeigten beim direkten Vergleich der beiden rRNA-Typen unterschiedliche Abbrüche der Reversen Transkriptase (rote Sterne). Die Inkubation von *in vitro* transkribierter rRNA mit proteinfreien Lipidvesikeln zeigte ebenso wie bei isolierter 23S rRNA *Footprints* und Basenverstärkungen, die sich mit denen von SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen deckten (Abb.3.7, Vergleich Bahnen 2 und 3, bzw. Bahnen 6 und 7).

Somit zeigte die *in vitro* transkribierte rRNA keine entscheidenden Unterschiede im Modifizierungsmuster zu dem von isolierter 23S rRNA. Die vorherige Anwesenheit ribosomaler Proteine ist für die Interaktion mit dem SecYEG-Komplex und die dadurch bedingten *Footprints* und Basenverstärkungen also nicht erforderlich. Ebenso können starke Einflüsse durch Restverunreinigungen mit ribosomalen Proteinen ausgeschlossen werden, da diese bei der *in vitro* transkribierten rRNA nicht vorkommen können. Die unterschiedlichen Abbrüche der Reversen Transkriptase sowie Spontanabbrüche, die verstärkt bei der isolierten rRNA auftraten, könnten auf Restverunreinigungen mit ribosomalen Proteinen oder *in vivo* Modifizierungen, wie sie nur bei isolierter rRNA auftreten können, zurückzuführen sein. Zudem könnte die transkribierte rRNA, trotz der Fähigkeit mit dem proteinleitenden Kanal zu binden, in bestimmten Bereichen eine abweichende Faltung von isolierter rRNA aufweisen, was direkten Einfluss auf die Polymerase haben könnte. Generell lässt sich aber festhalten, dass sich die *in vitro* transkribierte rRNA in eine ähnliche Struktur faltet wie isolierte rRNA, da die Nukleotide bei beiden rRNAs ähnlich zugänglich sind. Die Beobachtung, dass auch proteinfreie Lipidvesikel zu einem Modifikationsmuster führten, das dem durch Proteoliposomen hervorgerufenen ähnelte, bestätigte sich durch die Verwendung von *in vitro* transkribierter rRNA. Dies ist, wie bereits erwähnt, ein unerwarteter Befund, der durch weiterführende Analysen eingehender untersucht werden sollte.

### **3.1.4 *Footprint*-Analysen mit kompletten Ribosomen und unterschiedlichen Lipiden**

Die bisher erhaltenen und statistisch verifizierten Daten über Interaktionsbereiche der rRNA mit dem proteinleitenden Kanal sowie den Lipiden basieren auf Experimenten, in denen isolierte 23S rRNA als Interaktionspartner diente. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es sich bei einigen der detektierten Bereiche um artifizielle Interaktionsbereiche handelt, welche durch die Abwesenheit ribosomaler Proteine hervorgerufen wurden. Ferner warfen die mit proteinfreien Lipidvesikeln detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen die Frage auf, ob es sich

tatsächlich um einen lipidvermittelten Effekt handelte. Durch das Fehlen der ribosomalen Proteine könnte es zu unnatürlich verstärkt auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen der rRNA mit den geladenen Kopfgruppen der Lipide kommen. Infolgedessen wurde die Analyse mit 70S Ribosomen durchgeführt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, welchen Einfluss die kleine ribosomale Untereinheit hat, weswegen die Untersuchungen zudem mit 50S Untereinheit getestet wurde. Die Bindungsfähigkeit von Ribosomen an in Proteoliposomen rekonstituiertem SecYEG wurde zunächst im Flotationsassay überprüft und bestätigt (2.2.14; Daten nicht gezeigt).

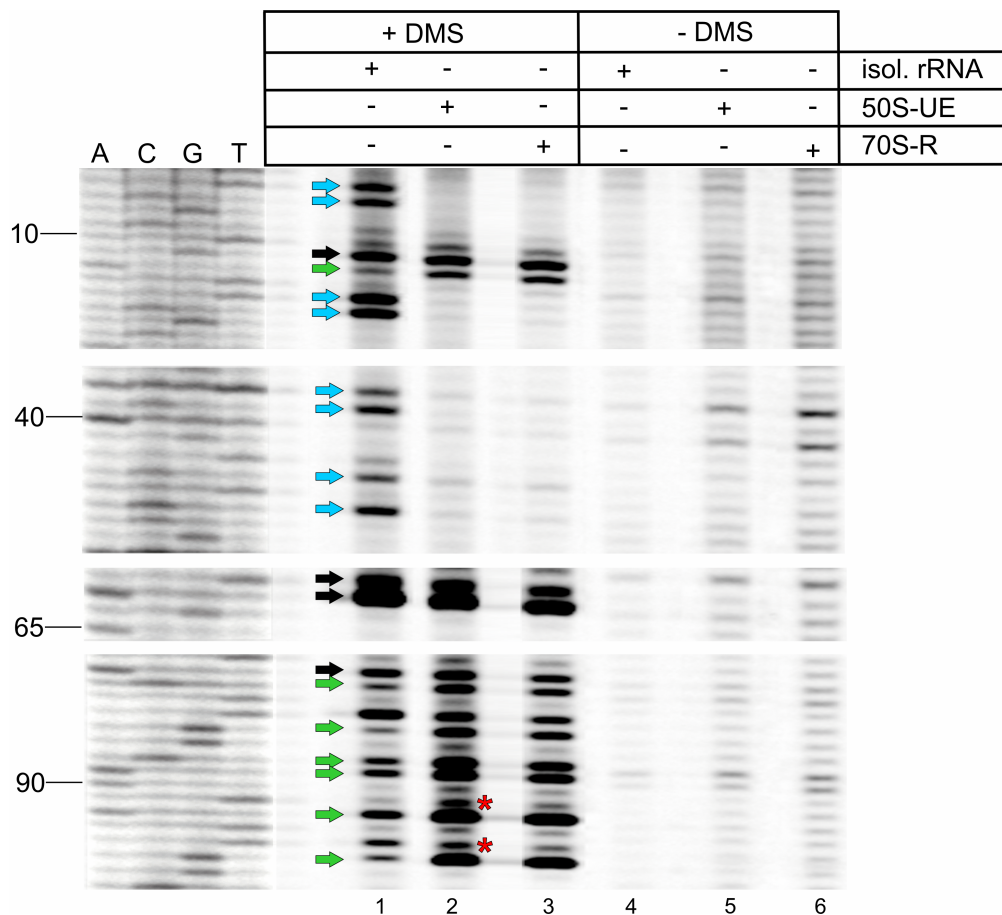
#### ***3.1.4.1 Ribosomale Proteine bewirken eine andere Zugänglichkeit der rRNA, verhindern aber nicht lipidspezifische Effekte***

Die ribosomalen Proteine sind in erster Linie der rRNA angelagert (Ban *et al.*, 2000). Sie könnten daher zu einem ausgeprägten Schutz vor Modifizierungen führen. Daher wurde in einem Vorversuch zunächst die Modifizierungseffizienz von 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen untersucht. Dafür wurden 70S Ribosomen, 50S Untereinheiten und ungebundene isolierte 23S rRNA mit DMS modifiziert und mit dem *Primer* Sp1a analysiert.

Wie in Abbildung 3.8 zu sehen, führte die Behandlung mit DMS bei 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen insgesamt zu weniger modifizierten Basen als bei isolierter 23S rRNA (Vergleich Bahnen 1 - 3, blaue Pfeile). Diese definierten *Footprints* könnten auf die Anwesenheit der ribosomalen Proteine zurückzuführen sein und dienen unter anderem als Bestätigung für die Methode. Neben den beobachteten *Footprints* kommt es bei den ribosomalen Untereinheiten bzw. 70S Ribosomen auch zu Basenverstärkungen. Das heißt, dass ribosomale Proteine in bestimmten Bereichen eine bessere Zugänglichkeit für das DMS bewirken (grüne Pfeile). Zudem verhalten sich 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen im Wesentlichen gleich (Vergleich Bahnen 2 und 3). Die auftretenden Schwankungen liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Methode. Basen, die nur in den 50S Untereinheiten reagierten (Base 90; roter Stern), könnten auf eine andere Zugänglichkeit der Basen aufgrund der fehlenden kleinen ribosomalen Untereinheit der *in vivo* an den Proteinkanal bindenden 70S Ribosomen zurückzuführen sein. Es zeigten sich auch Bereiche, in denen sich alle drei rRNA-Proben gleichartig modifizieren ließen (schwarze Pfeile). Basen, die bei isolierter rRNA und 50S Untereinheiten gleich reagierten (Base 93; roter Stern), könnten auf Restverunreinigungen mit ribosomalen Proteinen im Fall der isolierten 23S rRNA zurückzuführen sein. Unbehandelte rRNA, die unter gleichen Bedingungen wie modifizierte rRNA mit dNTP-Mix revers transkribiert wurde, diente als Kontrolle für Spontanabbrüche der Reversen Transkriptase und zeigte keine

wesentlichen Unterschiede im Modifizierungsmuster (Bahnen 4 - 6). Die unterschiedlichen Intensitäten liegen auch hier innerhalb der Schwankungsbreite der Methode.

Der direkte Vergleich von ungebundener, modifizierter isolierter rRNA, sowie 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen lässt also einen deutlichen Unterschied im Modifizierungsmuster erkennen. Im Fall der 50S Untereinheiten und der 70S Ribosomen wurden, wie erwartet, deutlich weniger Basen als bei freier rRNA modifiziert. Einerseits könnten ribosomale Proteine einen direkten sterischen Schutz bieten. Andererseits könnten sie eine andere Faltung der rRNA bewirken oder dazu führen, dass die rRNA in einer bestimmten Position verharret, wodurch die Zugänglichkeit verändert wird.

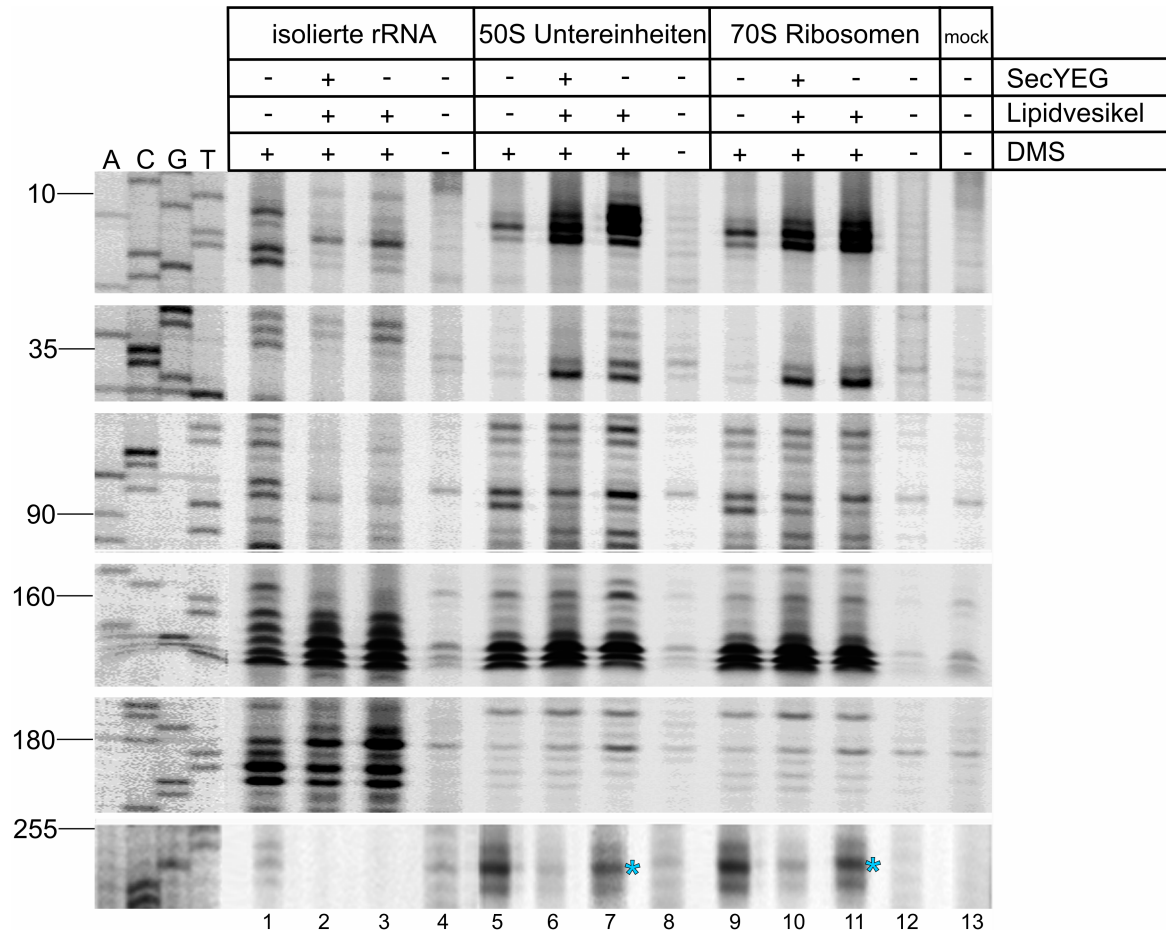


**Abb. 3.8: Die Modifizierung von isolierter 23S rRNA, 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen ergibt ein unterschiedliches Modifizierungsmuster**

Isolierte 23S rRNA (isol. rRNA), 50S Untereinheiten (50S-UE) und 70S Ribosomen (70S-R) wurden mit DMS modifiziert und mit dem *Primer* Sp1a im Sequenzgel analysiert (Bahnen 1 - 3). Unmodifizierte rRNA wurde revers transkribiert, um Spontanabbrüche in der Synthese zu detektieren (Bahnen 4 - 6). Basen, die nur bei der isolierten rRNA modifiziert wurden, sind mit blauen Pfeilen markiert. Basen, die bei 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen modifiziert wurden, sind mit grünen Pfeilen markiert. Bereiche, die bei allen drei rRNA-Proben gleich gut zugänglich waren für das DMS, wurden mit schwarzen Pfeilen markiert. Rote Sterne markieren Basen, in denen sich 50S-UE und 70S-R unterscheiden; teilweise stimmen die Intensitäten mit der isolierten rRNA überein, teilweise handelt es sich um Effekte, die nur bei 50S-UE zu finden sind (siehe Text).

Im Folgenden wurde das *Footprint*-Pattern von 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen im Zusammenhang mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und proteinfreien Lipidvesikeln untersucht. Die Analyse wurde analog zu den *Footprint*-Analysen mit isolierter rRNA durchgeführt. Da der *Primer* Sp1b qualitativ gute Sequenzen lieferte, erfolgte mit ihm die Analyse der chemischen Modifizierung. Ein Vergleich des Modifizierungsmusters von Untereinheiten bzw. Ribosomen mit dem von isolierter rRNA zeigte in beiden Fällen weniger geschützte Basen und Basenverstärkungen (Abb. 3.9, Vergleich Bahnen 1 und 2 (isolierte rRNA) mit Bahnen 5 und 6 (50S Untereinheit) sowie Bahnen 9 und 10 (70S Ribosomen)). Des Weiteren wurden in beiden Fällen im Vergleich zu isolierter rRNA neue Modifikationsstellen detektiert. Das Modifizierungsmuster der 50S Untereinheiten war hingegen mit dem der 70S Ribosomen weitgehend identisch (Abb. 3.9, Bahnen 5 - 12). Zudem gab es Bereiche, in denen die Zugänglichkeit von DMS für alle drei rRNA-Proben gleich war (Basen 163 - 165). Interessanterweise zeigten proteinfreie Liposomen auch bei Verwendung von 70S Ribosomen sowie 50S Untereinheiten keinen Unterschied im Bandenmuster verglichen zu SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen (Bahnen 7 und 11). Demnach handelt es sich bei den durch proteinfreie Lipidvesikel hervorgerufenen Basenveränderungen nicht wie zunächst vermutet um Artefakte, die auf der Abwesenheit der ribosomalen Proteine beruhen. An einigen wenigen Positionen, wie beispielhaft für die Position 256 gezeigt, führten proteinfreie Lipidvesikel zu deutlich weniger stark ausgeprägten Veränderungen im Bandenmuster als SecYEG-enthaltende Proteoliposomen (Abb. 3.9, türkise Sterne). Diese könnten demnach auf einen Einfluss des Proteinkomplexes zurückzuführen sein.

Die Sequenzierung von 70S Ribosomen erfolgte unter gleichen Bedingungen wie für isolierte 23S rRNA und lieferte Sequenzen, die qualitativ den Sequenzen der isolierten rRNA entsprachen (Abb. 3.9, Bahnen A, C, G und T). Dass ribosomale Proteine der 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen nicht zu verstärkten Abbrüchen der Reversen Transkriptase führten, ist auf die denaturierenden Versuchsbedingungen während der reversen Transkription zurückzuführen.



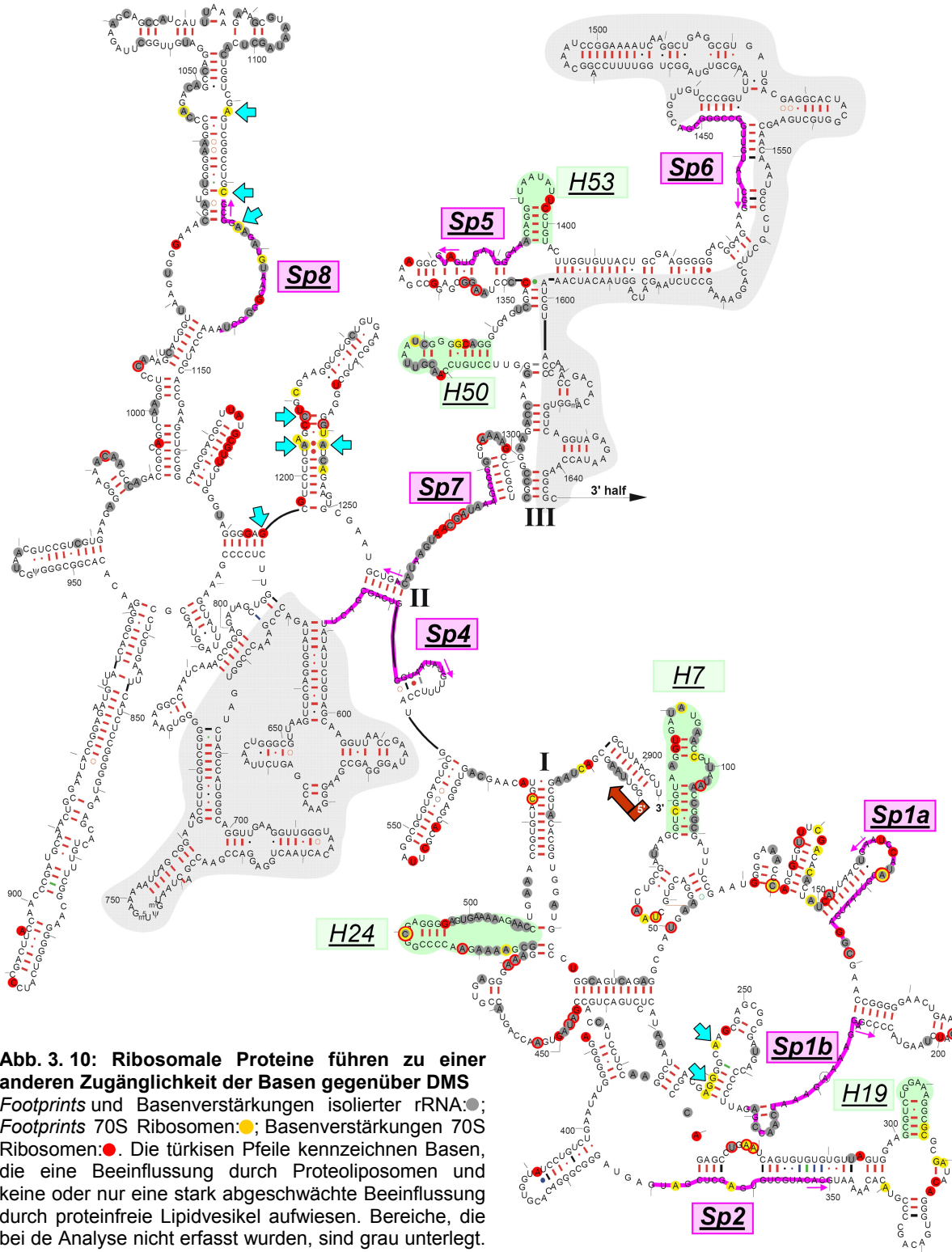
**Abb. 3.9: 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen weisen in Gegenwart von Bindungspartnern andere *Footprints* und Basenverstärkungen auf als isolierte rRNA**

Isolierte rRNA, 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen wurden ohne (Bahnen 1, 5 und 9) und mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen (Bahn 2, 6, 10), sowie dem entsprechenden Volumen an proteinfreien Lipidvesikeln (Bahnen 3, 7, 11) inkubiert, modifiziert und im Sequenzgel durch den *Primer* Sp1b analysiert. Zur Bestimmung unspezifischer Abbrüche der Reversen Transkriptase wurde jede rRNA-Probe unbehandelt revers transkribiert (Bahn 4, 8, 12). Als weitere Kontrolle erfolgte die Behandlung von 70S Ribosomen wie für die gebundenen, modifizierten rRNA-Proben unter Ausbleiben der Modifizierung (mock, Bahn 13). Die türkisen Sterne markieren eine Position, an der der Effekt durch proteinfreie Lipidvesikel deutlich schwächer ist als bei Proteoliposomen.

Die ausführliche Analyse erfolgte mit 70S Ribosomen. Die Ergebnisse sämtlicher *Primer* sind in Abbildung 3.10 zusammengefasst dargestellt. Die reproduzierbaren Effekte, die durch SecYEG-Proteoliposomen bzw. proteinfreie Lipidvesikel hervorgerufen wurden und zu mindestens 50% auftraten, wurden berücksichtigt. Bereiche die nicht erfasst wurden und über die damit keine Aussage getroffen werden konnte sind grau unterlegt. Die Modifizierung unterschiedlicher Basen sowie die geringere Anzahl an Effekten wird durch den direkten Vergleich aller detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen von 70S Ribosomen (rot und gelb) zu isolierter 23S rRNA (grau) erkennbar. Besonders im Bereich der Basen 1030 - 1100 zeigten sich zwischen isolierter 23S rRNA und 70S Ribosomen deutliche Unterschiede. Die in

diesem Bereich mit isolierter rRNA häufig auftretenden Basenverstärkungen und *Footprints* konnten bei der Inkubation mit 70S Ribosomen nicht beobachtet werden. Helix 19 wies bei 70S Ribosomen nach Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und proteinfreien Lipidvesikeln im Gegensatz zu isolierter 23S rRNA einen Schutz vor Modifizierung auf. Einige Basen wiesen bei SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen deutlich stärker ausgeprägte *Footprints* und Basenverstärkungen auf, als bei proteinfreien Lipidvesikeln (Abb. 3.10, türkise Pfeile). Die Schwankungen von Experiment zu Experiment waren zudem meist ausgeprägter. Vereinzelt konnten Basen in wiederholten Experimenten als *Footprint* sowie als Basenverstärkung detektiert werden (siehe Abb. 3.10, Basen 130, 167, 279, 280).

Es zeigte sich, dass ribosomale Proteine zu einer Änderung des Modifizierungsmusters gegenüber freier rRNA führen, wobei sowohl *Footprints* als auch Basenverstärkungen zu beobachten waren. Die ursprüngliche Annahme, dass die Entfernung der ribosomalen Proteine eine bessere Analyse der Bindung von rRNA und kanalbildendem Proteinkomplex zur Folge hat, kann verworfen werden. Möglicherweise gibt es, anders als bisher angenommen, einen Unterschied in der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der rRNA und/oder eine andere Flexibilität und Stabilität der rRNA, so dass mit isolierter rRNA möglicherweise falsch positive *Footprints* detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass auch mit dem komplexeren System, den 70S Ribosomen, die *Footprint*-Analysen erfolgreich durchgeführt werden konnten, erfolgten weiterführende Analysen mit 70S Ribosomen statt mit isolierter rRNA. Dadurch wurden im Folgenden die *in vivo* Bedingungenverhältnisse so gut wie möglich simuliert. Erstaunlicherweise konnten die durch proteinfreie Lipidvesikel hervorgerufenen Effekte auch in den Untersuchungen mit 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen beobachtet werden, so dass dieser Punkt im Folgenden einer weitergehenden Analyse bedarf. Unterschiede zwischen SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und proteinfreien Lipidvesikeln wurden nur an wenigen Positionen beobachtet.

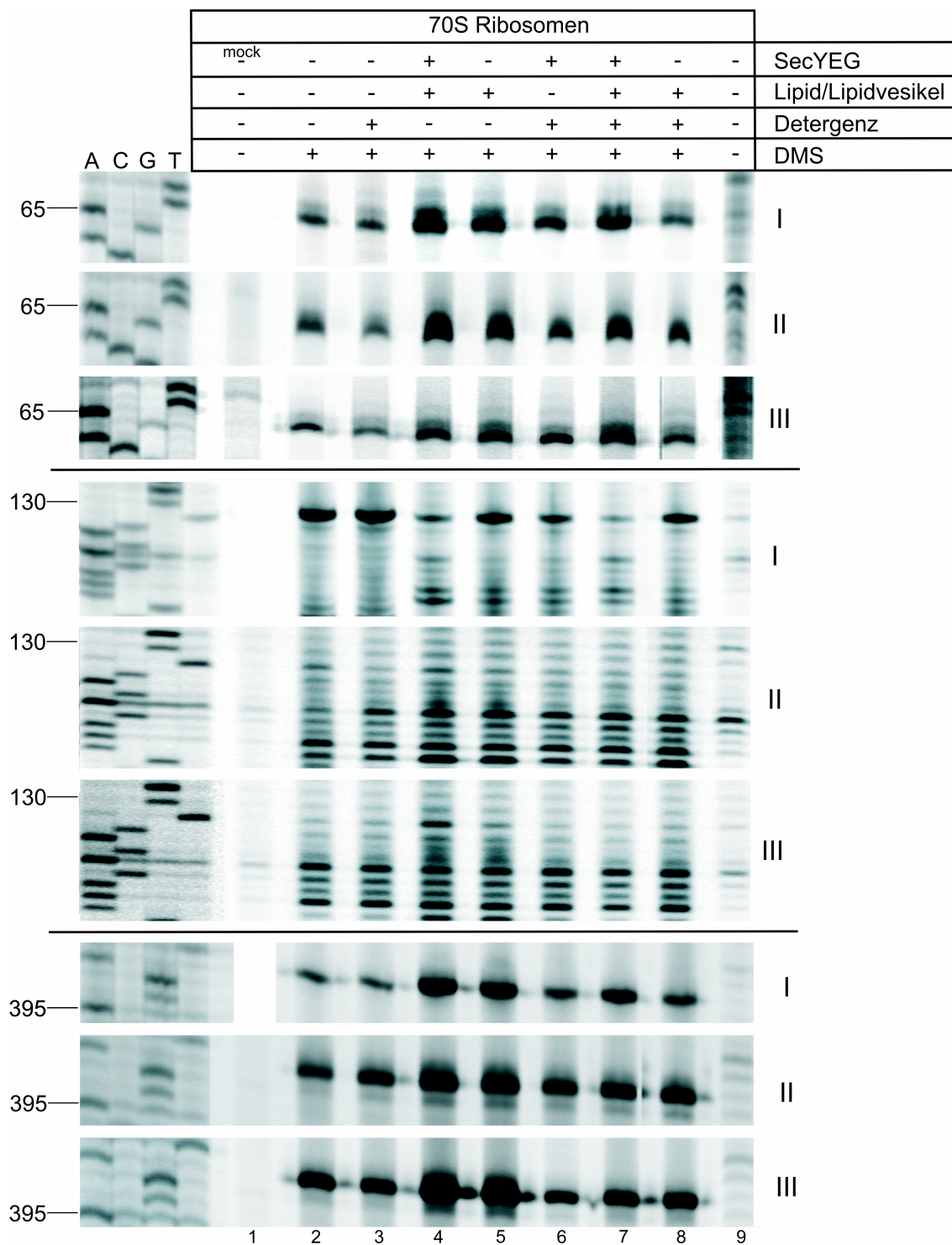


**Abb. 3.10: Ribosomale Proteine führen zu einer anderen Zugänglichkeit der Basen gegenüber DMS**  
*Footprints* und Basenverstärkungen isolierter rRNA:●; *Footprints* 70S Ribosomen:●; Basenverstärkungen 70S Ribosomen:●. Die türkisen Pfeile kennzeichnen Basen, die eine Beeinflussung durch Proteoliposomen und keine oder nur eine stark abgeschwächte Beeinflussung durch proteinfreie Lipidvesikel aufwiesen. Bereiche, die bei de Analyse nicht erfasst wurden, sind grau unterlegt. (Weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.1)

### 3.1.4.2 Footprint-Analyse mit lipidfreien SecYEG-Komplexen in Lösung

Die mit proteinfreien Lipidvesikeln erhaltenen *Footprints* und Basenverstärkungen lassen vermuten, dass die verwendeten Lipide einen Einfluss auf die Interaktion mit der rRNA haben. Um dies zu untersuchen, wurde die Bindung und Modifizierung von 70S Ribosomen mit Protein-Komplexen in Lösung ohne Lipid analysiert. Ferner sollte untersucht werden, ob Lipide in Lösung, die nicht als Vesikel vorliegen, einen anderen Einfluss auf das Bindungsverhalten haben, als Lipide, die durch Detergenzentzug Vesikel bilden.

Durch einen Vorversuch konnte gezeigt werden, dass SecYEG-Komplexe in Lösung mit gleicher Effizienz an Ribosomen binden wie in Proteoliposomen rekonstituiertes SecYEG (siehe 2.2.15; Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden 70S Ribosomen mit SecYEG-Komplex in Lösung (mit und ohne Lipid [200 µg]) sowie mit Proteoliposomen, Lipidvesikeln oder Lipid in Lösung (je *E. coli* Total Extrakt) inkubiert und modifiziert. Parallel erfolgte als Kontrolle die Modifizierung von Ribosomen in Anwesenheit von Detergenz. Die Abbildung 3.11 zeigt Teilbereiche der Analysen mit unterschiedlichen *Primern* aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Für die Interpretation von *Footprints* und Basenverstärkungen durch in Lösung vorliegende SecYEG-Komplexe, SecYEG-Komplex mit Lipid in Lösung sowie Lipide allein in Lösung (Bahnen 6, 7 und 8), musste das Bandenmuster mit dem von detergenzversetzten, modifizierten Ribosomen verglichen werden (Bahn 3). Die Interpretation der in Abbildung 3.11 dargestellten Ergebnisse war schwierig, da eine starke Variabilität zu beobachten war. So wies beispielsweise die Base 130 durch die Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und SecYEG in Lösung in Versuch I einen Schutz vor der Modifizierung mit DMS auf (Bahn 4). In den Versuchen II und III hingegen war die Abschwächung der Bande nicht zu erkennen. An anderen Positionen jedoch waren die Effekte eindeutiger und konnten statistisch belegt werden. So war beispielsweise die Basenverstärkung der Base 64 in allen Versuchen mit rekonstituiertem Proteinkomplex am stärksten ausgeprägt. Lipidvesikel zeigten leicht geringer ausgeprägte Effekte als Proteoliposomen. SecYEG in Lösung, Lipid in Lösung und SecYEG mit Lipid in Lösung zeigten tendenziell die gleichen Effekte, allerdings in deutlich abgeschwächter Form. Bei Betrachtung der drei letztgenannten Modifizierungsansätze war der Effekt bei SecYEG in Lösung am schwächsten (Bahn 6) und bei SecYEG mit Lipid meist am stärksten ausgeprägt (Bahn 7). Letzterer erreichte aber nicht die Ausprägung von SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen.



**Abb. 3.11: Footprints und Basenverstärkungen durch Proteinkomplexe sowie Lipid in Lösung**

In Proteoliposomen rekonstituierter SecYEG-Komplex (Bahn 4), SecYEG in Lösung mit (Bahn 7) und ohne Lipid (Bahn 6) sowie Lipide in Vesikeln (Bahn 5) und in Lösung (Bahn 8) wurden mit 70 S Ribosomen inkubiert und modifiziert. Exemplarisch sind die Analysen für drei Bereiche dargestellt. Starke Schwankungen der Bandenintensitäten konnten in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (I, II und III) beobachtet werden. Da die Ansätze mit Proteinkomplex oder Lipid in Lösung Detergenz enthielten, musste für die Interpretation der Bandenintensitäten die jeweilige Bahn mit der von detergentenversetzten Ribosomen verglichen werden (Bahn 3). Die Bahn 2 entspricht ungebundenen, modifizierten Ribosomen und diente zur Interpretation von Basenveränderungen der Bahnen 4 und 5. Als Kontrollen wurden die Bahnen 1 (mock) und 9 (Spontanabbrüche der Reversen Transkriptase) mitgeführt.

Aufgrund der hohen Variabilitäten der hier durchgeführten Versuche ließen sich nur wenige Effekte statistisch belegen. Dennoch war es möglich, Tendenzen innerhalb der Versuche zu erkennen:

1. An einigen Positionen hat das SecYEG in Lösung ohne die Zugabe von Lipid ebenfalls einen Einfluss auf das Modifizierungspattern. Der Schutz oder die Verstärkung ist aber deutlich schwächer ausgeprägt als bei rekonstituiertem SecYEG.
2. Auch Lipid in Lösung verursacht an einigen Positionen Effekte, welche verstärkt werden, wenn die Lipide als Vesikel vorliegen.
3. Die Effekte durch das Lipid werden meist verstärkt, wenn der Proteinkomplex ebenfalls in den Ansätzen enthalten ist. Dies gilt sowohl für Lipide die in Vesikel vorliegen als auch für Lipide in Lösung.

Es sei darauf hingewiesen, dass die meisten der Effekte durch Liposomen hervorgerufen wurden und dass der Effekt durch die Anwesenheit des SecYEG in den Vesikeln größtenteils, wie bereits unter 3.1.4.1 erwähnt, nur marginal war. Effekte, die ausschließlich durch SecYEG in Lösung hervorgerufen wurden und weder durch rekonstituiertes Protein (Proteoliposomen), Lipidvesikel, SecYEG mit Lipid in Lösung noch durch Lipid in Lösung hervorgerufen wurden, konnten für die Basen 317, 318, 1049, 1069, 1070, 1074 in Form von *Footprints* und bei Base 1036 als Basenverstärkung detektiert werden. Statistisch signifikant sind sie aufgrund der hohen Variabilität und der geringen Anzahl an Versuchen nicht. Effekte, die nur durch Lipid hervorgerufen wurden, konnten nicht detektiert werden. (Tabelle 2 im Anhang zeigt alle in den drei Versuchen detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen).

*In vitro* Bindungsstudien von SecYEG-enhaltenden Proteoliposomen und proteinfreien Liposomen (2.2.14) mit 70S Ribosomen zeigten, dass nach der Separation im Saccharosegradienten nahezu 100% der rRNA an die Proteoliposomen gebunden war. Im Gegensatz dazu erfolgte die Bindung an proteinfreie Liposomen nur mit einer Effizienz von 50% (Daten nicht gezeigt). Dies deckt sich insofern mit den erhaltenen *Footprint*-Analysen, als dass die weniger stark ausgeprägten Effekte bei proteinfreien Lipidvesikeln auf vermehrt ungebunden vorliegende 70S Ribosomen zurückzuführen sein könnten.

Demnach können die bisher detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen mit 70S Ribosomen und Proteoliposomen nicht allein auf Lipidinteraktionen zurückgeführt werden. Der Proteinkomplex allein kann mit der rRNA interagieren. Diese proteinabhängigen, ohne Lipideinfluss beobachteten *Footprints* und Basenverstärkungen wurden deutlich verstärkt, wenn

Lipid anwesend war. Dabei spielte die Art der Präsentation des Proteinkomplexes eine entscheidende Rolle: Im Vergleich zu SecYEG mit Lipid in Detergenz-Lösung begünstigte die Formation zu Vesikeln deutlich das Auftreten des *Footprint*-Pattern und zeigte die ausgeprägtesten Effekte. Das Lipid alleine hatte ebenfalls einen Einfluss und konnte zum Schutz vor Modifizierungen oder Basenverstärkungen führen. Die gleichen Tendenzen konnten auch bei der Verwendung von isolierter rRNA und SecYEG bzw. Lipid in Lösung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

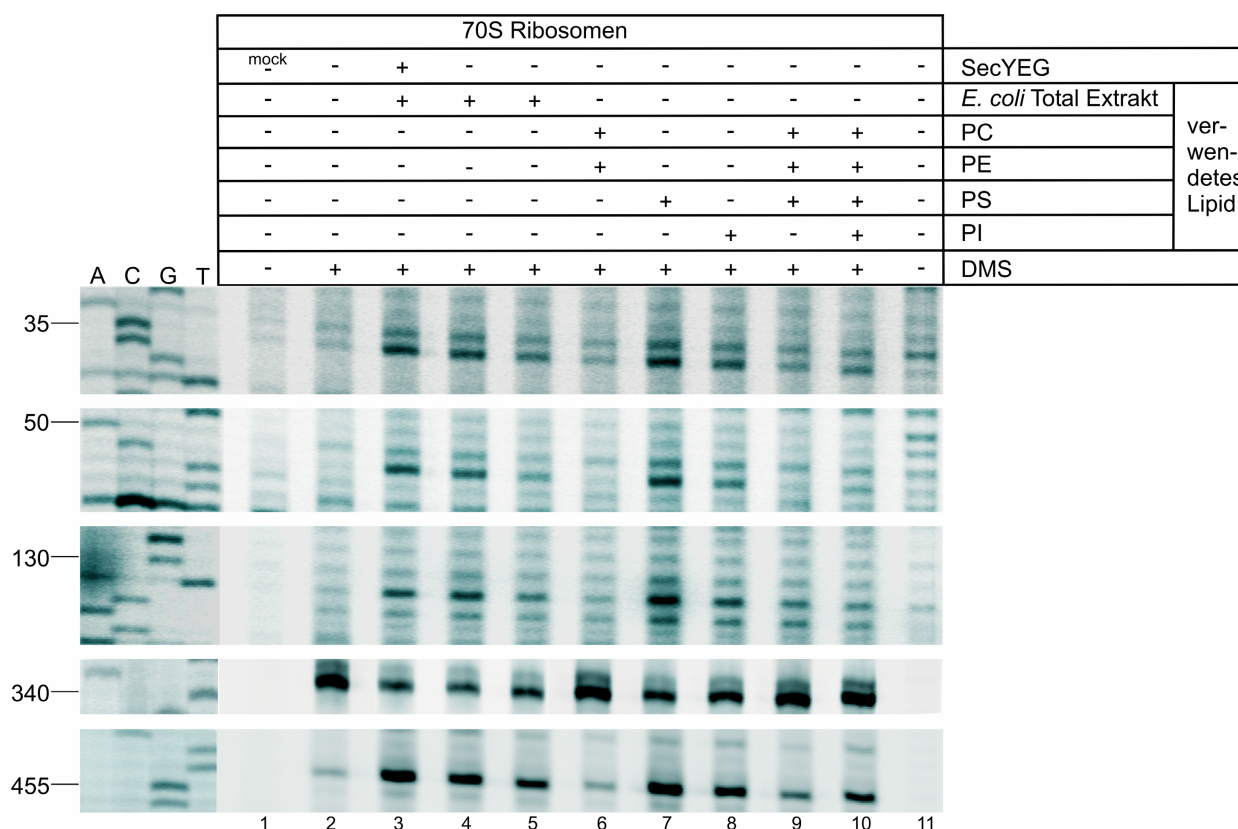
### **3.1.4.3 Anionische Lipide sind notwendig für das Auftreten des *Footprint*-Pattern**

Der beobachtete Einfluss der Lipide auf das *Footprint*-Pattern führte zu der Fragestellung, ob die Effekte abhängig von der Art des verwendeten Lipides sind, da frühere Ergebnisse unter Verwendung anderer Lipidzusammensetzung zu keinem Hinweis auf Interaktionen zwischen Lipid und Ribosom führten (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003). Daher wurde die anschließende *Footprint*-Analyse mit verschiedenen Lipiden durchgeführt.

Dafür wurden Lipidvesikel unterschiedlicher Zusammensetzung mit 70S Ribosomen inkubiert und modifiziert. Lipidvesikel folgender Zusammensetzung wurden verwendet: Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) (Verhältnis 80% : 20%), PC/PE/Phosphatidylserin (PS) (Verhältnis 60% : 20% : 20%;) und PC/PE/PS/Phosphatidylinositol (PI) (Verhältnis 60% : 20% : 5% : 15%). Letztere stellen in ihrer Zusammensetzung ungefähr die Lipidkomposition einer ER-Membran dar (Kleinig und Sitte, 4. Auflage). Die Zusammensetzung wurde leicht abgeändert, um die *in vitro* Bildung von Vesikeln zu erleichtern. Ferner wurden reine PC-, PE-, PI- und PS-Vesikel hergestellt, um den Einfluss einzelner Lipide zu untersuchen. Der für die bisher durchgeführten *Footprint*-Analysen verwendete '*E. coli* Total Extrakt' enthält die Lipide PE, (67%), Phosphatidylglycerol (PG) (~23%) und Cardiolipin (CL) (~10%). Das Volumen der Pellets nach der Bildung der Lipidvesikel war in allen Ansätzen optisch vergleichbar.

Die Analyse der rRNA in Anwesenheit unterschiedlicher Lipidvesikel ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Inkubation mit den einfach negativ geladenen Lipiden PI und PS führte zu Effekten ähnlich denen des '*E. coli* Total Extrakt' und damit rekonstituiertem SecYEG (Bahnen 3, 4, 5, 7 und 8). Dabei zeigten PI-Vesikel meist abgeschwächte Effekte gegenüber PS-Vesikeln. Die Bahnen 4 und 5 unterscheiden sich in der Menge der eingesetzten Lipidvesikel. Bahn 4 orientiert sich an der Menge an SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen, Bahn 5 entspricht den

Lipidmengen aus den Bahnen 6 - 10 (200 µg). Der `E. coli Total Extrakt` enthält mit PG und CL ebenfalls Lipide mit einer einfachen negativen Nettoladung. Die Lipide PC und PE hingegen sind Zwitterionen und weisen keine Nettoladung auf. PC/PE-Vesikel führten zu keinen ausgeprägten Veränderungen im Modifizierungsmuster (Bahn 6). Wurden Vesikel verwendet, die neben PC und PE eines der beiden negativ geladenen Lipide PS oder PI enthielten, führte dies zu einer abgeschwächten Form des *Footprint* oder der Basenverstärkung, wie er bei rekonstituiertem SecYEG oder `E. coli Total Extrakt` beobachtet wurde (Bahnen 9 und 10). Vesikel, die beide negativ geladene Lipide enthielten, verstärkten meist den Effekt, erreichten aber selten die Ausprägung von rekonstituiertem SecYEG oder `E.coli Total Extrakt`-Vesikeln (PC/PE/PS/PI-Vesikel, Bahn 10, siehe Base 453). Ribosomen, die mit PC/PE-Vesikeln inkubiert wurden, verhielten sich wie ungebundene Ribosomen und riefen demnach keinen Effekt im Modifizierungsverhalten hervor (Vergleich Bahn 2 mit Bahn 6).



**Abb. 3.12: Anionische Lipide beeinflussen das *Footprint*-Pattern**

70S Ribosomen wurden ohne Interaktionspartner (Bahn 2) und mit Lipidvesikeln unterschiedlicher Komposition (Bahnen 4 - 10) inkubiert, modifiziert und im Sequenzgel analysiert. Lipide mit negativen Ladungen, einzeln (Bahnen 7 und 8) oder im Mix mit anderen Lipiden (Bahnen 9 und 10), waren ausschlaggebend für das typische *Footprint*-Pattern. `E.coli Total Extrakt` (Bahnen 4 und 5), welches für die Rekonstitution des SecYEG-Komplexes genutzt wurde (Bahn 3), wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Für den Ansatz der Bahn 4 wurde Lipid entsprechend der Proteoliposomen-Menge eingesetzt, Bahn 5 entspricht mit 200 µg der eingesetzten Menge an Lipiden in den Bahnen 6 - 10. Bahnen 1 und 11 wurden zur Bestimmung von Spontanabbrüchen der Reversen Transkriptase und als Negativkontrolle mitgeführt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass für das Auftreten des bisher beobachteten typischen lipidabhängigen *Footprint*-Patterns das Vorhandensein von anionischen Lipiden wichtig ist. PC/PE-Vesikel, die aus Lipiden mit einer Nettoladung von null bestehen, haben keinen Einfluss auf das *Footprint*-Pattern. *Footprint*-Analysen, die mit isolierter 23S rRNA und Lipidvesikeln unterschiedlicher Zusammensetzung durchgeführt wurden, zeigten die gleiche Abhängigkeit gegenüber anionischen Lipiden wie bei 70S Ribosomen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

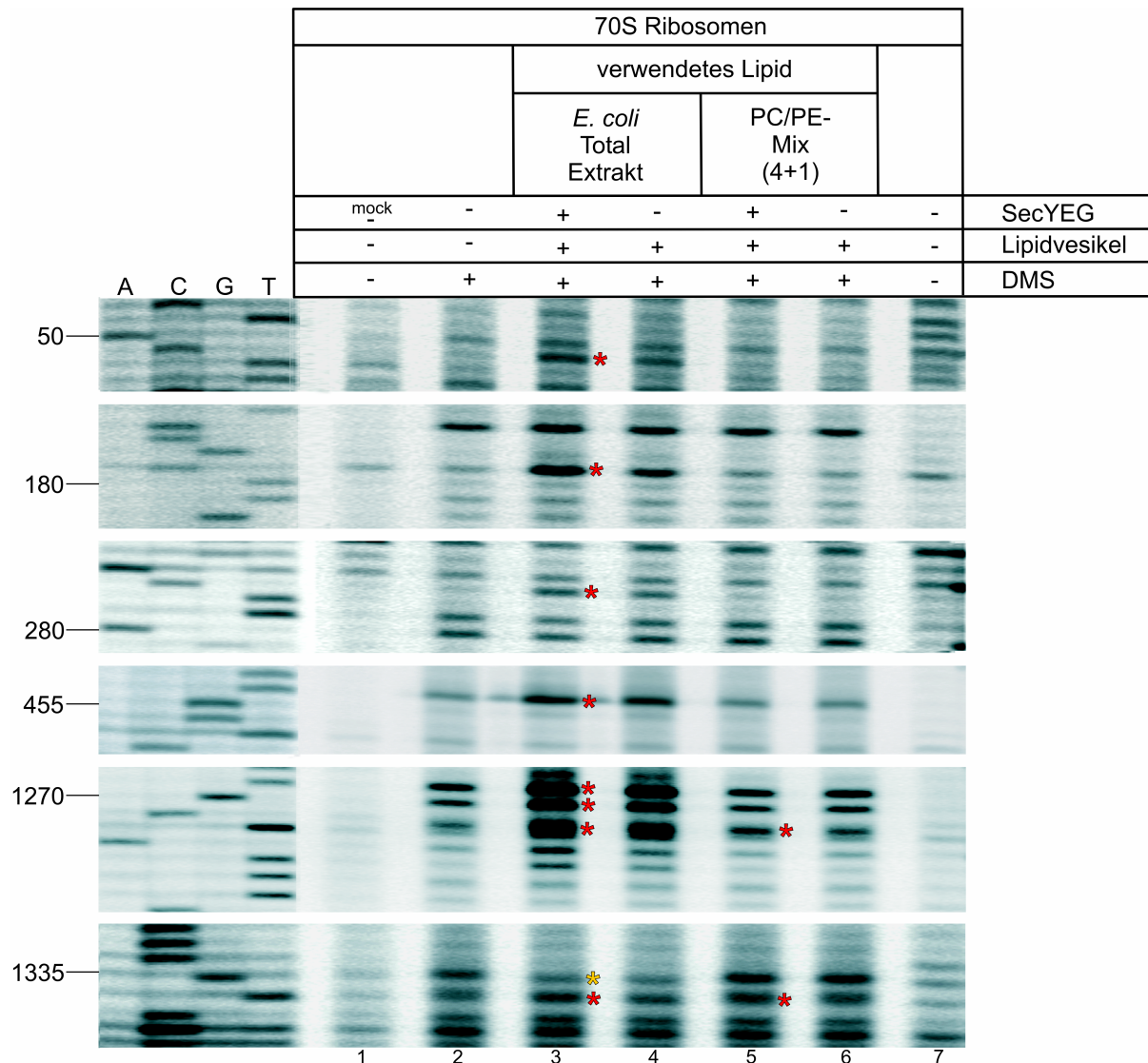
#### **3.1.4.4 In PC/PE-Vesikel rekonstituiertes SecYEG verhält sich anders als mit `E.coli Total Extrakt` rekonstituiertes SecYEG**

Die Beobachtung, dass PC/PE-Lipidvesikel keinen Einfluss auf das *Footprint*-Pattern hatten, führte zu der Überlegung den Lipideinfluss auf das Modifizierungsmuster durch Rekonstitution in PC/PE-Vesikel zu minimieren. Wenn Unterschiede im Bandenmuster zwischen SecYEG-enthaltenden PC/PE-Vesikeln und proteinfreien PC/PE-Vesikeln detektierbar wären, könnten diese auf das Protein zurückgeführt werden. Die Bindungsfähigkeit der Ribosomen an SecYEG-enthaltenden PC/PE-Vesikeln wurde im Ribosomen-Bindungsassay nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Um die Modifizierungsmuster von rekonstituiertem SecYEG in PC/PE-Vesikeln mit `E. coli Total Extrakt`-Proteoliposomen zu vergleichen, wurden 70S Ribosomen mit den entsprechenden SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen sowie proteinfreien Lipidvesikel inkubiert und analysiert. Die Abbildung 3.13 zeigt das spezifische *Footprint*-Pattern bei 70S Ribosomen, die mit `E. coli Total Extrakt`-enthaltenden Proteoliposomen inkubiert wurden (Bahn 3 und 4). Die Verwendung von PC/PE-Lipid-Mix führte zu deutlich weniger *Footprints* und Basenverstärkungen. Lediglich an den Nukleotidpositionen 1271, 1329 und 1335 konnten Basenverstärkungen detektiert werden, die sowohl mit Proteoliposomen als auch mit proteinfreien PC/PE-Vesikeln auftraten. An den gleichen Position führten auch Vesikel aus `E.coli Total Extrakt` zu Effekten (Abb. 3.13, Sterne). Für die hier detektierte Base 1271 konnte in den Versuchen mit Bindungspartnern in Lösung (3.1.4.2) eine Beeinflussung durch SecYEG und/oder Lipiden in Lösung beobachtet werden.

Mit dem Einsatz der künstlichen, nicht der *E. coli* Membran entsprechenden Lipide, kann kein deutlicher Schutz der rRNA durch SecYEG während der *Footprint*-Analyse nachgewiesen werden. Die PC/PE-Proteoliposomen sowie -Lipidvesikel führten zu deutlich reduzierten Basenveränderungen. Es zeigten sich nur dann Effekte mit Proteoliposomen, wo auch mit reinen Lipidvesikeln Veränderungen hervorgerufen wurden. Somit konnten keine lipidunabhängigen Basenverän-

derungen beobachtet werden. Da in 3.1.4.2 gezeigt wurde, dass SecYEG durchaus *Footprints* und Basenverstärkungen hervorrufen kann, kann mit den hier gemachten Beobachtungen keine weitere Aussage getroffen werden. Scheinbar ist die Zugänglichkeit für das DMS durch PC und PE, beides Lipide die keine Nettoladung aufweisen, entscheidend herabgesetzt. Dies unterstützt die zuvor gemachte Beobachtung, dass anionische Lipide das Auftreten der Basenveränderungen begünstigen.



**Abb. 3.13: In PC/PE-Lipid-Vesikel rekonstituierter SecYEG-Komplex zeigt ein anderes *Footprint*-Verhalten**  
 70S Ribosomen wurden mit SecYEG-Komplex, welcher in '*E. coli* Total Extrakt' (Bahn 3) und PC/PE-Lipid-Mix (Bahn 5) rekonstituiert wurde, inkubiert, modifiziert und analysiert. Entsprechend wurden proteinfreie Lipidvesikel mit Ribosomen inkubiert und analysiert (Bahn 4 bzw. 6). Als Negativkontrolle erfolgte die analoge Behandlung von 70S Ribosomen in Abwesenheit von Proteoliposomen, Lipidvesikeln und DMS (Bahn 1, mock). Zur Identifikation von *Footprints* und Basenverstärkungen wurden 70S Ribosomen in Abwesenheit von Proteoliposomen oder Lipidvesikeln modifiziert (Bahn 2). Bahn 7 dient zur Bestimmung der Spontanabbrüche. Die Analyse der revers transkribierten rRNA-Proben erfolgte im Sequenzgel. Veränderungen im Modifizierungsmuster durch die Anwesenheit von Proteoliposomen oder Lipidvesikeln sind durch Sterne angezeigt; rote Sterne markieren Basenverstärkungen, gelbe *Footprints*.

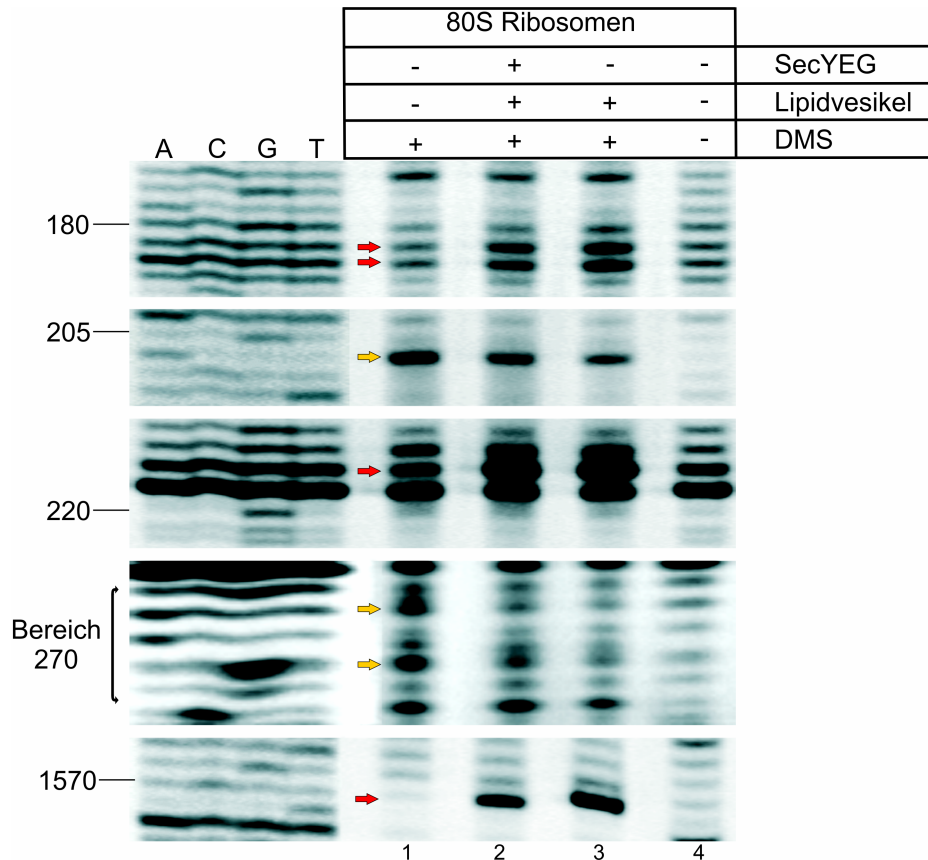
### **3.1.5 Führt der Austausch der Interaktionspartner auf rRNA- und Protein-Ebene zu gleichen Lipideffekten?**

In den durchgeführten Analysen konnte ein Einfluss von Lipiden auf das *Footprint*-Pattern beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Lipide einen Einfluss auf die Interaktion mit dem proteinleitenden Kanal haben. Um zu untersuchen, ob die Situation bei eukaryontischen Komponenten eine andere ist, so dass die Lipideffekte keine Rolle mehr spielen, wurden die Interaktionspartner variiert. Dafür wurde zum einen die Modifizierungseffizienz von 80S Ribosomen und zum anderen der Einfluss des eukaryontischen heterotrimeren Sec61-Komplex analysiert.

#### ***3.1.5.1 Auch die 28S rRNA aus 80S Ribosomen wird durch die Inkubation mit proteinfreien Lipidvesikeln vor Modifizierungen geschützt***

Es wurde untersucht, ob die 28S rRNA der 80S Ribosomen durch Lipide genauso beeinflusst wird wie die 23S rRNA der 70S Ribosomen. Zu diesem Zweck wurden 80S Ribosomen durch Puromycin-Hochsalz (PK)-Behandlung von rauen Hundemembranen (hRM) abgewaschen und mit SecYEG enthaltenen Proteoliposomen und proteinfreien Lipidvesikeln analog zu den *Footprint*-Analysen mit 70S Ribosomen analysiert.

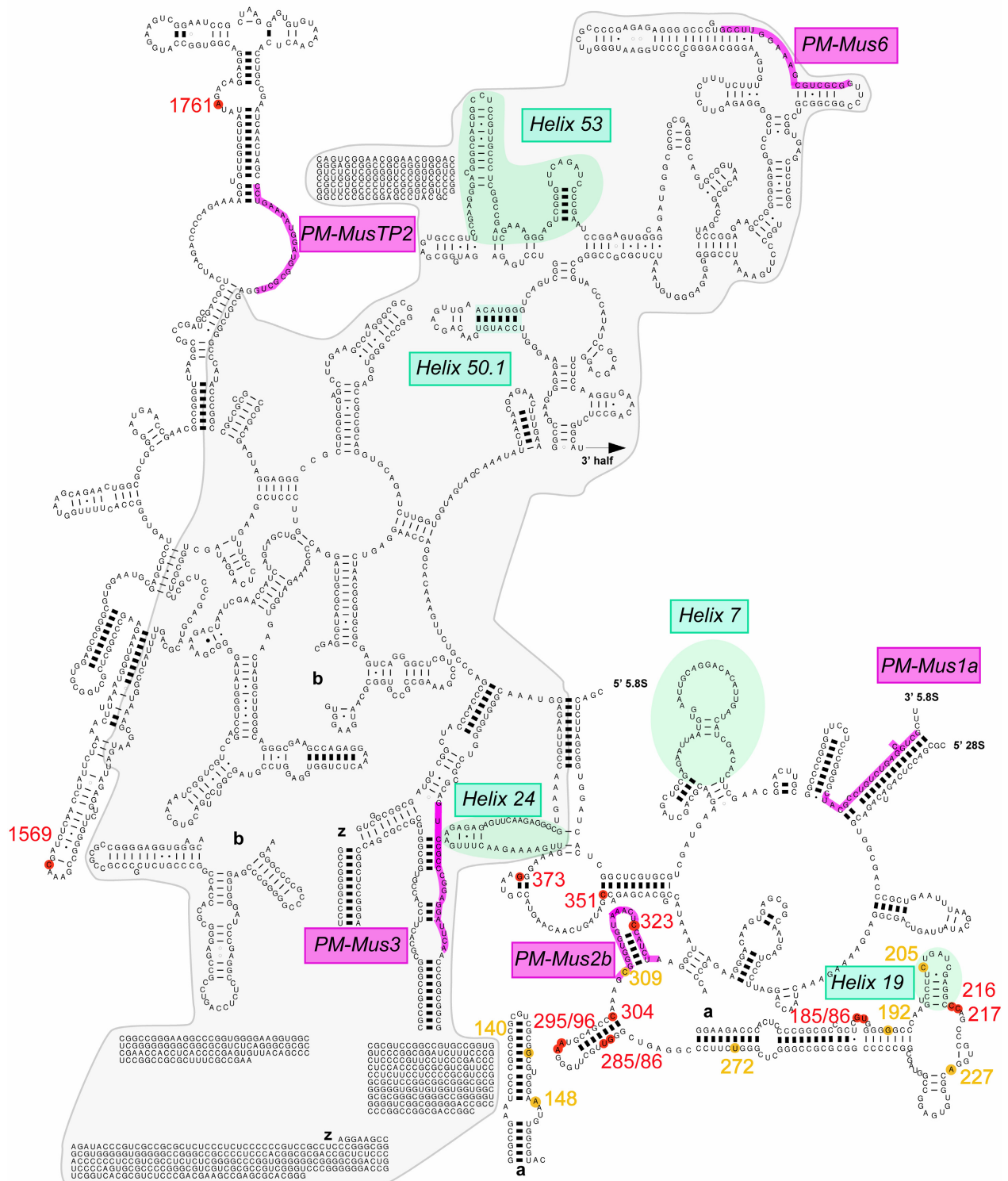
Da die 5.8S rRNA und 28S rRNA der großen ribosomalen Untereinheit von 80S Ribosomen in ihrer Sekundärstruktur ähnliche Stammschleifenstrukturen ausbilden wie die 23S rRNA von 70S Ribosomen, wurde analog zur 23S rRNA die 5'-Hälfte der 28S rRNA untersucht. Aufgrund dessen wurden fünf *Primer* komplementär zu Bereichen der 28S rRNA von *M. musculus* entworfen und zunächst die Sequenzierung der 28S rRNA getestet. Eine Sekundärstruktur für die 28S rRNA von *C. lupus familiaris* war nicht verfügbar. Es zeigte sich, dass die Sequenzierung der 80S Ribosomen nicht mit gleicher Qualität erfolgte wie die der 70S Ribosomen. Die Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch Teile der Sequenz sowie der *Footprint*-Analysen für die *Primer* PM-Mus 3b und PM-Mus TP2. Viele unspezifische Strangabbrüche erschwerten die Auswertung und machten diese für viele Bereiche unmöglich. Dennoch konnte für einige Basen ein durch die Inkubation mit SecYEG bedingter Schutz vor Modifizierungen oder Basenverstärkungen identifiziert werden (Abb. 3.14, gelbe und rote Pfeile). Es wird deutlich, dass alle detektierten Effekte, die durch SecYEG-enthaltende Proteoliposomen hervorgerufen wurden, auch mit proteinfreien Lipidvesikeln auftraten.



**Abb. 3.14: Auch 80S Ribosomen erfahren durch proteinfreie Lipidvesikel einen Schutz vor Modifizierungen bzw. Basenverstärkungen**

80S Ribosomen wurden mit in Proteoliposomen rekonstituiertem SecYEG-Komplex (Bahn 2) und proteinfreien Lipidvesikeln (Bahn 3) inkubiert und modifiziert und zur Identifikation von Effekten mit ungebundenen, modifizierten 80S Ribosomen verglichen (Bahn 1). Die Bahn 4 diente zur Bestimmung von Spontanabbrüchen der Reversen Transkriptase. Die Analyse erfolgte mit *Primern*, die komplementär zu Bereichen der 28S rRNA von *M. musculus* waren. Die angegebenen Nukleotidpositionen links neben der Sequenz (Bahnen A, C, G und T), entsprechen der Nummerierung der 28S rRNA von *M. musculus* aus einer Datenbank. Im Bereich der Nukleotide 270 war eine exakte Zuordnung aufgrund verstärkt auftretender Abbrüche innerhalb der Sequenzen nicht möglich. Basenverstärkungen sind rot, geschützte Basen gelb markiert.

In Abbildung 3.15 sind die statistisch belegbaren Ergebnisse aller Experimente dargestellt. Sie zeigt die 2D-Struktur der 28S rRNA von *M. musculus* und die mit den unterschiedlichen *Primern* in 80S Ribosomen von *C. lupus familiaris* detektierten und zuordnungsbaeren *Footprints* und Basenverstärkungen. Neben der Beobachtung, dass auch 80S Ribosomen einen Lipideffekt erkennen lassen, zeigte sich, dass die detektierten Basen im Vergleich mit der Sequenz der 23S rRNA von *E. coli* an ähnlichen Positionen auftraten. So befindet sich die geschützte Base 205 strukturell betrachtet innerhalb der zu *E. coli* homologen Helix 19, die Basenverstärkungen 185, 186, 216 und 217 sowie die *Footprints* an den Positionen Position 192 und 227 in den angrenzenden Bereichen. Die Basenverstärkung 373 liegt in unmittelbarer Nähe zu der in *E. coli* homologen Helix 24 und deckt sich mit der in 70S Ribosomen hervorgerufenen Basenverstär-



**Abb. 3.15:** Die 28S rRNA eukaryontischer Ribosomen weist durch die Inkubation mit SecYEG-Komplex analoge *Footprints* und Basenverstärkungen wie die 23S rRNA auf. Durch die Inkubation von 80S Ribosomen (*C. lupus familiaris*) mit rekonstituiertem SecYEG-Komplex hervorgerufene *Footprints* (gelb) und Basenverstärkungen (rot). Dargestellt ist die 28S rRNA von *M. musculus*. Die Positionen entsprechen der Nummerierung der 28S rRNA von *M. musculus*. Mehrere Basen sind identisch zu Positionen innerhalb der 23S rRNA von *E. coli* (siehe Text). Grau unterlegt sind die Bereiche, welche bei der Analyse nicht erfasst wurden. (Quelle: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>; *M. musculus*, X00686)

kung 470 (siehe Abb. 3.6). Die Helix 24 der 80S Ribosomen konnte leider nicht erfolgreich beprobt werden. Die Bereiche der Basen 272, 295/96, 351, 1569 und 1761 liegen nicht innerhalb der für die Interaktion vorgeschlagenen Helices, aber für diese Basen wurden fast nukleotidgenau innerhalb der 23S rRNA entsprechende Effekte detektiert (Vergleich Abb. 3.10, Base 362, 391, 477, 896 und 1046). Für die Basenveränderungen 140, 148, 285/286, 304, 309 und 323 konnten weder analoge Basen innerhalb der 23S rRNA bestimmt werden noch befinden sie sich im Bereich von vorgeschlagenen Helices.

Für einige *Footprints* und Basenverstärkungen war die Zuordnung aufgrund schlechter Sequenzqualitäten nicht möglich. Besonders in Untersuchungen mit dem *Primer* PM-Mus6 konnte durch verstärkt auftretende Strangabbrüche dieser Bereich nicht analysiert werden. Der *Primer* PM-Mus1a hingegen lieferte qualitativ sehr gute Sequenzen der 5.8S rRNA. Die 5.8S rRNA ist homolog zu dem 5'-Ende der bakteriellen 23S rRNA, während die 28S rRNA homolog zu dem Rest der 23S rRNA ist (Nazar, 1980). Somit ist die 5.8S rRNA unter anderem zu den Helices 7 - 10 von *E. coli* homolog, in denen zuvor durch die Inkubation mit Protein deutlich *Footprints* und Basenverstärkungen detektiert werden konnten (siehe Abb. 3.10). Innerhalb der 5.8S rRNA konnten allerdings nur sehr wenige Modifizierungen beobachtet werden. Durch die Inkubation mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen wurden unter den hier verwendeten Bedingungen weder Basen geschützt noch kam es zu SecYEG-bedingten Basenverstärkungen (Daten nicht gezeigt). Die Vermutung, dass auch bei den 80S Ribosomen in diesem Bereich Basen durch die Bindung des SecYEG-Komplexes vor Modifizierungen geschützt bzw. stärker präsentiert werden, konnte nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch bei 80S Ribosomen in Gegenwart von proteinfreien Lipidvesikeln ein Modifizierungsmuster zu beobachten ist. Somit ist der Effekt nicht spezifisch für 70S Ribosomen.

### ***3.1.5.2 In 'E. coli Total Extrakt' rekonstituierte heterotrimere Sec61-Komplexe führten zu gleichen Modifikationsmustern wie SecYEG-Komplexe***

Der heterotrimere bakterielle SecYEG-Komplex und der eukaryontische Sec61-Komplex sind insbesondere im cytoplasmatischen Bereich homolog, wodurch die Bindung der heterologen Interaktionspartner möglich war (Prinz *et al.*, 2000). Um 70S Ribosomen mit dem eukaryontischen heterotrimeren Sec61-Komplex im *Footprint*-Assay zu analysieren, wurde der heterotrimere Proteinkomplex aus Membranen von Hundepankreas aufgereinigt und anschließend in

Proteoliposomen (*E. coli* Total Extrakt) rekonstituiert. Bindungsstellen, die normalerweise mit Lipiden interagieren, könnten durch den größeren heterotrimeren Sec61-Komplex besetzt werden. Die Ribosomenbindungsfähigkeit des gereinigten heterotrimeren Sec61-Komplexes wurde zuvor im Ribosomenbindungsassay überprüft (siehe 2.2.15, Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob der Einfluss des heterotrimeren Sec61-Komplex bei 70S Ribosomen dem von SecYEG-Komplexen entspricht, wurden 300 pmol rekonstituierter heterotrimerer Sec61-Komplex (*E. coli* Total Extrakt) und 15 pmol Ribosomen inkubiert. Um 300 pmol rekonstituierte Sec61-Komplexe einsetzen zu können, musste das Volumen der Bindungsreaktion auf 60 µl hochgesetzt werden. Für die Modifizierungsreaktion wurden alle Volumina entsprechend verdoppelt, die Sequenzreaktion und Analyse erfolgte nach Protokoll.

Das *Footprint*-Pattern des heterologen Bindungspartners Sec61 ist vergleichbar mit dem durch SecYEG hervorgerufenen Pattern. Unterschiede durch die verschiedenen rekonstituierten Komplexe waren nur an der Nukleotidposition 1195 zu beobachten. Die Base 1195 zeigte in Anwesenheit des rekonstituierten SecYEG-Komplexes eine bessere Zugänglichkeit gegenüber dem DMS. Diese Basenverstärkung war weder mit Sec61-enthaltenden Proteoliposomen zu beobachten noch mit proteinfreien Lipidvesikeln (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Austausch der Interaktionspartner sowohl auf ribosomaler Ebene als auch auf Proteinebene keine Veränderungen bei den durch die proteinfreien Lipidvesikel hervorgerufenen Effekten zeigte. Eine Maskierung des größeren Sec61-Komplexes konnte nicht beobachtet werden.

## 3.2 Untersuchungen des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 während der cotranslationalen Translokation

Wie der Sec61-Komplex ist auch RAMP4 Ribosomen assoziiert. Es wurde bei der Reinigung von heterotrimeren Sec61-Komplexen aus Hundemembranen co-aufgereinigt und ist nur für Eukaryonten beschrieben. Die Rolle von RAMP4 während der Translokation von Proteinen über die ER-Membran ist, im Gegensatz zu der des heterotrimeren Sec61/SecYEG-Komplexes, weitgehend unbekannt.

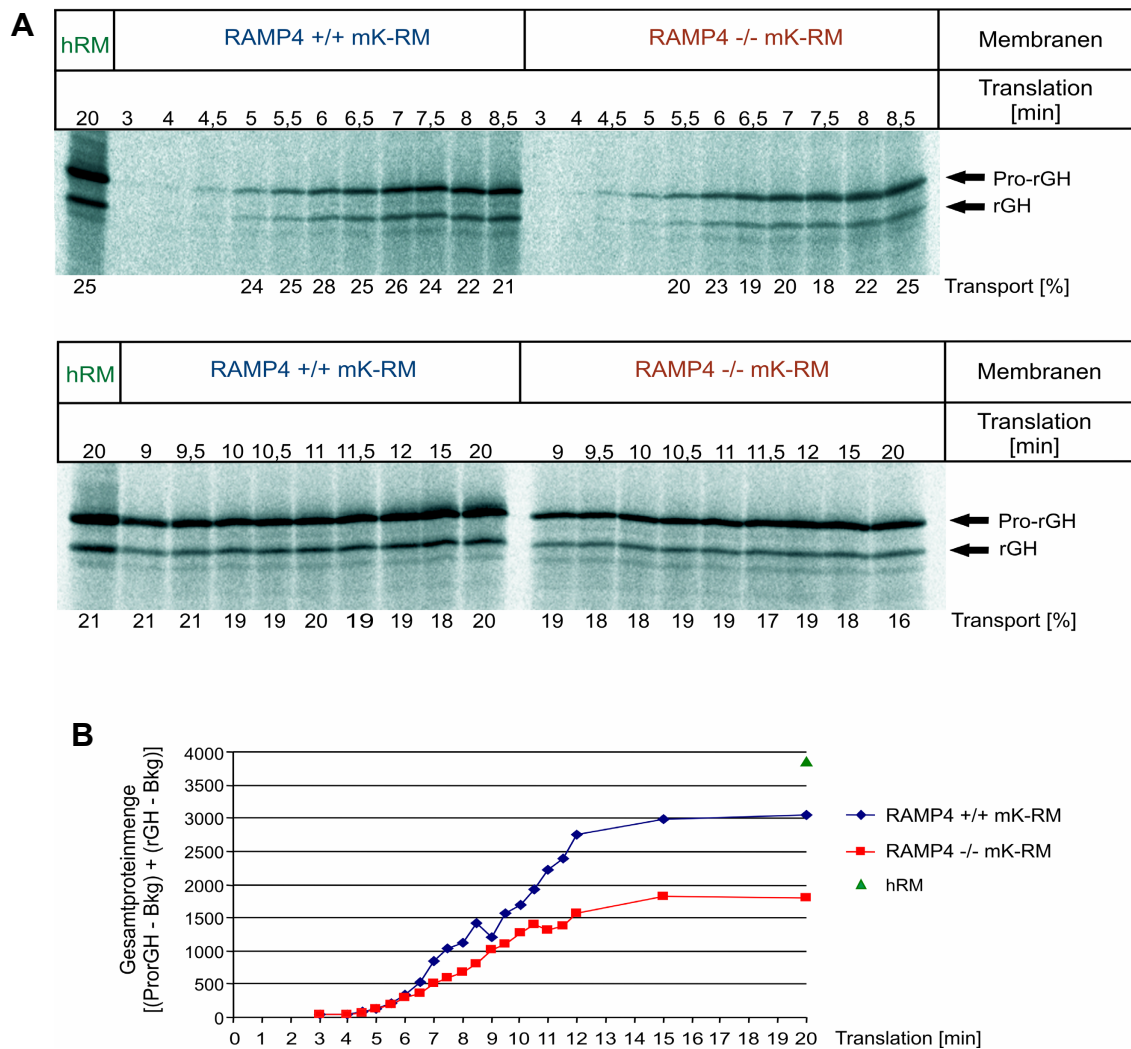
### 3.2.1 Die Translokation ist in Abwesenheit von RAMP4 nicht beeinträchtigt

Um die Funktion von RAMP4 beim Proteintransport durch die ER-Membran zu untersuchen, wurde im *in vitro* Translations/Translokations-Assay die Translokationseffizienz von ER-Membranen aus homozygoten RAMP4-*Knock-out*-Mäusen untersucht. Das *Knock-out*-Modell bietet den Vorteil, neben dem direkten Effekt von RAMP4 auf die Translokation auch mögliche physiologische Auswirkungen auf den Gesamtorganismus wie beispielsweise die Membranbiogenese zu untersuchen. RAMP4 *Knock-out*-Mäuse (RAMP4 *-/-*), in denen das RAMP4-Gen durch homologe Rekombination homozygot ausgeschaltet wurde, sind bis auf ein leicht reduziertes Körpergewicht pränatal phänotypisch unauffällig. Im Laufe der postnatalen Entwicklung kommt es aber zu Wachstumshemmungen und einer erhöhten Sterblichkeit (Hori *et al.*, 2006). Die Konzentration an Wachstumshormon (*growth hormone*, GH) im Blut zeigte bei RAMP4 *-/-* Mäusen nach der Stimulierung mit Insulin eine deutliche Reduktion gegenüber der von Wildtyp-Mäusen. Daher wurde postuliert, dass das RAMP4 eine Rolle bei der Bereitstellung von Polypeptidhormonen spielen könnte (Hori *et al.*, 2006).

Um dies zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die mRNA des Wachstumshormons der Ratte (*rat growth hormone*-mRNA, rGH-mRNA) in Anwesenheit von hochsalzbehandelten Pankreasmembranen (mK-RM) von RAMP4 *-/-*-Mäusen und RAMP4-Wildtyp-Mäusen (RAMP4 *+/+*) translatiert. Die Translation erfolgte im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, in Anwesenheit der radioaktiv markierten Aminosäure Methionin. Das Vorhandensein von Membranen führt zur Translokation des Pro-Proteins (Pro-rGH), und es kommt infolgedessen zur Reifung des sekretorischen Proteins durch die Abspaltung der Signalsequenz. Der Gehalt an transloziertem Protein wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt.

Nach 30 minütiger Translation war der Gehalt an transloziertem Protein in Anwesenheit von RAMP4 *-/-* bzw. RAMP4 *+/+* mK-RM vergleichbar. Der Gehalt an Pro-Protein (Pro-rGH)

hingegen war bei RAMP4  $-/-$  mK-RM reduziert (Daten nicht gezeigt). Da beobachtet werden konnte, dass neben einer verminderten rGH-Sekretion der rGH-Gehalt im Blut nach Insulingabe bei RAMP4  $-/-$  Mäusen zeitverzögert einsetzte (Hori *et al.*, 2006), wurde die Kinetik der Synthesegeschwindigkeit sowie der Translokation von rGH bestimmt. Dafür wurden aus einem Mehrfachansatz zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Synthesebeginn Aliquots entnommen, die Reaktion abgestoppt und durch SDS-PAGE und Autoradiogramm analysiert.



### Abb. 3.16: RAMP4 hat keinen Einfluss auf die Translokation von rGH

(A) rGH-mRNA wurde in Anwesenheit von hochsalzbehandelten Mauspankreasmembranen (mK-RM) von RAMP4  $+/+$  und RAMP4  $-/-$  Mäusen (sowie rauen Hundemembranen (hRM) als Kontrolle) im Kaninchen-Retikulozyten-System translatiert. Aus einem Mehrfachansatz wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 - 20 Minuten) Aliquots entnommen und denaturiert. Die Analyse der radioaktiv markierten Produkte erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Der prozentuale Anteil an transloziertem rGH (Transport [%]) berechnete sich aus dem Gehalt an Radioaktivität des translozierten rGH (rGH) geteilt durch die Gesamtradioaktivität (rGH + ProrGH) mal 100. Es wurde jeweils die bahnspezifische Hintergrundschwärzung (*Background*, Bkg) abgezogen.

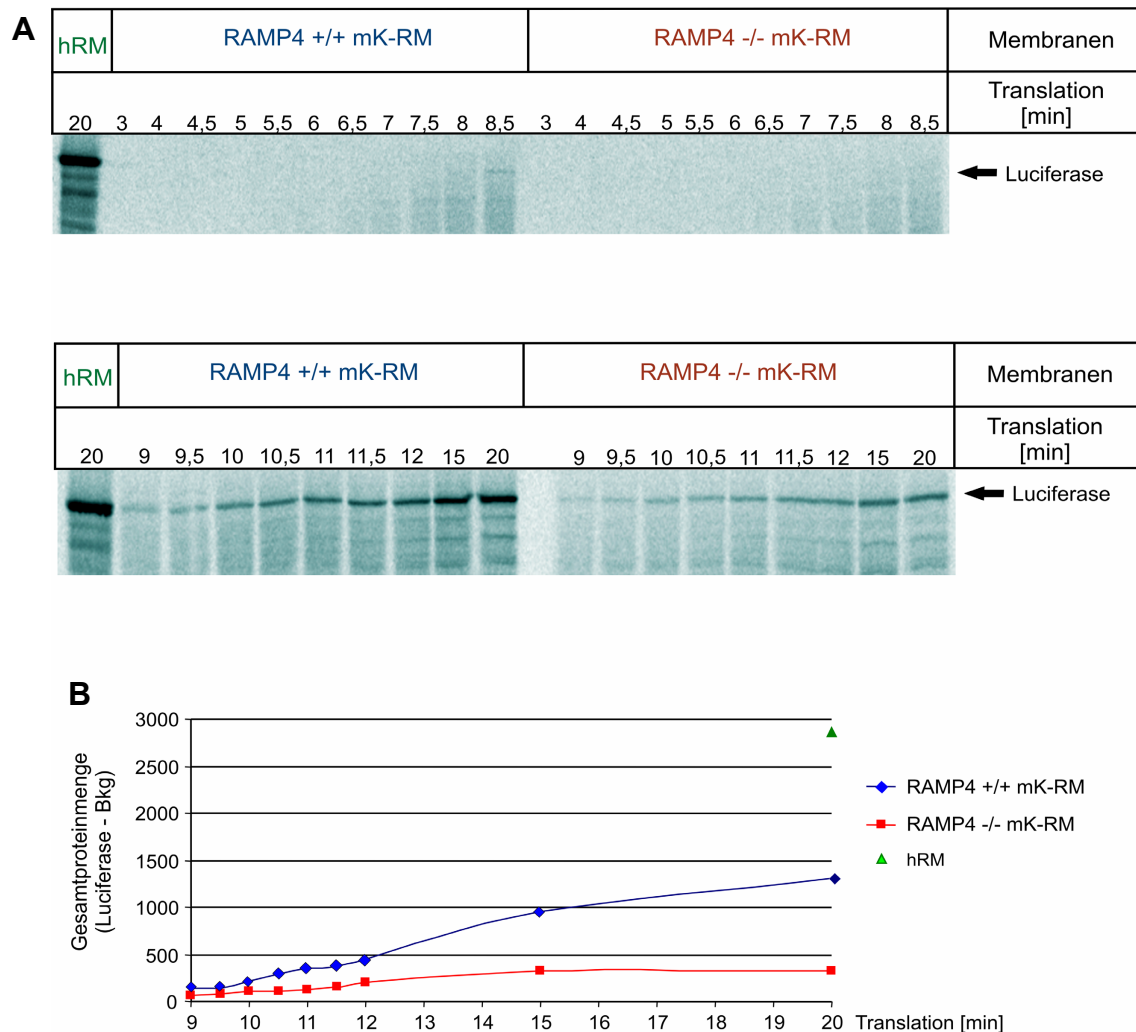
(B) Die Gesamtproteinmenge jeder Bahn wurde nach Abzug der bahnspezifischen Hintergrundschwärzung (Bkg) durch Addition der Radioaktivität beider Produkte ermittelt  $[(\text{ProrGH} - \text{Bkg}) + (\text{rGH} - \text{Bkg})]$ .

Die Abbildung 3.16 zeigt, dass die Biosynthese von rGH bei Membranen von Wildtyp- und *Knock-out*-Mäusen deutlich jeweils ab der fünften Minute einsetzt. Das Maximum der Pro-rGH-Synthese war bei RAMP4  $-/-$  mK-RM nach ca. 12 - 15 Minuten erreicht, bei RAMP4  $+/+$  mK-RM nach ca. 15 Minuten. Die Transporteffizienz des Pro-Proteins zeigt bei beiden Membran-Typen keinen deutlichen Unterschied, die höchste Transporteffizienz wird bei den RAMP4  $+/+$  Membranen allerdings früher erreicht, als bei RAMP4  $-/-$  Membranen (nach 7 min bei RAMP4  $+/+$  bzw. nach 8 min 30 s bei RAMP4  $-/-$  Membranen). Ein signifikanter Unterschied war hingegen beim Gehalt an Pro-Protein sowie transportiertem Protein in Anwesenheit von RAMP4  $-/-$  Membranen zu beobachten, er war bei RAMP4  $-/-$  mK-RM eindeutig reduziert (Abb. 3.16 B). Zur Überprüfung der Translations- und Translokationseffizienz von rGH-mRNA wurde rGH in Anwesenheit von rauen Hundemembranen (hRM) synthetisiert. Die Synthese fand unter denselben Bedingungen statt und wurde nach 20 min beendet (Abb. 3.16, erste Bahn von links). Die Translation in Anwesenheit von hRM diente zur Kontrolle, um spezifische Effekte durch die mK-RM ausschließen zu können. Es zeigte sich, dass hRM generell eine weniger stark ausgeprägte Hemmung der Translation aufwies als mK-RM (Abb. 3.16 B, grünes Dreieck). Der Transport hingegen zeigte ebenfalls keinen Unterschied.

Um zu testen, ob es sich um einen für rGH spezifischen Effekt handelt, wurde die Translation in Anwesenheit der Mausmembranen mit weiteren Proteinen getestet. In Abbildung 3.17 ist die Analyse am Beispiel des cytosolischen Proteins Luziferase gezeigt. Cytosolische Proteine besitzen keine Signalsequenz für die Translokation in das ER-Lumen. Daher kommt es zu keiner Verkürzung der Luziferase Ketten aufgrund Signalsequenzabspaltung durch die Signalpeptidase während der cotranslationalen Translokation in Anwesenheit von Membranen. Die Inkubation von Luziferase-mRNA mit RAMP4  $-/-$  mK-RM führte zu einem ähnlichen Effekt bezüglich des Proteingehaltes wie sie für rGH beobachtet werden konnte (Abb. 3.17 A). Wiederum konnte eine deutlich verminderte Gesamtproteinmenge festgestellt werden (Abb. 3.1.7 B). Die Translation in Anwesenheit von rauen Hundemembranen (hRM) diente als Kontrolle, um spezifische Effekte durch die mK-RM ausschließen zu können. Die herabgesetzte Translation des rGH ist somit nicht auf die Biosynthese von sekretorischen Proteinen beschränkt, sondern kann auch für cytosolische Proteine beobachtet werden.

Die Versuche wurden zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse mit zwei unabhängig voneinander gewonnenen Membranpräparationen durchgeführt. Sowohl der beobachtete Hemmeffekt als auch der Verlauf der Kinetiken sowie das leicht zeitversetzte Einsetzen der

Translation/Translokation bei RAMP4  $-/-$  mK-RM war signifikant. Somit kann ein präparationsbedingtes Artefakt der Membranen ausgeschlossen werden. Eine wesentliche Beeinflussung durch das Fehlen von RAMP4 für die Translokation sekretorischer Proteine konnte nicht beobachtet werden. Hingegen zeigte sich durch die Abwesenheit von RAMP4 ein Einfluss auf die Biosynthese, sowohl bei sekretorischen als auch bei cytosolischen Proteinen.



**Abb. 3.17: Die Translation des cytosolischen Proteins Luziferase ist in Anwesenheit von RAMP4  $-/-$  Membranen reduziert**

(A) Luziferase-mRNA wurde in Anwesenheit von mK-RM von RAMP4  $+/+$  und RAMP4  $-/-$  Mäusen sowie hRM im Kaninchen-Retikulozyten-System translatiert. Aus einem Mehrfachansatz wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (3 - 20 Minuten) Aliquots entnommen, denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

(B) Die Gesamtproteinmenge jeder Bahn wurde nach Abzug des bahnspezifischen Hintergrundes (Bkg) bestimmt.

## 4. DISKUSSION

Für den Transport von Proteinen über die ER-Membran der Säuger wurde eine Gruppe von Proteinen definiert, die aufgrund ihrer Affinität zu cotranslational translozierenden Ribosomen als Ribosomen-assoziierte Membranproteine, RAMPs, bezeichnet wurden. Ein Teil dieser Proteine wurde später als Ribosomenrezeptor identifiziert, wozu der heterotrimeren Sec61-Komplex gehört. Für andere RAMPs konnte keine Ribosomenrezeptorfunktion nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit je einem Vertreter dieser RAMPs bzw. seinen homologen bakteriellen Komponenten gearbeitet.

### 4.1 Untersuchung der Interaktion zwischen proteinleitenden Kanälen und rRNA/Ribosomen

Cotranslational translozierende Ribosomen interagieren mit dem in die Membran eingebetteten heterotrimeren SecYEG/Sec61-Komplex, welcher den proteinleitenden Kanal bildet. Durch Bindungsstudien konnte die rRNA der großen ribosomalen Untereinheit als ein Interaktionspartner für den proteinleitenden Kanal bestimmt werden (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003), die exakten Proteinbindungsstellen der rRNA sind jedoch bisher unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die *Footprint*-Methode die Interaktion von rRNA und proteinleitenden Kanälen mit einem alternativen experimentellen Ansatz untersucht, in dem die Modifizierbarkeit der rRNA in Anwesenheit des SecYEG-Komplexes direkt untersucht wurde. Ein überraschender Befund war, dass Lipide, die für die Rekonstitution von Proteinkomplexen eingesetzt wurden, allein zu *Footprints* und Basenverstärkungen führten, die den mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen erhaltenen Effekten entsprachen. In den meisten Fällen wurde der Lipideinfluss durch die Anwesenheit des SecYEG-Komplexes verstärkt, aber nur an wenigen Positionen wurden Effekte allein durch SecYEG-Komplexe verursacht. Es zeigte sich, dass anionische Lipide entscheidend für das Auftreten der beobachteten Änderungen im Modifizierungsmuster waren. Weiterhin zeigte die rRNA durch die Anwesenheit ribosomaler Proteine eine andere Stabilität und Flexibilität als bei isolierter, proteinfreier rRNA. Entgegen den Erwartungen war es jedoch nicht möglich, exakte *Footprints* zu bestimmen, wie sie mit dieser Methode bereits für andere RNA-Protein-Interaktionen nachgewiesen wurden.

#### 4.1.1 Mehrere Bereiche der 23S rRNA werden durch die Bindung mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen und Lipidvesikeln in ihrer Zugänglichkeit beeinflusst

Zunächst wurde die *Footprint*-Analyse mit isolierter 23S rRNA und in Proteoliposomen rekonstituierten SecYEG-Komplexen sowie mit proteinfreien Lipidvesikeln durchgeführt. Isolierte rRNA stellt ein möglichst einfaches und wenig störanfälliges System dar. Mit ihr war es möglich *Footprints* und Basenverstärkungen reproduzierbar und statistisch abgesichert zu identifizieren. Im weiteren Verlauf wurden die *Footprint*-Analysen auch mit 70S Ribosomen erfolgreich durchgeführt. Somit war die ursprüngliche Annahme, dass die Entfernung der ribosomalen Proteine eine bessere *Footprint*-Analyse der Bindung von rRNA und kanalbildenden Proteinkomplex ermöglicht, inkorrekt. Ob hervorgerufene *Footprints* auf der direkten Interaktion der rRNA mit den SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen bzw. proteinfreien Lipidvesikeln oder auf einer schlechteren Zugänglichkeit der Nukleotide durch bindungsbedingte Strukturveränderungen der rRNA beruhen, kann hier allerdings nicht beantwortet werden. Strukturveränderungen und eine dadurch bedingte bessere Zugänglichkeit der Nukleotide für das Modifizierungsreagenz DMS können auch für das Auftreten der Basenverstärkungen verantwortlich gemacht werden. In früheren Untersuchungen wurden Strukturveränderungen innerhalb der rRNA durch Interaktionspartner unter anderem durch die Bindung des P-Komplexes sowie durch die Bindung der Aminoacyl-tRNA beobachtet (Uchiumi und Kominami, 1997; Valle *et al.*, 2003).

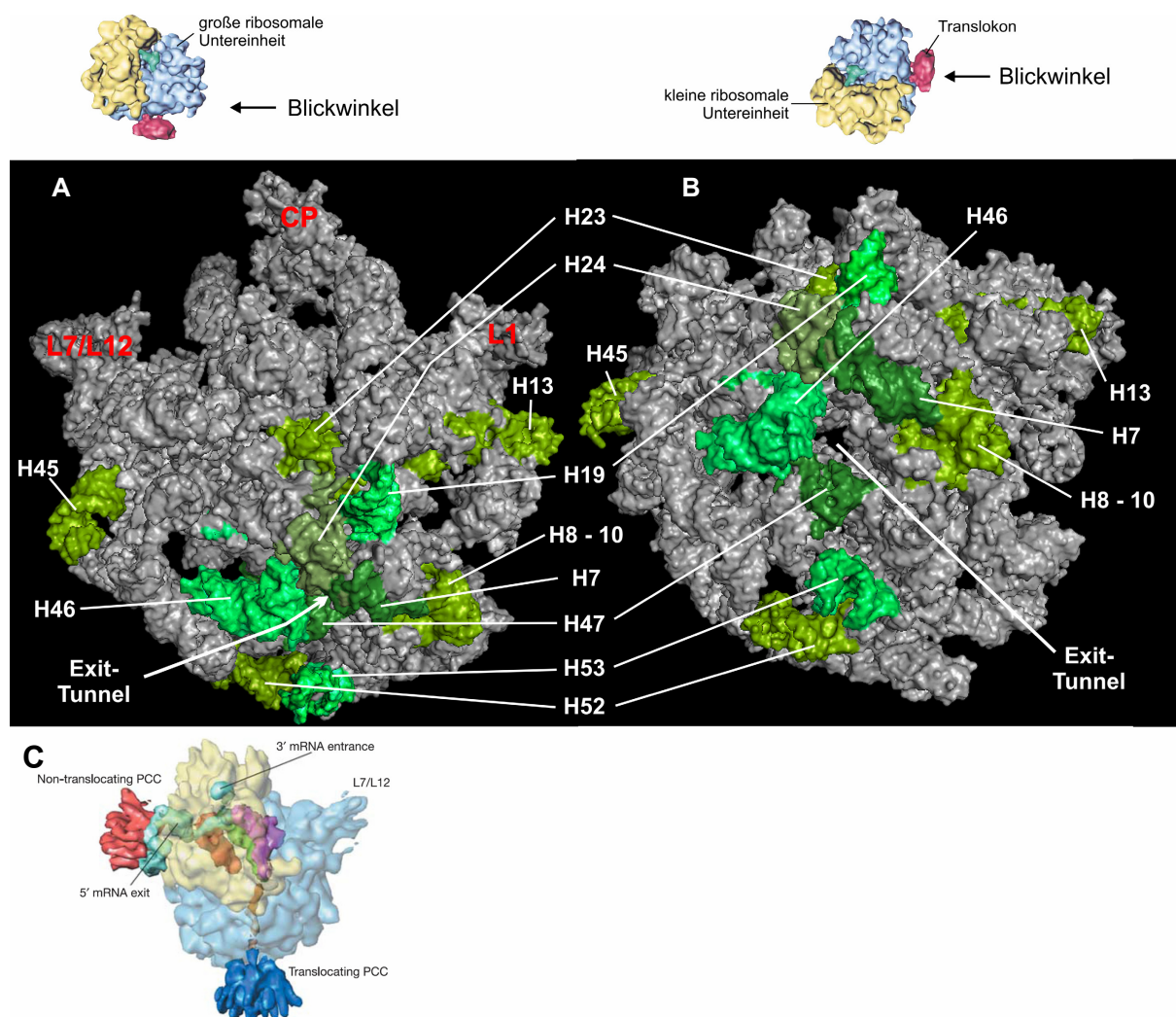
Der Fokus der *Footprint*-Analyse lag auf Regionen innerhalb der ersten drei Domänen der 23S rRNA, für welche eine Bindung mit dem Ribosom postuliert wurde (Prinz *et al.*, 2000; Beckmann *et al.*, 2001; Behrens, 2003). In diesen in der Nähe des *Exit*-Tunnels gelegenen Regionen traten sowohl mit isolierter rRNA als auch mit 70S Ribosomen verstärkt *Footprints* und Basenverstärkungen auf. Überraschenderweise gab es mit isolierter rRNA auch Effekte in weit entfernten Regionen, welche für eine Interaktion mit dem Kanal nicht in Frage kommen können. Unter der Annahme, dass die erhaltenen Ergebnisse mit isolierter rRNA auf einer direkten Interaktion mit dem proteinleitenden Kanal beruhen, handelte es sich somit vermutlich um Artefakte, hervorgerufen durch das Fehlen der ribosomalen Proteine. Die Tatsache, dass sich dieser Bereich auf der dem *Exit*-Tunnel entgegen gesetzten Seite befindet, verdeutlicht den artifiziellen Charakter isolierter rRNA. Dies bestätigte sich durch die Verwendung von 70S Ribosomen, die in diesen Bereichen keine Beeinflussung zeigten. Sehr deutlich konnte dies unter anderem für die Bereiche der Helices 39 - 44 (Nukleotid (nt) 946 - 1144), besonders in dem Bereich der Nukleotide 1030 - 1110, beobachtet werden (Position der Nukleotide bezogen auf die Nummerierung in *E. coli*; Nummerierung der Helices gemäß

Leffers *et al.*, 1987; siehe auch Abb. 3.6). Isolierte rRNA wies im Gegensatz zu 70S Ribosomen in diesen Bereichen verstärkt *Footprints* und Basenverstärkungen auf. Der Bereich entspricht der L7/L12-Ausstülpung des Ribosoms, welche das GTPase-Zentrum umfasst (nt ~1055 - 1080 der 23S rRNA) (Schnare *et al.*, 1996; Ban *et al.*, 1999) und in aktiven Ribosomen als Bindungsbereich für die Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu sowie für den Initiationsfaktor IF-2 und den Release Faktor RF-3 beschrieben wurden. Da isolierter rRNA die in diesem Bereich lokalisierten ribosomalen Proteine L6, L11, L14 und L7/L12 (Moore, 1998) vermutlich fehlen, konnten Effekte verstärkt hervorgerufen werden; bei 70S Ribosomen konnte im Bereich des GTPase-Zentrums lediglich ein *Footprint* (nt 1046) detektiert werden (Abb. 3. 10). Ähnliche artifizielle Effekte wurden durch Mitra *et al.* (2005) mittels Strukturen von Ribosom-SecYEG-Komplexen detektiert, bei denen ein zweites, inaktives SecYEG im oberen Bereich des Ribosoms auf der Seite der L1-Ausstülpung lag, also gegenüber dem hier detektierten Bereich (Abb. 4.1). Auch wenn die Frage der physiologischen Relevanz einer solchen SecYEG-Bindung offen bleibt, kann sie nicht für die hier detektierten Effekte verantwortlich gemacht werden. Ferner kann die starke Beeinflussung der Helix 12 (nt 224 - 231) nicht auf einem für die Ribosomen-Kanal-Interaktion relevanten Bereich beruhen, da die Helix zum einen nicht in der Nähe der Austrittsstelle der naszierenden Kette lokalisiert ist und zum anderen in einer konkaven Einstülpung der Oberfläche abgewandt liegt. Durch die Verwendung von 70S Ribosomen konnte auch dieser Bereich als nicht relevant identifiziert werden. Somit maskieren ribosomale Proteine die rRNA und stellen einen direkten sterischen Schutz dar, welcher die Zugänglichkeit für das DMS herabsetzt. Dies war zu erwarten, da die Proteine im Allgemeinen an der Oberfläche der Ribosomen angelagert sind (Ban *et al.*, 2000). Neben einem direkten Schutz könnten sie so zudem unspezifische Interaktionspunkte für das SecYEG abdecken, was folglich ebenfalls zu verminderten Effekten führt. Da es neben *Footprints* auch zu einer besseren Zugänglichkeit von Basen innerhalb dieser Regionen kam, scheint die Anwesenheit ribosomaler Proteine auch zu einer veränderten Flexibilität der rRNA zu führen. Somit wurden durch die Erhebung der *Footprint*-Daten mit isolierter rRNA die Modifizierungsmöglichkeiten anscheinend auf zwei Arten artifiziell erhöht bzw. verändert. Die Relevanz dieser Ergebnisse wird durch die mit 70S Ribosomen erhaltenen Daten sowie durch die Hypothese der Beteiligung von ribosomalen Proteinen an der Interaktion (Beckmann *et al.*, 2001) gestützt. Dass die isolierte rRNA sich in eine für die Bindung relevante Struktur zurückfaltet und keine artifizielle Struktur annimmt, bestätigte sich durch vergleichbare Dissoziationskonstanten von isolierter rRNA und 70S Ribosomen mit dem proteinleitenden Kanal ( $K_D \sim 10$  nM; Kalies *et al.*, 1994;

Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003). Das beschriebene hohe Rückfaltungspotential isolierter rRNA (Leffers *et al.*, 1988) kann auch für *in vitro* transkribierte 23S rRNA angenommen werden. Die vergleichbaren Ergebnisse von *in vitro* transkribierter und isolierter rRNA zeigten zudem, dass ein Einfluss von *in vivo* Modifizierungen der 23S rRNA auf die Bindung zwischen rRNA und den Proteoliposomen ebenso ausgeschlossen werden kann, wie ein entscheidender Einfluss von ribosomalen Proteinen, da beide Bestandteile bei *in vitro* transkribierter rRNA nicht vorkommen können. Dennoch könnten unabhängig davon, dass in Ab- und Anwesenheit der ribosomalen Proteine eine ähnliche und zur Bindung mit dem proteinleitenden Kanal befähigte dreidimensionale Struktur ausgebildet wird, Details in der Ausbildung der Struktur der rRNA, die für eine effiziente Bindung irrelevant sind, unterschiedlich sein.

Die Helices 7, 8-10 (nt 121 – 176), 23 (nt 445 - 473), 24, 46 (nt 1195 - 1250), 47 (nt 1276 - 1294) und 50 - 53 (nt 1310 - 1402) zeigten sowohl mit isolierter rRNA als auch mit 70S Ribosomen in den hier durchgeführten Analysen verstärkt *Footprints* und Basenverstärkungen. Die detektierten Helices stehen in guter Übereinstimmung mit den beschriebenen Modellen und Untersuchungen über Interaktionsbereiche von rRNA mit dem proteinleitenden Kanal: Die Helices 5 - 7, 46, 50, 52, 53 und 101 der 23S rRNA wurden aufgrund ihrer evolutionären Konservierung sowie ihrer unmittelbaren Nähe zum *Exit*-Tunnel auf der Oberfläche des Ribosoms nach Einpassen der 23S rRNA in Kristallstrukturen der 50S Untereinheit als mögliche Interaktionspartner beschrieben (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003). Des Weiteren wurde durch die *in silico* Modellierung der 23S rRNA-Struktur in kryoelektronenmikroskopisch erhaltene Ribosom-Sec61-Komplex-Strukturen, welche drei bis sieben stelzenartige Verbindungen zwischen der großen, ribosomalen Untereinheit und dem proteinleitenden Kanal offenbarten, den Helices 7, 24, 50, 53 und 59 eine Beteiligung an der Bindung zugeschrieben (Beckmann *et al.*, 2001; Ménétret *et al.*, 2005, 2007). Die Helix 19 wurde ebenfalls als Interaktionsbereich diskutiert (persönliche Mitteilung Prof. Dr. E. Hartmann). Obwohl gleiche Bereiche mit isolierter rRNA und 70S Ribosomen detektiert werden konnten, war das Modifizierungsmuster von 70S Ribosomen deutlich divergent zu dem von isolierter rRNA. Bis auf wenige Ausnahmen wurden nicht die gleichen Nukleotidpositionen beeinflusst. Zudem waren *Footprints* und/oder Basenverstärkungen der Helices 7, 24, 47, 50 und 51 bei 70S Ribosomen im Vergleich zu isolierter rRNA deutlich reduziert. Die Helices 46, 52 (nt 1350 - 1380) und 53 (nt 1385 -1402) hingegen wiesen verstärkt *Footprints* und/oder Basenverstärkungen auf. Bei der Verwendung nativer Ribosomen konnten außerdem innerhalb der Helices 13 (nt 255 - 262), 19 (nt 301 - 317) mit angrenzenden Bereichen und 45 (1164 - 1185) Basen-

veränderungen beobachtet werden (Abb. 3.10). Neben den von anderen Arbeitsgruppen durch Strukturanalysen ermittelten und aufgrund phylogenetischer Konservierung vorgeschlagenen rRNA-Bereiche für die Kanal-Ribosomen-Interaktion konnten somit zusätzlich die Helices 8 - 10, 13, 23, 45 und die Region der Helix 47 durch die hier durchgeführten *Footprint*-Analysen identifiziert werden. Während die Helices 8 - 10 und die Region der Helix 47 bei Betrachtung der Ribosomen-Struktur in unmittelbarer Nähe des *Exit*-Tunnels liegen und daher als weitere Interaktionsbereiche diskutiert werden können, ist die Helix 23 nicht direkt in der Nähe der Austrittsstelle der naszierenden Kette lokalisiert (Abb. 4.1). Die Helices 13 und 45 hingegen



**Abb. 4.1: Position von Helices mit verstärkt auftretenden *Footprints* und Basenverstärkungen in Relation zum *Exit*-Tunnel**

Dargestellt ist die große, ribosomale Untereinheit von *E. coli* (PDB-Zugriffsnummer: 1C2W) mit den drei charakteristischen ribosomalen Ausstülpungen *central protuberance* (CP), L1 und L7/L12. Der Blick auf die abgeflachte Halbkugel, an der die kleine Untereinheit normalerweise interagiert, mit nach oben gerichteter CP wird als „*Crown view*“ bezeichnet (Moore und Steitz, 2003). In (A) wurde die *Crown view* um 180° gedreht, mit Blick auf das rückwärtige Ribosom. In (B) wurde die Ansicht von (A) um 90° nach vorne gekippt, um den Blick auf den *Exit*-Tunnel zu erhalten. Zur Orientierung der Blickrichtung sind Kryo-EM-Strukturen von Ribosom-Kanal-Komplexen dargestellt (Beckmann *et al.*, 2001), die den ungefähren Blickwinkel für die jeweilige Darstellung zeigen. Helices (H), in denen mittels *Footprint*-Analyse verstärkt Effekten detektiert werden konnten, sind grün dargestellt (siehe Text). Zur besseren Orientierung wurden unterschiedliche Grüntöne verwendet (C) Kryo-EM-Struktur von Ribosom-Kanal-Komplexen von *E. coli* nach Mitra *et al.*, 2005.

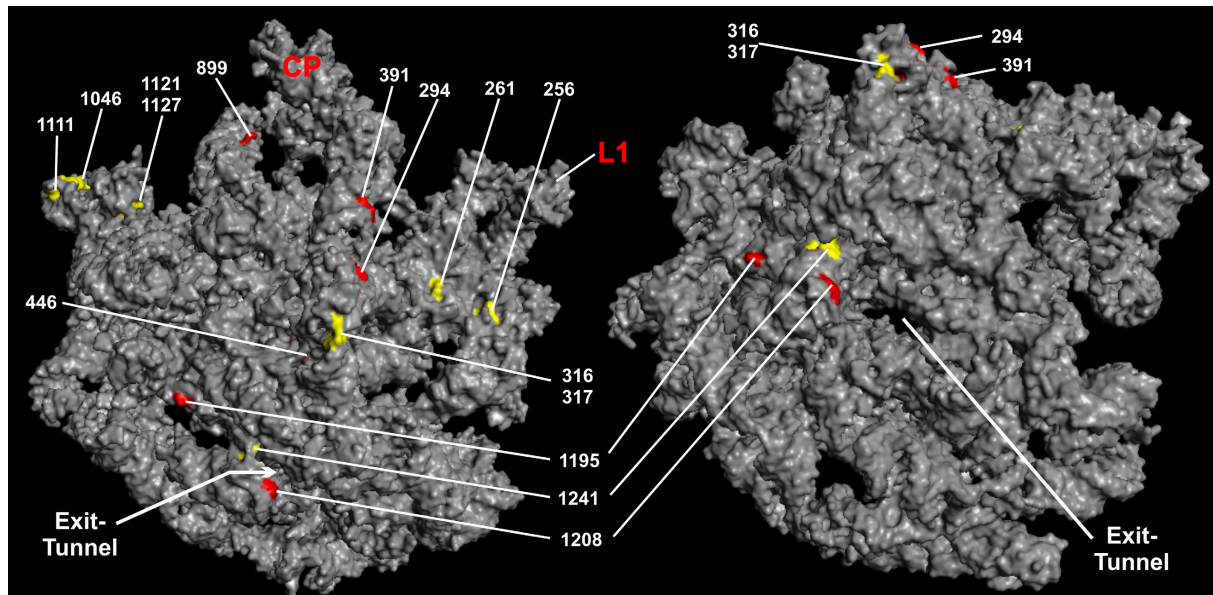
können aufgrund ihrer Lage für eine direkte Beeinflussung ausgeschlossen werden (Abb. 4.1). Über die Helix 59 konnte aufgrund stark ausgeprägter Sekundärstrukturen und dadurch bedingte Abbrüche der reversen Transkription hier keine Aussage getroffen werden.

Die beobachtete Variabilität detektierter *Footprints* und Basenverstärkungen bei der Verwendung von 70S Ribosomen könnte ebenfalls auf die Anwesenheit der ribosomalen Proteine zurückgeführt werden. In der Literatur ist die Verlagerung ribosomaler Proteine bedingt durch die Bindung von Interaktionspartnern während des cotranslationalen *Targetings* beschrieben (Pool *et al.*, 2002). Durch eine Beweglichkeit der Proteine könnten betroffene Bereiche nur einen phasenweisen Schutz gegenüber DMS erfahren. Dies würde bei der *Footprint*-Analyse zu deutlich ausgeprägten Hintergrundbanden führen. Konformationsänderungen der Proteine könnten folglich sekundär zu Strukturveränderungen der rRNA führen. Somit erfährt die rRNA in Anwesenheit der ribosomalen Proteine neben einer veränderten Flexibilität auch eine andere Stabilität. Die in Vorversuchen gezeigte Stabilität der Methode zeigt, dass kleine Änderungen, wie z.B. experimentelle Ungenauigkeiten von Versuch zu Versuch, die beobachteten unterschiedlichen Basenintensitäten nicht bewirken können.

Die mit 70S Ribosomen erhaltenen Daten implizieren, dass die ribosomalen Proteine während der Bindung der Ribosomen an die Membran während der cotranslationalen Proteintranslokation bzw. –insertion eine Rolle spielen könnten. Isolierte rRNA ist demzufolge für eine aussagekräftige *Footprint*-Analyse nicht einsetzbar und führt zu falsch positiven *Footprints*. Ob ribosomale Proteine direkt an der Bindung beteiligt sind und Protein-Protein-Interaktionen mit dem proteinleitenden Kanal eingehen, kann hier jedoch aufgrund der verwendeten Analysemethodik, die nur Interaktionen mit Nukleotidbeteiligung detektiert, nicht beantwortet werden. Die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Ribosom-Sec61-Komplexes beschreiben neben den rRNA-Helices auch vier ribosomale Proteine (L19, L23, L24 und L29), welche aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu den stützenartigen Verbindungen zwischen dem Translokon und den translozierenden Ribosomen Bestandteile der Interaktionsstellen sein könnten (siehe Abb. 1.2; Morgan *et al.*, 2002; Ménétret *et al.*, 2005). Für die konservierten ribosomalen Proteine L23 und L35 von *E. coli* (L23 und L29 bei Archaea, L25 und L35 bei Hefe) wurde zudem eine Beteiligung bei der Interaktion des SRP mit dem Ribosom während des funktionellen cotranslationalen Transport von Proteinen beschrieben (Pool *et al.*, 2002, Grallath *et al.*, 2006, Dalley *et al.*, 2008). Demnach liefert erst die Untersuchung mit nativen Ribosomen *Footprint*-Daten, die den *in vivo* Bedingungen entsprechen.

#### 4.1.2 Ribosomale Proteine haben einen entscheidenden Einfluss auf das Modifikationsmuster, nicht aber auf die Lipideffekte

Ein unerwarteter Befund während der *Footprint*-Analysen war, dass die meisten der auftretenden Effekte auch mit proteinfreien Lipidvesikeln zu beobachten waren. Das durch die proteinfreien Lipidvesikel hervorgerufene Modifizierungsmuster war mit dem der SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen nahezu deckungsgleich. Die Tatsache, dass das Modifikationsmuster durch proteinfreie Lipidvesikel nicht nur mit isolierter rRNA und *in vitro* transkribierter rRNA zu detektieren war, sondern auch mit 70S Ribosomen, zeigte, dass es nicht wie zunächst angenommen auf das Fehlen der ribosomalen Proteine und dadurch verstärkt auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen rRNA und geladenen Kopfgruppen der Lipide zurückgeführt werden kann. Lediglich neun Basenveränderungen konnten bei der Inkubation von 70S Ribosomen mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen beobachtet werden, welche bei proteinfreien Lipidvesikeln nicht oder nur minimal auftraten (Abb. 3.9 und 3.10). Nicht alle lagen in für die Bindung nach bisherigen Erkenntnissen relevanten Bereichen (Abb. 4.2). Sowohl die geschützten Nukleotide 256, 261, 1111, 1121, 1127, 1204 und 1241 als auch die Basenverstärkungen 1195 und 1208 sind auf der Oberfläche des Ribosoms lokalisiert (Abb. 4.2). Da bekannt ist, dass der proteinleitende Kanal in der Nähe des Exit-Tunnels lokalisiert ist, kommen für eine direkte Beeinflussung durch den proteinleitenden Kanal allerdings nur die Basen 1195, 1204, 1208 und 1241 in Frage, welche alle innerhalb der Helix 46 lokalisiert sind. Folglich führt die Bindung des proteinleitenden Kanals zu weit reichenden strukturellen Veränderungen des Ribosoms, so dass auch Bereiche die nicht in der Nähe des *Exit*-Tunnels liegen, eine veränderte Zugänglichkeit erfahren. Alle durch SecYEG-enthaltende Proteoliposomen und proteinfreie Lipidvesikel aufgetretenen Effekte wurden an gleicher Position und in vergleichbarer Ausprägung auch mit dem eukaryontischen Sec61-Komplex-enthaltenden Proteoliposomen detektiert. Dies gilt bis auf die Basenverstärkung an Position 1195 auch für die beobachteten stärker ausgeprägten Effekte durch Proteoliposomen gegenüber proteinfreien Lipidvesikeln an den zuvor genannten Positionen. Eine mögliche Maskierung der lipidbeeinflussten Positionen durch den größeren heterotrimeren Sec61-Komplex konnte somit nicht beobachtet werden. Die Situation im ER scheint unter den hier getesteten Bedingungen ähnlich wie in der Cytoplasmamembran. Es sei aber darauf hingewiesen, dass die Rekonstitution des Sec61-Komplex ebenfalls in *E. coli* Total Extrakt' erfolgte. Zu klären bleibt, ob die Rekonstitution in eine für den Sec61-Komplex nativere Lipidumgebung die gleichen Effekte hervorruft.



**Abb. 4.2: Effekte, die bei Proteoliposomen im Unterschied zu proteinfreien Lipidvesikeln ausgeprägter sind und Footprints und Basenverstärkungen der 28S rRNA, die an analogen Positionen der 23S rRNA liegen**  
 Dargestellt sind die rückwärtige Ansicht der *Crown view* (links) und der Blick auf den *Exit-Tunnel* der 50S Untereinheit von *E. coli* (rechts; PDB-Zugriffsnummer: 1C2W). Die Orientierung entspricht in etwa der in Abbildung 4.1 dargestellten. Hervorgehoben wurden *Footprints* (gelb) und Basenverstärkungen (rot), die sowohl mit SecYEG-Proteoliposomen als auch mit Sec61-Proteoliposomen (mit Ausnahme der Base 1195; siehe Text) deutlich ausgeprägter zu detektieren waren als mit proteinfreien Lipidvesikeln. Der *Footprint* 1204 liegt unterhalb des *Footprints* 1241 direkt an der Innenseite der Mündung des *Exit-Tunnels* und ist in der Darstellung nicht erkennbar. Weiterhin wurden *Footprints* und Basenverstärkungen, die durch die Verwendung von 80S Ribosomen identifiziert werden konnten und an analogen Nukleotidpositionen der 23S rRNA liegen, in der Struktur hervorgehoben. Die Basen 323 und 362 sind in der hier dargestellten Ansicht nicht sichtbar.

Neben den deutlichen Unterschieden an den erwähnten neun Positionen zeigte sich, dass *Footprints* sowie Basenverstärkungen von Nukleotiden durch proteinfreie Lipidvesikel im Vergleich zu SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen meist leicht schwächer ausgeprägt waren. Die eingesetzte Menge an Proteoliposomen und Lipidvesikeln war annähernd gleich, so dass die Effekte nicht auf unterschiedliche Mengen der Vesikel zurückgeführt werden können. Daher wird vermutet, dass Proteoliposomen aufgrund des vorhandenen Ribosomenrezeptors eine deutlich höhere Bindungsaffinität zum Ribosom aufweisen als Lipidvesikel. Die Interaktionen proteinfreier Lipidvesikel sind vermutlich kurzfristiger und neben gebundenen Ribosomen lagen auch ungebundene vor, so dass die Effekte schwächer ausfallen als mit Proteoliposomen. Dies bestätigte sich im Ribosomen-Bindungsassay: Während proteinhaltige Proteoliposomen zu ca. 100% mit Ribosomen assoziiert vorlagen, war die Bindungseffizienz von proteinfreien Lipidvesikeln um 50% reduziert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der erhaltenen Daten wäre es denkbar, dass nicht nur der proteinleitende Kanal mit dem Ribosom interagiert, sondern auch die Lipide einen Einfluss auf die Interaktion haben. Durch die Verwendung von 80S Ribosomen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Lipideffekten nicht um ein für das prokaryontische Ribosom spezifisches Ergebnis handelt, da die 28S rRNA ebenfalls durch Lipidvesikel beeinflusst wurde. Die

detektierten Basenveränderungen der 28S rRNA lagen zudem in strukturell vergleichbaren Bereichen der 23S rRNA. Die Basen 185/186, 216/217, 227 und 272 der eukaryontischen 28S rRNA entsprechen ungefähr den detektierten Basen 294, 316/317, 323 und 362 der 23S rRNA (Vergleich Abb. 3.15 mit Abb. 3.10). Alle diese Basen liegen im Bereich der Helix 19, welche erst durch die Verwendung nativer 70S Ribosomen identifiziert wurde. Die Basen 295/296 und 351 könnten den Basen 391 und 446 entsprechen. Die Basen 140 und 148 der 28S rRNA, die in einer Stammschleifenstruktur liegen, welche in dieser Ausprägung nicht in der 23S rRNA vorhanden ist, könnten dennoch den Basen 256 und 261 entsprechen. Auffällig sind auch die Basen 1569 sowie 1761 der 28S rRNA, die strukturell betrachtet exakt den Basen 899 und 1046 der 23S rRNA entsprechen. Während einige dieser Basen direkt durch die Bindung des Proteinkomplexes beeinflusst sein könnten, kann es sich bei anderen Basen, wie beispielsweise die Positionen 899 und 1046, nur um eine bereits erwähnte durch die Bindung des SecYEG-Komplexes hervorgerufene Strukturveränderung und dadurch bedingte veränderte Zugänglichkeit für das DMS handeln (Abb. 4.2). Da sich die detektierten Basenveränderungen der 28S rRNA im Strukturmodell an vergleichbaren Nukleotidpositionen befinden wie bei der 23S rRNA, kann eine evolutionäre Konservierung somit nicht nur für rRNA-Bereiche, sondern auch für einzelne Nukleotide vermutet werden. Die Annahme, dass *Footprints* und Basenverstärkungen innerhalb der 5.8S rRNA, welche homolog zu dem 5'-Ende der bakteriellen 23S rRNA ist (Nazar, 1980) und der Region der Helices 1 - 11 bei der 23S rRNA entspricht (Leffers *et al.*, 1987), eine ähnlich starke Beeinflussung zeigen, konnte nicht bestätigt werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass mit einer anderen Modifizierungschemikalie dort Veränderungen detektierbar wären.

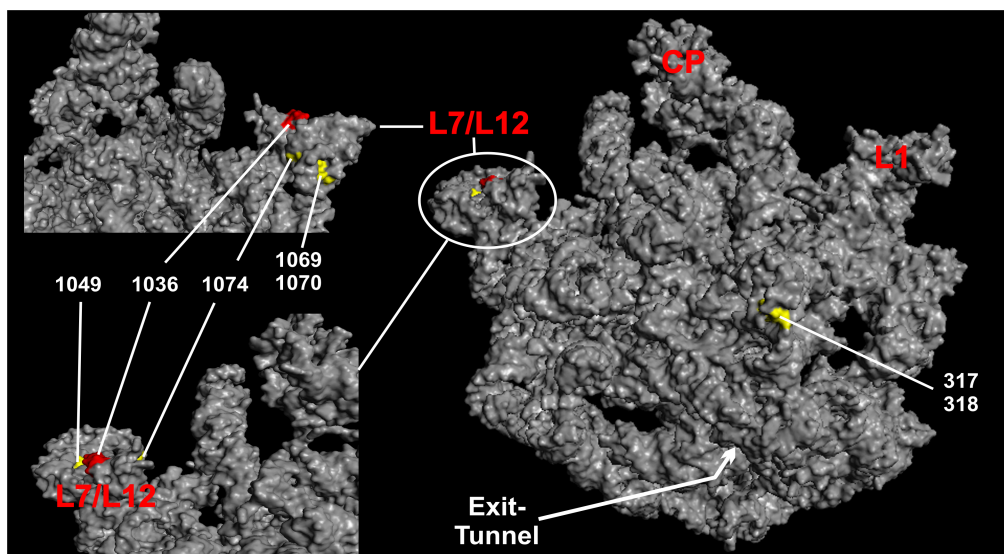
#### 4.1.3 Lipide haben einen Einfluss auf die Ribosom-Kanal-Interaktion

Zur weiterführenden Analyse des identifizierten Lipideffektes wurde der Einfluss von SecYEG in Lösung unabhängig vom Lipid untersucht. Dies sollte unter anderem Aufschluss darüber geben, ob bisher detektierte Effekte rein lipidvermittelter Natur waren.

Sowohl der SecYEG-Komplex als auch die für die Rekonstitution genutzten '*E. coli* Total Extrakt'-Lipide allein, jeweils in Lösung in Anwesenheit von Detergenz, zeigten die Fähigkeit, *Footprints* und Basenverstärkungen hervorzurufen. Diese Effekte wurden nicht durch das Detergenz verursacht. Die Intensitäten der detektierten Basenveränderungen waren aber gegenüber den Effekten durch Proteoliposomen und Lipidvesikel stark abgeschwächt. Lagen SecYEG-Komplexe und Lipid gemeinsam in Lösung vor, wurde der Effekt meist stärker, er blieb aber weiterhin deutlich unter der Ausprägung durch Proteoliposomen und

Lipidvesikel. Die Vermutung, dass SecYEG im Wesentlichen allein zu *Footprints* und Basenverstärkungen führt, konnte nicht bestätigt werden. Die meisten Effekte wurden auch vom Lipid allein hervorgerufen, wobei anzumerken ist, dass durch das Lipid keine unterschiedlichen Basen modifiziert wurden und keine Position ausschließlich durch Lipid beeinflusst wurde. Da Proteoliposomen sowie Proteinkomplexe in Lösung durch Strukturdaten belegt unter den hier angewendeten Bindungsbedingungen an den *Exit*-Tunnel der Ribosomen binden (Breyton *et al.*, 2002; van den Berg *et al.*, 2004), handelt es sich nicht um artifizielle Effekte, gestützt durch die Tatsache, dass die Intensität der meisten detektierten Basenveränderungen zudem in Gegenwart von SecYEG verstärkt wurde. Effekte, die durch das SecYEG nicht verstärkt wurden, könnten ebenfalls relevant sein, sie können hier aber nicht weiter beurteilt werden.

Einige Basenveränderungen werden augenscheinlich nicht durch das Lipid verursacht (3.1.4.2). Die Analyse der durch SecYEG in Detergenz-Lösung hervorgerufenen Veränderungen in Kombination mit den Strukturdaten lässt es allerdings unwahrscheinlich erscheinen, dass sie auf einer direkten Beeinflussung durch den SecYEG-Komplex beruhen, da sie nicht im Bereich des *Exit*-Tunnels liegen (Abb. 4.3). Somit kommt es zwar auch ohne Lipid zu einer Interaktion zwischen SecYEG und dem Ribosom, wie durch Ribosomen-Bindungsassays bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), die Auswirkung ist aber eine andere. Die drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente wiesen starke Schwankungen in den beobachteten Effekten auf. Als signifikant im Sinne der hier



**Abb. 4.3: Lage von *Footprints* und Basenverstärkungen durch SecYEG-Komplexe in Detergenz-Lösung in Relation zum *Exit*-Tunnel**

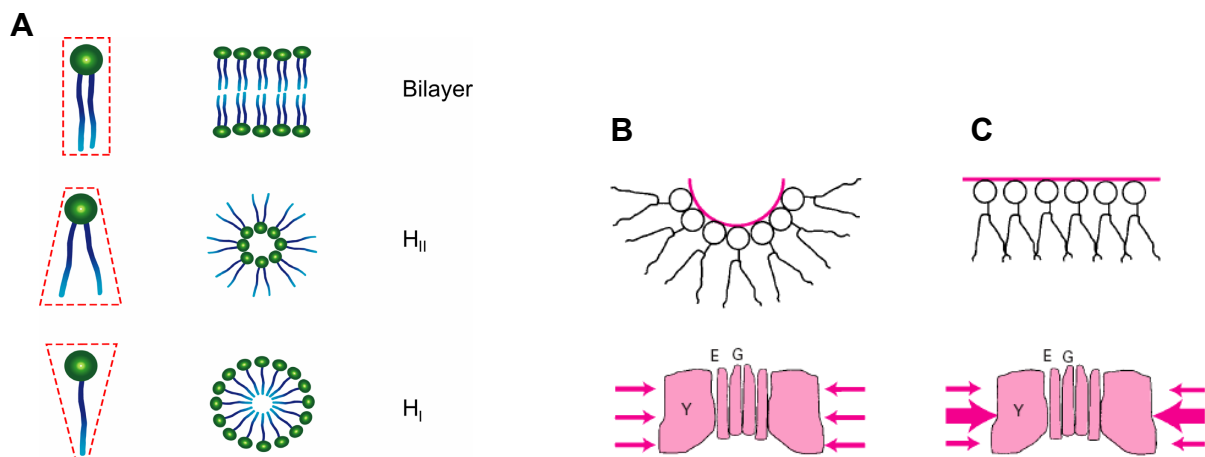
Dargestellt ist die *Crown view* der großen ribosomalen Untereinheit von *E. coli* (PDB-Zugriffsnummer: 1C2W). Die Orientierung entspricht in etwa der in Abbildung 4.1 dargestellten. Der Bereich der L7/L12-Ausstülpung mit den verstärkt auftretenden Effekten durch SecYEG-Komplexe in Detergenz-Lösung wurde vergrößert dargestellt.

verwendeten Definition, d.h. mit einer Inzidenz von mindestens 50%, konnten zudem nur Effekte identifiziert werden, die durch Proteoliposomen und proteinfreie Lipidvesikel hervorgerufen wurden. Bis auf wenige Ausnahmen waren in den drei analog durchgeführten Versuchen in den Ansätzen mit Bindungspartnern in Detergenz-Lösung keine Basenveränderungen signifikant (siehe Tabelle 2, Anhang). Die starken Schwankungen könnten auf das in den Ansätzen enthaltene Detergenz zurückzuführen sein, welches zu einer Konformationsänderung der ribosomalen Proteine führen könnte.

Lipide, die voraussichtlich aufgrund ihrer der nativen Membran ähnlichen Zusammensetzung als Bilayer organisiert waren, verstärkten gegenüber Interaktionspartners in Detergenz-Lösung die Effekte entscheidend (Abb. 3.11, Bahn 5). Die nochmals verstärkten *Footprints* und Basenverstärkungen in Anwesenheit von Proteinkomplexen verdeutlichen seine bereits erwähnte Relevanz als Ribosomenrezeptor. Seine Anwesenheit bringt die Lipide vermutlich in die Nähe des Ribosoms, wodurch sekundär die Interaktionsmöglichkeiten für die Lipide erhöht werden. Daten über den Einfluss von Lipiden für die Interaktion von Ribosomen mit dem in die Membran eingebetteten proteinleitenden Kanal oder über die Auswirkungen veränderter Lipidzusammensetzungen für eine veränderte Ribosomenassoziation liegen jedoch bisher nicht vor. Die bisher beschriebenen Einflüsse von Lipiden auf die Funktion von Membranproteinen beruhen auf einer Missfaltung der Proteine aufgrund artifizierlicher Druck- und Ladungsverhältnisse innerhalb der Membran. So zeigte sich für die Funktionalität rekonstituierter SecYEG-Komplexe eine Abhängigkeit von anionischen Lipiden sowie eine verbesserte Translokationsrate in Anwesenheit von nicht-Bilayer-Lipiden (de Kruijff, 1997; van der Does *et al.*, 2000). Ebenso konnte für eine Reihe weiterer Membranproteine eine Abhängigkeit von Lipiden für ihre korrekte Faltung, Aktivität und Funktion beobachtet werden (Brown *et al.*, 1994; Bogdanov *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 1999). In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Proteintransport sowohl von posttranslational als auch von cotranslational transportierten Proteinen mit in Detergenz-Lösung befindlichen Proteinkomplexen erfolgen kann (Matlack *et al.*, 1997, Mothes *et al.*, 1998). Die Insertion des cotranslational transportierten Proteins Präprolactin wurde zwar in Anwesenheit von Lipiden beschleunigt, essentiell waren sie jedoch nicht (Mothes *et al.*, 1998). Ob und in welchem Ausmaß die Bindung der Ribosomen durch die Anwesenheit der Lipide beeinflusst wird, wurde allerdings nicht bestimmt.

#### 4.1.4 Die Lipidzusammensetzung wirkt sich auf das Modifizierungsmuster aus

Lipide besitzen aufgrund ihrer Struktur die Fähigkeit, Bilayer-Strukturen oder nicht-Bilayer-Strukturen auszubilden (siehe Abbildung 4.4 A; van den Brink-van der Laan *et al.*, 2004). Lipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Cardiolipin (CL) besitzen in Relation zu den Fettsäureketten kleine Kopfgruppen, weswegen sie kegelförmige Strukturen ausbilden, die zur Ausbildung negativer (= konkaver) Grenzflächen tendieren ( $H_{II}$  Formation; siehe Abb. 4.4 B). Positiv kegelförmige Strukturen ( $H_I$  Formation) sind für Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) beschrieben. Beiden Formationen gemein ist die Ausbildung von nicht-Bilayer-Strukturen. Phosphatidylcholin (PC) hingegen lagert sich zu organisierten planaren Lipiddoppelschichten zusammen. Werden Lipide einer  $H_{II}$  Formation in eine Bilayer-Struktur gezwungen, resultiert dies in einem „frustrierten Bilayer“ mit einem hohen inneren Druck, bei dem die Acyl-Ketten zusammengepresst werden und die Kopfgruppen weiter auseinander liegen (siehe Abb. 4.4 C; van Voorst und de Kruijff, 2000). Dies erhöht den Druck innerhalb der Membran („*Krümmungsstress*“), was sich direkt auf enthaltene Membranproteine auswirkt.



**Abb. 4.4: Lipidform und Organisation**

(A) Lipide können sich aufgrund ihrer Struktur wie Röhren, Kegel oder invertierte Kegel verhalten, abhängig von der relativen Größe ihrer Kopfgruppe zum Fettsäurerest. Daraus ergibt sich die spezifische molekulare Organisation zu Bilayern oder nicht-Bilayer-Strukturen ( $H_I$  und  $H_{II}$ ).

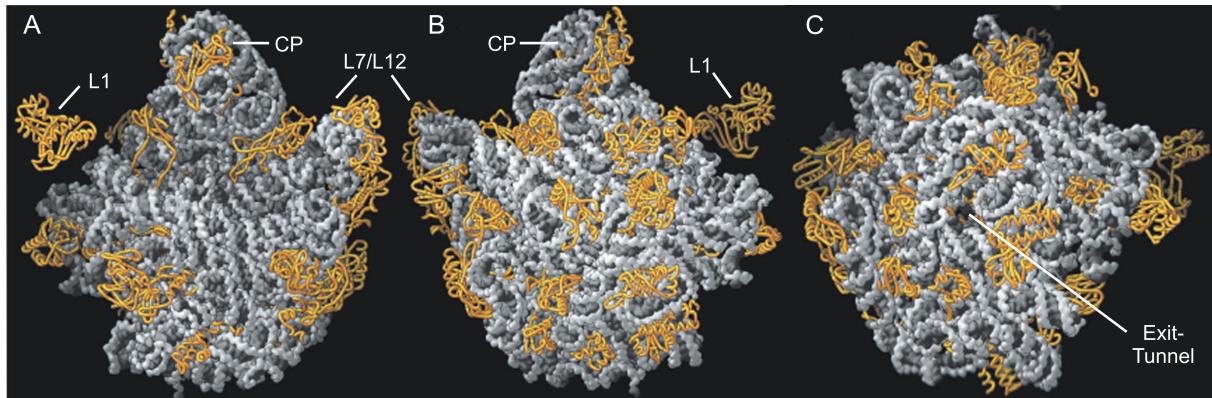
(B) Nicht-Bilayer Lipide lagern sich vorzugsweise in eine gekrümmte Monolayer-Struktur, die eine gleichmäßige Druckverteilung bewirkt. (C) Die Einengung in eine flache Schicht führt zu einer Kompression der Acyl-Ketten, die dadurch einen stärkeren Druck innerhalb der Membran ausüben (dicke Pfeile). Der Abstand der Kopfgruppen hingegen vergrößert sich. ((B) und (C) aus van Voorst und de Kruijff, 2000).

Mit der Überlegung, dass jedes Membranprotein vermutlich seinen nativen Druck- und Ladungsverhältnissen angepasst zu sein scheint (van Voorst und de Kruijff, 2000), könnten die gemachten Beobachtungen mit in PC/PE-Vesikel rekonstituierten SecYEG-Komplexen auf eine veränderte Konformation des Komplexes gegenüber dem in 'E. coli Total Extrakt' rekonstituierten Komplex zurückgeführt werden (3.1.4.4). Nur vier sehr schwach ausgeprägte Veränderungen im Bereich 1270 - 1330 konnten detektiert werden. Während die Cytoplasma-

membran von *E. coli* mit 75% PE und 5% CL zu 80% aus nicht-Bilayer-Lipiden besteht (Cullis und de Kruijff, 1979), enthielten die verwendeten PC/PE-Vesikel mit 80% PC deutlich weniger nicht-Bilayer-Lipide. Inwieweit sich die Lipidzusammensetzung wirklich auf die Konformation auswirkt und ob die Überlegung auch für Proteinkomplexe in Lösung angenommen werden kann, in denen ebenfalls keine nativen Druckverhältnisse ausgeübt werden, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Die veröffentlichten Strukturdaten von Breyton *et al.* (2002) und van den Berg *et al.* (2004) zeigen, dass es für die Struktur des Proteinkomplexes keine entscheidende Rolle spielt, ob er in Detergenz-Lösung oder in eine Lipiddoppelschicht eingebettet vorliegt. Die Überlagerung der 2D-Struktur des SecYEG-Komplexes in Proteoliposomen mit der 3D-Struktur des SecYE $\beta$ -Komplexes in Lösung führt zwar zu einer annähernd gleichen Ausrichtungen der Transmembrandomänen (TMD) der Proteinkomplexe, denkbar wäre aber, dass bindungsrelevante Domänen geringe strukturelle Unterschiede aufweisen, die mit Hilfe der *Footprint*-Methode detektierbar sind. Somit könnte jedes Membranprotein dem lateralen Druck seiner nativen Umgebung angepasst sein.

Bei der weiterführenden Charakterisierung des Lipideinflusses durch unterschiedliche Lipide zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Gehalt an anionischen Lipiden und der Ausprägung des Modifizierungsmusters. Je höher der Gehalt an negativer Ladung desto deutlicher wurden die Effekte. Dies stand in direktem Zusammenhang mit den stark ausgeprägten Effekten des hier verwendeten '*E. coli* Total Extrakt' im Vergleich zu den anderen hier analysierten Lipidvesikeln. Neben der bereits beschriebenen unterschiedlichen Tendenz zur Ausbildung unterschiedlicher Membranstrukturen spielt die Ladung der Kopfgruppe der Lipide demnach eine entscheidende Rolle. Aufgrund des mit Glycerol veresterten Phosphorsäurerestes tragen Phospholipide bei neutralem pH-Wert mindestens eine negative Ladung. Die Kopfgruppen, die über die Phosphatgruppe gebunden werden, können weitere Ladungen tragen. So weisen PC und PE eine Nettoladung von null auf, da die Kopfgruppen jeweils einfach positiv geladen sind. PS trägt innerhalb der Kopfgruppe neben einer positiven auch eine negative Ladung, so dass es, ebenso wie PI und PG, welche keine zusätzliche Ladung enthalten, insgesamt einfach negativ geladen ist. Da CL aus zwei PG-Molekülen kondensiert, ist es zweifach negativ geladen. Demzufolge ist die Ladung bei '*E. coli* Total Extrakt'-Vesikeln, welche die Lipide PE, PG und CL enthalten, durch die Kopfgruppenladung stärker negativ als bei den verwendeten PC/PE/PS bzw. PC/PE/PS/PI-Vesikeln, welche durch ihre Kopfgruppenladungen unterschiedlich stark negativ geladen sind. Anionische Kopfgruppen, wie sie bei PS, PI, PG und PA vorkommen, können leicht Interaktionen mit positiv geladenen Resten eingehen (Leenhouts *et al.*, 1995). Somit scheint die

Beschaffenheit der Kopfgruppe von Lipiden ein wichtiges Charakteristikum für direkte Wechselwirkung mit der rRNA zu sein. Wie in Abbildung 4.5 zu erkennen, wird die Oberfläche der Ribosomen nicht vollständig von ribosomalen Proteinen bedeckt, so dass es zu Interaktionen zwischen Lipid und rRNA kommen könnte.



**Abb. 4.5: Proteine auf der Oberfläche der großen ribosomalen Untereinheit von *Haloarcula marismortui***  
Die rRNA ist in grau dargestellt, die Protein-Rückgrate in gelb. (A) *Crown view* der großen Untereinheit. (B) *Crown view* um 180° gedreht. (C) Blick auf den *Exit-Tunnel* durch das Kippen der Ansicht (B) (Ban *et al.*, 2000, modifiziert).

Anionische Lipide, die charakteristische Bestandteile der *E.coli* Cytoplasmamembran (~25%) sowie der ER-Membran (15 - 25%) sind (Raetz, 1978; Jothy, 1973, 1975), wurden sowohl für die *in vitro*- und *in vivo*-Proteinsekretion als auch für die Integration von Membranproteinen in Bakterien, welche cotranslational an und in die Membran gelangen, als relevant beschrieben (Lill *et al.*, 1990; Kusters *et al.*, 1991; van Dalen und de Kruijff, 2004). Für eine Beteiligung der Lipide der Ribosomenbindung an die Membran wäre die negative Ladung der Kopfgruppe ein gut vorstellbares Merkmal. Da *E. coli* Ribosomen an Säuger-membranen gebunden werden können und umgekehrt (Prinz *et al.*, 2000), kann der Effekt nicht von spezifischen bakteriellen Lipiden abhängen, sondern muss allgemein gültig sein. Die negative Ladung ist allen Membranen gemein, wenn auch in den verschiedenen Organismen durch unterschiedliche Lipide vermittelt. Da in nativen Membranen der Gehalt an anionischen Lipiden signifikant ist, könnten sie als intermediärer Interaktionspartner dienen, um das Ribosom an die Membran zu rekrutieren. Cytoplasmatische Domänen des SecYEG-Komplexes, die anionisch geladen sind, konkurrieren eventuell mit den negativ geladenen Lipiden um die Bindung an das Ribosom. Bei verstärkt negativer Ladung der Lipidvesikel könnte sich das Gleichgewicht zugunsten des Lipides verlagern, wie es beispielsweise häufig durch die am deutlichsten ausgeprägten Effekte für reine PS-Vesikel beobachtet werden konnte (Abb. 3.12, Bahn 7). Eine niedrigaffine Interaktion von anionischen Lipiden und Ribosomen während der cotranslationalen Interaktion mit der

Membran könnte dem Ribosom auch dann eine Interaktion mit der Membran erlauben, wenn kein aktives Translokons zur Verfügung steht. Inwiefern diese Interaktion wichtig für den Transport von Proteinen ist, kann hier nicht beantwortet werden. Herskovits *et al.* (2002) postulierten, dass es im SRP-abhängigen Weg eine primäre Ribosomenbindungsstelle an der Membran gibt, die weder SRP noch den Komplex erfordert. Vermittelt wurde die Bindung durch das FtsY, der Bindungspartner innerhalb der Membran ist jedoch unbekannt. Somit könnten die Lipide auch für eine partielle, parallele Bindung des Ribosoms verantwortlich sein.

Da die hier durchgeführte Analyse mit gereinigten SecYEG-Komplexen und Ribosomen aus *E. coli* durchgeführt wurden, wurde für die Rekonstitution des Proteinkomplexes und die anschließenden *Footprint*-Analysen ein Total-Extrakt von *E. coli* verwendet, um die Rekonstitution so gut wie möglich den *in vivo* Bedingungen mit entsprechend nativen Druck- und Ladungsverhältnissen, anzupassen. Die Verwendung von PC und PE, die häufig in früheren Arbeiten für die Rekonstitution genutzt wurden (z.B. Panzner *et al.*, 1995; Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003), schien unangebracht, zumal PC in der Cytoplasmamembran von *E. coli* nicht enthalten ist. Dies könnte erklären, warum bisher kein Hinweis auf Interaktionen zwischen Lipiden und Ribosomen zu beobachten war (Prinz *et al.*, 2000; Behrens, 2003).

Während bei Bakterien durch den Einsatz lipiddefizienter Stämme mittels Gendelektionen der Lipideinfluss auf die Translokation untersucht werden konnte und die Notwendigkeit für anionische und nicht-Bilayer-Lipide offenbarte, liegen für das eukaryontische System nur wenige Daten in Bezug auf die Funktion von Lipiden vor. Das Entfernen saurer Phospholipide wirkte sich für die Proteintranslokation im rekonstituierten Säugersystem nicht nachteilig aus (Görlich und Rapoport, 1993). Ferner zeigte die Ionenleitfähigkeit des proteinleitenden Kanals keine Veränderungen durch die Verwendung der Lipide PC, PE und PS, welche in unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt wurden (Simon und Blobel, 1991).

Ob es sich bei den beobachteten *Footprints* und Basenverstärkungen tatsächlich um einen direkten Schutz der Nukleotide durch das SecYEG oder Lipid handelt oder einen indirekten durch Konformationsänderungen der rRNA infolge der SecYEG- oder Lipid-Bindung hervorgerufen, kann hier, wie bereits erwähnt, nicht beantwortet werden. Durch die Übereinstimmung der in dieser Arbeit identifizierten Basen mit den durch andere Gruppen für die Interaktion vorgeschlagenen Bereichen ist allerdings die direkte Beeinflussung durch das SecYEG nicht unmöglich. Die Tatsache, dass mit Hilfe der hochauflösenden kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen lediglich drei bis vier stützenartige Verbindungen zu sehen waren (Beckmann *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2002; Ménétret *et al.*, 2005, 2007), lässt vermuten, dass nur wenige Nukleotide bzw. Bereiche der rRNA an der Interaktion beteiligt sind.

#### 4.1.5 Kritische Betrachtung der Methode und Ausblick

Die RNA-*Footprint*-Methode wurde bisher unter anderem erfolgreich für die Lage bzw. Interaktionsstellen ribosomaler Proteine, der tRNA oder Elongationsfaktoren sowie Kontaktstellen zwischen großer und kleiner ribosomaler Untereinheit, eingesetzt (Moazed *et al.*, 1988; Moazed und Noller, 1989; Uchiumi und Kominami, 1994, 1997; Egebjerg *et al.*, 1991). Grundannahme für die durchgeführten Untersuchungen war nicht nur eine effiziente SecYEG-rRNA-Bindung sowie eine ausreichende Stabilität des SecYEG-rRNA-Komplexes, sondern auch die Analysierbarkeit dieser Bindung durch die *Footprint*-Analyse. Komplexe, die diese Voraussetzungen erfüllen, wurden bisher nur mit reinen Proteinen und rRNA hergestellt. Eine Besonderheit des hier angewendeten Systems ist, dass das Protein in Detergenz oder Lipid vorliegen muss. Unerwarteterweise stellte sich heraus, dass die Masse an *Footprints* und Basenverstärkungen nicht durch das SecYEG sondern durch das begleitende Lipid hervorgerufen wurde. Offensichtlich sind solche Lipid-rRNA-Wechselwirkungen weniger stabil und entsprechen damit nicht den erforderten starren Versuchsbedingungen. Auch wenn sich die Methode unter diesen Voraussetzungen nicht für die feine Determinierung von Bindungsstellen eignete, konnte sie dennoch genutzt werden, um qualitative Aussagen zu treffen und Tendenzen aufzuzeigen. So war es durch die Anwendung der *Footprint*-Analyse möglich, einen direkten Einfluss von Lipiden während der Ribosom-Kanal-Interaktion zu identifizieren, der durch die Verwendung anderer bisher angewendeter Methoden nicht detektiert werden konnte. Lediglich ein Kontakt zwischen der Signalsequenz bzw. Signalankersequenz naszierender Ketten und den Lipiden der Membran konnte bisher durch Quervernetzungs-Experimente nachgewiesen werden (Martoglio *et al.*, 1995; Mothes *et al.*, 1998). Mehrere Bereiche der ribosomalen rRNA, welche in der Nähe des *Exit*-Tunnels liegen und statistisch belegt sowohl durch Proteoliposomen als auch durch Lipidvesikel beeinflusst werden, werden zudem als mögliche Bindungsstellen für den SecYEG-Komplex unter anderem aufgrund Kryo-EM-Strukturdaten vorhergesagt.

Einer weiteren Analyse der Interaktion von proteinleitenden Kanälen mit Ribosomen mittels der *Footprint*-Methode sollten folgende Überlegungen zugrunde liegen: Unter der Annahme, dass Lipide einen Einfluss auf die Bindung haben, muss die Verwendung rekonstituierter Proteine kritisch betrachtet werden. Die dem Ribosom präsentierte Oberfläche der Vesikel weist einen hohen Gehalt an Lipid auf. In nativen Membranen ist der Lipiddoppelschicht eine große Anzahl an Proteinen eingelagert sowie aufgelagert, so dass der Bereich zugänglicher Lipide gegenüber künstlichen Proteoliposomen deutlich verringert ist. Da eine Interaktion zwischen den Kopfgruppen der Lipide und Proteinen aufgrund der

Ladung und dem pH-Wert innerhalb der Zelle chemisch möglich ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der hier beobachteten Lipideinflüsse auf einen vergleichsweise hohen Gehalt zugänglichen Lipids zurückzuführen ist und es somit, ähnlich wie bei der Verwendung isolierter rRNA, zu artifiziellen Ergebnissen kommt. Um solche Lipideffekte aufgrund eines unnatürlich hohen Gehaltes an Lipid ausschließen zu können, könnten *Footprint*-Analysen mit hochsalzbehandelten Membranen (K-RM) durchgeführt werden. Durch die Hochsalzbehandlung werden nichttranslatierende Ribosomen von der Membran abgewaschen und nur translatierende Ribosomen, die ab einer bestimmten Länge der naszierenden Kette hochsalzresistent werden, würden so beprobt werden. Somit könnte parallel ein Einfluss der mRNA, tRNA sowie der naszierende Kette berücksichtigt werden und die Untersuchung weiter den *in vivo* Bindungsverhältnissen angepasst werden.

## 4.2 Untersuchungen des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 während der cotranslationalen Translokation

Während die Funktion des RAMP Sec61 für die Translokation von Proteinen gut verstanden ist, ist die Rolle von RAMP4 während des Translokationsprozesses weitgehend unklar. Daher wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit die Translokationskompetenz mit Membranen von RAMP4-defizienten Mäusen untersucht.

### 4.2.1 RAMP4-Knock-out-Mäuse weisen eine verminderte Translation auf, aber keine beeinträchtigte Translokation

Um die Funktion von RAMP4 bei der Translokation von Proteinen über die Membran zu identifizieren, wurde in der Anwesenheit von hochsalzbehandelten Membranen (K-RM) aus RAMP4-Knock-out-Mäusen (mK-RM -/-) die *in vitro* Translation/Translokation untersucht.

Die Untersuchung der Translokationseffizienz des Polypeptidhormones GH (*growth hormone*, Wachstumshormon) folgte aus der Beobachtung heraus, dass RAMP4 Knock-out-Mäuse (RAMP4 -/-) drei Wochen nach der Geburt eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen und sich postnatale Wachstumsstörungen manifestierten. Direkt nach der Geburt waren die Mäuse bis auf ein leicht reduziertes Körpergewicht zunächst phänotypisch unauffällig, was darauf hindeutete, dass RAMP4 für die pränatale Phase nicht essentiell ist. Mäuse, die die ersten vier Wochen überlebten, erreichten nach etwa 12 Wochen 75% des Endgewichtes der Wildtyp-Mäuse. Die Wachstumshemmung sowie die Beobachtung, dass als Antwort auf die Stimulation mit Insulin der GH-Gehalt im Blut der RAMP4 +/+ Mäuse schneller anstieg und ein höheres Maximum erreichte als bei RAMP4 -/- Mäusen, führte zu der Annahme, dass RAMP4 eine Rolle bei der Biosynthese und/oder Sekretion von Hormonen spielt, welche eine Rolle bei der neonatalen Entwicklung haben, wie z.B. das Wachstumshormon (Hori *et al.*, 2006). Ein essentieller Bestandteil des Translokationsapparates ist RAMP4 jedoch nicht, wie *in vitro* Transportversuche mit rekonstituierten Sec61-Komplexen zeigten (Görlich und Rapoport, 1993). Allerdings konnte in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, dass YSY6, das Hefehomolog von RAMP4, die Proteinexportdefekte von *secY* Mutationen unterdrückt (Sakaguchi *et al.*, 1991), was auf eine Beteiligung am Proteintransport hindeutet.

Die Analyse der Translokationseffizienz des Wachstumshormons zeigte bei RAMP4 -/- mK-RM und RAMP4 +/+ mK-RM vergleichbare Translokationsraten. Ein Zusammenhang zwischen der Menge an transloziertem Protein und der An- bzw. Abwesenheit von RAMP4 konnte nicht beobachtet werden. Allerdings war der Gehalt sowohl an Präprotein, als auch von reifem Protein in der Anwesenheit von RAMP4 -/- mK-RM im Vergleich zu

RAMP4  $+/+$  mK-RM stark reduziert. Eine verminderte Translation ohne Beeinflussung der Translokation konnte auch für Insulin und Prolaktin (Daten nicht gezeigt) sowie das cytosolische Protein Luziferase beobachtet werden. Somit zeigte sich, dass die Proteinbiosynthese in RAMP4  $-/-$  Mäusen generell beeinträchtigt ist und der Effekt nicht spezifisch für sekretorische Proteine ist.

Aus den Daten kann jedoch ein direkter Einfluss von RAMP4 auf die Proteinbiosynthese nicht abgeleitet werden. Das Wachstumshormon wird in den somatotrophen Zellen des vorderen Hypophysenlappens gebildet und in das Blut sekretiert. Eine gestörte Entwicklung dieser Zellen sowie eine Zerstörung des Hypophysenvorderlappens führen zu einem Mangel an Wachstumshormon. Einhergehend mit dieser Tatsache wiesen RAMP4  $-/-$  Mäuse einen verkleinerten Hypophysenvorderlappen gegenüber dem von Wildtyp-Tieren auf. Ebenso waren andere endokrine Organe oder Zielorgane wie die Nebenniere, Schilddrüse, Skelettmuskulatur und Knochen in RAMP4  $-/-$  Mäusen verhältnismäßig verkleinert. Diese Effekte könnten jedoch auch unspezifischer Natur sein und ein genereller Effekt der Wachstums- hemmung sein. Des Weiteren wurden im Hypophysenvorderlappen von RAMP4  $-/-$  Mäusen die stressassoziierten Proteine GRP94, GRP78 oder Herp identifiziert, deren Gehalt im Vergleich zu dem von Wildtyp-Mäusen um das 1.5 - 2-fache erhöht waren. Ferner erfolgte in RAMP4  $-/-$  Mäusen verstärkt die Phosphorylierung des Translationsfaktors  $eIF2\alpha$ . Er unterdrückt die Proteinbiosynthese als Antwort auf ER-Stress. Der Gehalt von Sec61 $\alpha$  und Sec61 $\beta$  hingegen war im Wildtyp- und im *Knock-out*-Stamm vergleichbar (Hori *et al.*, 2006).

Somit deuten die mit Membranen von RAMP4  $-/-$  Mäusen erhaltenen Ergebnisse auf einen erhöhten ER-Stress und eine verlängerte Translationsunterdrückung hin, wodurch die schnelle Produktion von Hormonen unterdrückt wurde. Bestandteil weiterer *in vitro* Untersuchungen sollte der Einfluss von RAMP4 auf spezifische Effekte von ER-Stress sein.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Während der post- und cotranslationalen Proteintranslokation binden Ribosomen an den proteinleitenden Kanal in der Membran. Bei Bakterien ist dies der SecYEG-Komplex der Cytoplasmamembran, bei Eukaryonten der Sec61-Komplex in der ER-Membran. Als Interaktionspartner für die Bindung an den Komplex konnte in vorausgehenden Studien die ribosomale RNA identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels der *Footprint*-Methode die rRNA während der Interaktion näher zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass durch die Bindung mit dem proteinleitenden Kanal rRNA-Bereiche in ihrer Zugänglichkeit verändert wurden. Durch die vergleichende Analyse von 70S Ribosomen mit isolierter, proteinfreier 23S rRNA wurde gezeigt, dass die rRNA in Anwesenheit ribosomaler Proteine eine veränderte Stabilität und Flexibilität aufweist. Die deutlich verringerte Zahl von detektierten Effekten bei Verwendung von 70S Ribosomen deutet zudem auf eine direkte Maskierung der rRNA durch die ribosomalen Proteine hin.

Überraschend und neu war die Beobachtung, dass auch die Inkubation mit proteinfreien Lipidvesikeln eine Veränderung im *Footprint*-Pattern bewirkte, die dem Pattern weitgehend ähnelte, das mit SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen erhalten wurde. Daten über den Einfluss von Lipiden für die Interaktion der Ribosomen an den Kanal liegen bisher nicht vor. Durch *Footprint*-Analysen mit Proteinkomplexen sowie Lipiden in Detergenz-Lösung wurde gezeigt, dass beide Komponenten jeweils allein fähig sind, das charakteristische Pattern hervorzurufen. Die Effekte sind aber deutlich schwächer, als bei Verwendung von SecYEG-enthaltenden Proteoliposomen oder Lipidvesikeln. Die Art der Präsentation scheint entscheidend für den Effekt zu sein. Ferner konnte gezeigt werden, dass anionische Lipide, welche charakteristische Bestandteile der Membranen sind, ausschlaggebend für das Auftreten des Modifizierungsmusters sind. Die vorliegende Arbeit legt daher die Vermutung nahe, dass auch Lipide im Interaktionsprozess der Ribosomen mit der Membran eine Rolle spielen. Die Inkubation von 80S Ribosomen mit SecYEG-Komplexen sowie 70S Ribosomen mit Sec61-Komplexen zeigte, dass es sich nicht um einen spezifischen Effekt an der prokaryontischen Cytoplasmamembran handelt. Die Detektion zur 23S rRNA analoger Nukleotide innerhalb der 28S rRNA bedeutet des Weiteren eine erneute biochemische Bestätigung der evolutionären Konservierung der rRNA.

Die mit 70S Ribosomen detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen liegen größtenteils in Bereichen, die durch Strukturdaten von Ribosom-Kanal-Komplexen sowie phylogenetischer Konservierung von anderen Gruppen als Interaktionsbereiche beschrieben wurden. Neben diesen Bereichen konnten durch die *Footprint*-Analyse auch neue Regionen der rRNA identifiziert werden, die aufgrund ihrer Lage im Ribosom ebenfalls als Interaktionsbereiche für den Kanal in Frage kommen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle des Ribosomen-assoziierten Membranproteins RAMP4 untersucht. Die Vermutung, dass es sich auf die Translokation von Proteinen auswirkt, konnte nicht bestätigt werden. Die *in vitro* Translokation mit ER-Membranen von RAMP4-*knock-out*-Mäusen wies keine Beeinträchtigung auf. Hingegen war die Translation sowohl sekretorischer als auch cytoplasmatischer Proteine bei den *Knock-out*-Mäusen stark reduziert. Dies deutet auf eine beeinträchtigte Proteintranslation als Folge von ER-Stress und der damit einhergehenden *Unfolded Protein Response* hin.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- AKIMARU, J., MATSUYAMA, S., TOKUDA, H. UND MIZUSHIMA, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6545-6549.
- ANGELINI, S., BOY, D., SCHILTZ, E. UND KOCH, H.G. (2006) Membrane binding of the bacterial signal recognition particle receptor involves two distinct binding sites. *J Cell Biol*, **174**, 715-724.
- BAN, N., NISSEN, P., HANSEN, J., CAPEL, M., MOORE, P.B. UND STEITZ, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature*, **400**, 841-847.
- BAN, N., NISSEN, P., HANSEN, J., MOORE, P.B. UND STEITZ, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.
- 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.
- BEHRENS, C. (2003) Dissertation: Untersuchung der Interaktion zwischen ribosomaler RNA und Sec61/SecYEG Komplexen.
- BERNABEU, C. UND LAKE, J.A. (1982) Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 3111-3115.
- BESSONNEAU, P., BESSON, V., COLLINSON, I. UND DUONG, F. (2002) The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *Embo J*, **21**, 995-1003.
- BLOBEL, G. UND DOBBERSTEIN, B. (1975) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, **67**, 852-862.
- BLUM, H., BEIER, H. UND GROSS, J.H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- BOGDANOV, M., UMEDA, M. UND DOWHAN, W. (1999) Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. *J Biol Chem*, **274**, 12339-12345.
- BOTELHO, A.V., GIBSON, N.J., THURMOND, R.L., WANG, Y. UND BROWN, M.F. (2002) Conformational energetics of rhodopsin modulated by nonlamellar-forming lipids. *Biochemistry*, **41**, 6354-6368.
- BREUKINK, E., DEMEL, R.A., DE KORTE-KOOL, G. UND DE KRUIJFF, B. (1992) SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP: a monolayer study. *Biochemistry*, **31**, 1119-1124.
- BREYTON, C., HAASE, W., RAPOPORT, T.A., KUHLBRANDT, W. UND COLLINSON, I. (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature*, **418**, 662-665.
- BRIMACOMBE, R. (1995) The structure of ribosomal RNA: a three-dimensional jigsaw puzzle. *Eur J Biochem*, **230**, 365-383.
- BRODSKY, J.L., GOECKELER, J. UND SCHEKMAN, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9643-9646.
- BROWN, S. UND FOURNIER, M.J. (1984) The 4.5 S RNA gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *J Mol Biol*, **178**, 533-550.

- BROWN, M.F. (1994) Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chem Phys Lipids*, **73**, 159-180.
- 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.
- BRUNDAGE, L., FIMMEL, C.J., MIZUSHIMA, S. UND WICKNER, W. (1992) SecY, SecE, and band 1 form the membrane-embedded domain of Escherichia coli preprotein translocase. *J Biol Chem*, **267**, 4166-4170.
- 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.
- CARSON, M.J., BARONDESS, J. UND BECKWITH, J. (1991) The FtsQ protein of Escherichia coli: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol*, **173**, 2187-2195.
- 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.
- CHIRICO, W.J. (1992) Dissociation of complexes between 70 kDa stress proteins and presecretory proteins is facilitated by a cytosolic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 1150-1156.
- COLLINSON, I., BREYTON, C., DUONG, F., TZIATZIOS, C., SCHUBERT, D., OR, E., RAPOPORT, T. UND KÜHLBRANDT, W. (2001) Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *Embo J*, **20**, 2462-2471.
- CONNOLLY, T. UND GILMORE, R. (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell*, **57**, 599-610.
- 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.
- CROWLEY, K.S., REINHART, G.D. UND JOHNSON, A.E. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell*, **73**, 1101-1115.
- CROWLEY, K.S., LIAO, S., WORRELL, V.E., REINHART, G.D. UND JOHNSON, A.E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*, **78**, 461-471.
- CULLIS, P.R. UND DE KRUIJFF, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, **559**, 399-420.
- CURRAN, A.R., TEMPLER, R.H. UND BOOTH, P.J. (1999) Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. *Biochemistry*, **38**, 9328-9336.
- DALLEY, J.A., SELKIRK, A. UND POOL, M.R. (2008) Access to ribosomal protein rpl25p by the signal recognition particle is required for efficient cotranslational translocation. *Mol Biol Cell*, **19**, 2876-2884.
- DE KRUIJFF, B. (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 564-569.
- DE LEEUW, E., POLAND, D., MOL, O., SINNING, I., TEN HAGEN-JONGMAN, C.M., OUDEGA, B. UND LUIRINK, J. (1997) Membrane association of FtsY, the E. coli SRP receptor. *FEBS Lett*, **416**, 225-229.
- 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., SANDERS, S.L., FELDHEIM, D.A. UND SCHEKMAN, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, **349**, 806-808.

- DUONG, F. UND WICKNER, W. (1997) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *Embo J*, **16**, 4871-4879.
- ECONOMOU, A. UND WICKNER, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*, **78**, 835-843.
- EGEBJERG, J., CHRISTIANSEN, J. AND GARRETT, R.A. (1991) Attachment sites of primary binding proteins L1, L2 and L23 on 23 S ribosomal RNA of Escherichia coli. *J Mol Biol*, **222**, 251-264.
- EVANS, E.A., GILMORE, R. UND BLOBEL, G. (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 581-585.
- FERBITZ, L., MAIER, T., PATZELT, H., BUKAU, B., DEUERLING, E. UND BAN, N. (2004) Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, **431**, 590-596.
- Flower, A.M. (2007) The SecY translocation complex: convergence of genetics and structure. *Trends Microbiol*, **15**, 203-210.
- GILL, D.R. UND SALMOND, G.P. (1990) The identification of the Escherichia coli ftsY gene product: an unusual protein. *Mol Microbiol*, **4**, 575-583.
- 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., HARTMANN, E., PREHN, S. UND RAPOPORT, T.A. (1992) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, **357**, 47-52.
- GÖRLICH, D. UND RAPOPORT, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630.
- GRALLATH, S., SCHWARZ, J.P., BOTTCHE, U.M., BRACHER, A., HARTL, F.U. UND SIEGERS, K. (2006) L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep*, **7**, 78-84.
- GUMBART, J. UND SCHULTEN, K. (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J*, **90**, 2356-2367.
- HALIC, M., BECKER, T., POOL, M.R., SPAHN, C.M., GRASSUCCI, R.A., FRANK, J. UND BECKMANN, R. (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, **427**, 808-814.
- HAMMAN, B.D., CHEN, J.C., JOHNSON, E.E. UND JOHNSON, A.E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, **89**, 535- 544.
- HAMMAN, B.D., HENDERSHOT, L.M. UND JOHNSON, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, **92**, 747-758.
- HANADA, M., NISHIYAMA, K.I., MIZUSHIMA, S. UND TOKUDA, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J Biol Chem*, **269**, 23625-23631.
- HANEIN, D., MATLACK, K.E., JUNGNIKEL, 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.
- HARTL, F.U., LECKER, S., SCHIEBEL, E., HENDRICK, J.P. UND WICKNER, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane. *Cell*, **63**, 269-279.
- HARTMANN, E., GÖRLICH, D., KOSTKA, S., OTTO, A., KRAFT, R., KNESPEL, S., BURGER, E., RAPOPORT, T.A. UND PREHN, S. (1993) A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem*, **214**, 375-381.

- 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.
- HENDRICK, J.P. UND WICKNER, W. (1991) SecA protein needs both acidic phospholipids and SecY/E protein for functional high-affinity binding to the Escherichia coli plasma membrane. *J Biol Chem*, **266**, 24596-24600.
- HERSKOVITS, A.A. UND BIBI, E. (2000) Association of Escherichia coli ribosomes with the inner membrane requires the signal recognition particle receptor but is independent of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4621-4626.
- HERSKOVITS, A.A., SHIMONI, E., MINSKY, A. UND BIBI, E. (2002) Accumulation of endoplasmic membranes and novel membrane-bound ribosome-signal recognition particle receptor complexes in Escherichia coli. *J Cell Biol*, **159**, 403-410.
- HOLLAND, I.B. (2004) Translocation of bacterial proteins--an overview. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 5-16.
- HORI, O., MIYAZAKI, M., TAMATANI, T., OZAWA, K., TAKANO, K., OKABE, M., IKAWA, M., HARTMANN, E., MAI, P., STERN, D.M., KITAO, Y. UND OGAWA, S. (2006) Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. *Mol Cell Biol*, **26**, 4257-4267.
- JOLY, J.C. UND WICKNER, W. (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *Embo J*, **12**, 255-263.
- JOTHY, S., TAY, S. UND SIMPKINS, H. (1973) The role of membrane phospholipids in the interaction of ribosomes with endoplasmic-reticulum membrane. *Biochem J*, **132**, 637-640.
- JOTHY, S., BILODEAU, J.L. UND SIMPKINS, H. (1975) The role of membrane proteins and phospholipids in the interaction of ribosomes with endoplasmic reticulum membranes. *Can J Biochem*, **53**, 1039-1045.
- 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.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.
- 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., RAPOPORT, T.A. UND HARTMANN, E. (1998) The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol*, **141**, 887-894.
- KLEINIG, H., UND SITTE, P. (1999) Zellbiologie, 4., neubearbeitete Auflage von Hans Kleinig und Uwe Maier, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- KRAMER, G., RAUCH, T., RIST, W., VORDERWULBECKE, S., PATZELT, H., SCHULZE-SPECKING, A., BAN, N., DEUERLING, E. UND BUKAU, B. (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature*, **419**, 171-174.
- KUMAMOTO, C.A., CHEN, L., FANDL, J. UND TAI, P.C. (1989) Purification of the Escherichia coli secB gene product and demonstration of its activity in an in vitro protein translocation system. *J Biol Chem*, **264**, 2242-2249.
- KUSTERS, R., DOWHAN, W. UND DE KRUIJFF, B. (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted Escherichia coli inner membranes. *J Biol Chem*, **266**, 8659-8662.

- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LEE, A.H., IWAKOSHI, N.N. UND GLIMCHER, L.H. (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **23**, 7448-7459.
- LEENHOUTS, J.M., VAN DEN WIJNGAARD, P.W., DE KROON, A.I. UND DE KRUIJFF, B. (1995) Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. *FEBS Lett*, **370**, 189-192.
- LEFFERS, H., KJEMS, J., OSTERGAARD, L., LARSEN, N. UND GARRETT, R.A. (1987) Evolutionary relationships amongst archaeobacteria. A comparative study of 23 S ribosomal RNAs of a sulphur-dependent extreme thermophile, an extreme halophile and a thermophilic methanogen. *J Mol Biol*, **195**, 43-61.
- LEFFERS, H., EGEBJERG, J., ANDERSEN, A., CHRISTENSEN, T. UND GARRETT, R.A. (1988) Domain VI of *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. Structure, assembly and function. *J Mol Biol*, **204**, 507-522.
- LEWICKI, B.T., MARGUS, T., REMME, J. UND NIERHAUS, K.H. (1993) Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly in vivo. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*, **231**, 581-593.
- 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.
- LILL, R., DOWHAN, W. UND WICKNER, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell*, **60**, 271-280.
- LUIRINK, J., TEN HAGEN-JONGMAN, C.M., VAN DER WEIJDEN, C.C., OUDEGA, B., HIGH, S., DOBBERSTEIN, B. UND KUSTERS, R. (1994) An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *Embo J*, **13**, 2289-2296.
- LUIRINK, J. UND SINNING, I. (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 17-35.
- MAILLARD, A.P., LALANI, S., SILVA, F., BELIN, D. UND DUONG, F. (2007) Dereglulation of the SecYEG translocation channel upon removal of the plug domain. *J Biol Chem*, **282**, 1281-1287.
- MANTING, E.H., VAN DER DOES, C., REMIGY, H., ENGEL, A. UND DRIESSEN, A.J. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *Embo J*, **19**, 852-861.
- MARTOGLIO, B., HOFMANN, M.W., BRUNNER, J. UND DOBBERSTEIN, B. (1995) The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell*, **81**, 207-214.
- MATLACK, K.E., PLATH, K., MISSELWITZ, B. UND RAPOPORT, T.A. (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*, **277**, 938-941.
- 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.
- MÉNÉTRÉ, J.F., NEUHOF, A., MORGAN, D.G., PLATH, K., RADERMACHER, M., RAPOPORT, T.A. UND AKEY, C.W. (2000) The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol Cell*, **6**, 1219-1232.
- MÉNÉTRÉ, 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.

- MÉNÉTRÉ, J.F., SCHALETZKY, J., CLEMONS, W.M., JR., 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.
- MERRYMAN, C. UND NOLLER, H.F. (1998). Footprinting and modification-interference analysis of binding sites on RNA. In: RNA Protein Interactions, a practical approach, C. W. J. Smith. *Oxford University Press*.
- 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.
- MEYER, T.H., MÉNÉTRÉ, J.F., BREITLING, R., MILLER, K.R., AKEY, C.W. UND RAPOPORT, T.A. (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J Mol Biol*, **285**, 1789-1800.
- MILLMAN, J.S., QI, H.Y., VULCU, F., BERNSTEIN, H.D. UND ANDREWS, D.W. (2001) FtsY binds to the Escherichia coli inner membrane via interactions with phosphatidylethanolamine and membrane proteins. *J Biol Chem*, **276**, 25982-25989.
- MITRA, K., SCHAFFITZEL, C., SHAIKH, T., TAMA, F., JENNI, S., BROOKS, C.L., 3RD, BAN, N. UND FRANK, J. (2005) Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, **438**, 318-324.
- MOAZED, D., ROBERTSON, J.M. UND NOLLER, H.F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature*, **334**, 362-364.
- MOAZED, D. UND NOLLER, H.F. (1989) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, **57**, 585-597.
- MOORE, P.B. (1998) The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 35-58.
- MORGAN, D.G., MÉNÉTRÉ, J.F., NEUHOF, A., RAPOPORT, T.A. UND AKEY, C.W. (2002) Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17Å resolution. *J Mol Biol*, **324**, 871-886.
- MORI, H. UND ITO, K. (2001) An essential amino acid residue in the protein translocation channel revealed by targeted random mutagenesis of SecY. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5128-5133.
- 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.
- MOTHES, W., JUNGnickel, B., BRUNNER, J. UND RAPOPORT, T.A. (1998) Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **142**, 355-364.
- 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.
- NAZAR, R.N. (1980) A 5.8 S rRNA-like sequence in prokaryotic 23 S rRNA. *FEBS Lett*, **119**, 212-214.
- 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.
- NISHIYAMA, K., MIZUSHIMA, S. UND TOKUDA, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *Embo J*, **12**, 3409-3415.
- NOLLER, H.F., HOFFARTH, V. UND ZIMNIAK, L. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, **256**, 1416-1419.
- OLIVER, J., JUNGnickel, B., GÖRLICH, D., RAPOPORT, T. UND HIGH, S. (1995) The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, **362**, 126-130.
- OSBORNE, A.R. UND RAPOPORT, T.A. (2007) Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell*, **129**, 97-110.

- PALADE, G. (1975) Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*, **189**, 867.
- 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.
- PHILLIPS, G.J. UND SILHAVY, T.J. (1992) The E. coli ffh gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, **359**, 744-746.
- POOL, M.R., STUMM, J., FULGA, T.A., SINNING, I. UND DOBBERSTEIN, B. (2002) Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science*, **297**, 1345-1348.
- POWERS, T. UND WALTER, P. (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the Escherichia coli signal recognition particle and its receptor. *Embo J*, **16**, 4880-4886.
- PRINZ, A., BEHRENS, C., RAPOPORT, T.A., HARTMANN, E. UND KALIES, K.U. (2000) Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J*, **19**, 1900-1906.
- RADEN, D., SONG, W. UND 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.
- RAETZ, C.R. (1978) Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in Escherichia coli. *Microbiol Rev*, **42**, 614-659.
- RANDALL, L.L. UND HARDY, S.J. (1983) Preparation of free and membrane-bound polysomes from Escherichia coli. *Methods Enzymol*, **97**, 70-76.
- RANDALL, L.L., TOPPING, T.B. UND HARDY, S.J. (1990) No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science*, **248**, 860-863.
- RANDALL, L.L. UND HARDY, S.J. (2000) The promiscuous and specific sides of SecB. *Nat Struct Biol*, **7**, 1077-1079.
- RANDALL, L.L. UND HARDY, S.J. (2002) SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1617-1623.
- RAPOPORT, T.A. (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450**, 663-669.
- 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.
- SAARMA, U. UND REMME, J. (1992) Novel mutants of 23S RNA: characterization of functional properties. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3147-3152.
- SAKAGUCHI, M., UEGUCHI, C., ITO, K. UND OMURA, T. (1991) Yeast gene which suppresses the defect in protein export of a secY mutant of E. coli. *J Biochem*, **109**, 799-802.
- SAMBROOK, J. UND RUSSELL, D.W., (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., *CSHL Press*.
- 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.
- SAUER-ERIKSSON, A.E., UND HAINZL, T. (2003) S-domain assembly of the signal recognition particle *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 64-70
- SCHAFFITZEL, C., OSWALD, M., BERGER, I., ISHIKAWA, T., ABRAHAMS, J.P., KOERTEN, H.K., KONING, R.I. UND BAN, N. (2006) Structure of the E. coli signal recognition particle bound to a translating ribosome. *Nature*, **444**, 503-506.

- 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 WEINKAUF, S. (2005) The oligomeric distribution of SecYEG is altered by SecA and translocation ligands. *J Mol Biol*, **354**, 258-271.
- SCHIEBEL, E., DRIESSEN, A.J., HARTL, F.U. UND WICKNER, W. (1991) Delta mu H<sup>+</sup> and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, **64**, 927-939.
- SCHNARE, M.N., DAMBERGER, S.H., GRAY, M.W. UND GUTELL, R.R. (1996) Comprehensive comparison of structural characteristics in eukaryotic cytoplasmic large subunit (23 S-like) ribosomal RNA. *J Mol Biol*, **256**, 701-719.
- SCHRÖDER, K., MARTOGGIO, B., HOFMANN, M., HOLSCHER, C., HARTMANN, E., PREHN, S., RAPOPORT, T.A. UND DOBBERSTEIN, B. (1999) Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *Embo J*, **18**, 4804-4815.
- SCOTTI, P.A., VALENT, Q.A., MANTING, E.H., URBANUS, M.L., DRIESSEN, A.J., OUDEGA, B. UND LUIRINK, J. (1999) SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. *J Biol Chem*, **274**, 29883-29888.
- SHILTON, B., SVERGUN, D.I., VOLKOV, V.V., KOCH, M.H., CUSACK, S. UND ECONOMOU, A. (1998) Escherichia coli SecA shape and dimensions. *FEBS Lett*, **436**, 277-282.
- 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.
- SNYDERS, S., RAMAMURTHY, V. UND OLIVER, D. (1997) Identification of a region of interaction between Escherichia coli SecA and SecY proteins. *J Biol Chem*, **272**, 11302-11306.
- STIRLING, C.J., ROTHBLATT, J., HOSOBUCHI, M., DESHAIES, R. UND SCHEKMAN, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **3**, 129-142.
- TAI, P.C., CAULFIELD, M.P. UND DAVIS, B.D. (1983) Synthesis of proteins by membrane-associated polysomes and free polysomes. *Methods Enzymol*, **97**, 62-69.
- 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.
- TIAN, P. UND ANDRICOAEI, I. (2006) Size, motion, and function of the SecY translocon revealed by molecular dynamics simulations with virtual probes. *Biophys J*, **90**, 2718-2730.
- 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.
- UCHIDA, K., MORI, H. UND MIZUSHIMA, S. (1995) Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **270**, 30862-30868.
- UCHIUMI, T. UND KOMINAMI, R. (1994) A functional site of the GTPase-associated center within 28S ribosomal RNA probed with an anti-RNA autoantibody. *Embo J*, **13**, 3389-3394.
- UCHIUMI, T. UND KOMINAMI, R. (1997) Binding of mammalian ribosomal protein complex P0.P1.P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28 S ribosomal RNA and effect on the accessibility to anti-28 S RNA autoantibody. *J Biol Chem*, **272**, 3302-3308.

- VALLE, M., ZAVIALOV, A., LI, W., STAGG, S.M., SENGUPTA, J., NIELSEN, R.C., NISSEN, P., HARVEY, S.C., EHRENBERG, M. UND FRANK, J. (2003) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol*, **10**, 899-906.
- VAN DALEN, A. UND DE KRUIJFF, B. (2004) The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 97-109.
- VAN DEN BERG, B., CLEMONS, W.M., JR., 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.
- VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, E., KILLIAN, J.A. AND DE KRUIJFF, B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 275-288.
- VAN DER DOES, C., SWAVING, J., VAN KLOMPENBURG, W. UND DRIESSEN, A.J. (2000) Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. *J Biol Chem*, **275**, 2472-2478.
- VAN VOORST, F. UND DE KRUIJFF, B. (2000) Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem J*, **347 Pt 3**, 601-612.
- VEENENDAAL, A.K., VAN DER DOES, C. UND DRIESSEN, A.J. (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 81-95.
- 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.
- WALTER, P. UND BLOBEL, G. (1983) Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol*, **96**, 84-93.
- WALTER, P. AND BLOBEL, G. (1983) Signal recognition particle: a ribonucleoprotein required for cotranslational translocation of proteins, isolation and properties. *Methods Enzymol*, **96**, 682-691.
- WALTER, P. UND JOHNSON, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 87-119.
- WEISS, J.B., RAY, P.H. UND BASSFORD, P.J., JR. (1988) Purified secB protein of Escherichia coli retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8978-8982.
- YAHR, T.L. UND WICKNER, W.T. (2000) Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *Embo J*, **19**, 4393-4401.
- YAMAGUCHI, A., HORI, O., STERN, D.M., HARTMANN, E., OGAWA, S. UND TOHYAMA, M. (1999) Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol*, **147**, 1195-1204.
- YONATH, A., LEONARD, K.R. UND WITTMANN, H.G. (1987) A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science*, **236**, 813-816.
- ZELAZNY, A., SELUANOV, A., COOPER, A. UND BIBI, E. (1997) The NG domain of the prokaryotic signal recognition particle receptor, FtsY, is fully functional when fused to an unrelated integral membrane polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6025-6029.

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro, 10 <sup>-6</sup>
Ψ	Pseudouridin
Å	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>C. lupus familiaris</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>
CL	Cardiolipin
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton; Massenzahl
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleotid-5'-triphosphat
DMS	Dimethylsulfat
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
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hRM	raue Hundemembranen
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
K-RM	mit Hochsalz behandelte raue Membranen
m	Meter
m	Milli, 10 <sup>-3</sup>
mRM	raue Mausmembranen
M	molar
min	Minute
mol	Stoffmenge
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano, 10 <sup>-9</sup>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid

---

N-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
OD <sub>260</sub>	optische Dichte gemessen bei 260 nm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK-RM	mit Puromycin und Hochsalz behandelte raue Membranen
RAMP	<i>ribosome associated membran protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minutes</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i>
SR	SRP-Rezeptor
SRP	<i>signal recognition particle</i>
T	Thymin
TMD	Transmembrandomäne
TRAM	<i>translocating chain associating membrane protein</i>
TRAP	<i>translocon associated protein</i>
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i>

## 8. ANHANG

**Tabelle 2: Alle detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche mit 70S Ribosomen und in Proteoliposomen rekonstituiertem SecYEG, SecYEG in Lösung, Lipidvesikeln sowie Lipid in Lösung (siehe 3.1.4.2).**

Alle detektierten *Footprints* und Basenverstärkungen aus den drei Versuchen wurden berücksichtigt. Nicht berücksichtigt wurde die Häufigkeit des aufgetretenen Effektes beim Vergleich der drei Versuche. Lediglich die Intensität des Schutzes bzw. der Verstärkung innerhalb des Versuches wurde berücksichtigt. So entspricht ein x der schwächsten, drei x der stärksten Ausprägung. Es kann daher nur innerhalb einer Zeile verglichen werden. Gelegentlich konnte eine Base sowohl als *Footprint* wie auch als Basenverstärkung identifiziert werden. Effekte der Ansätze SecYEG in Lösung, SecYEG mit Lipid in Lösung und Lipid in Lösung die in allen drei Versuchen mit gleicher Ausprägung (im Vergleich zu Proteoliposomen oder Lipidvesikeln) auftraten und somit signifikant sind, sind grün unterlegt. Gelb: *Footprint*; rot: Basenverstärkung; grün: signifikanter Effekt.

	SecYEG-Proteoliposomen	Lipidvesikel	SecYEG in Lösung	SecYEG+Lipid in Lösung	Lipid in Lösung
Base					
11	xx	xx	x	xx	
34	xxx	xxx			
50	xxx	xxx			
62	x	x	x	x	x
64	xx	xx	xxx	xxx	x
79	xxx	xx	xx	xxx	
86	xxx	xxx	x	xx	xxx
87	xx	xxx	xx	x	xx
130	xxxx	xx	xxx	xxxx	x
134	xxx	xxx			
137	xxx	xxx	xxx	xxx	xx
138	xxx	xx	xx	xx	xx
140	xxx	xx	xx	xxx	
145	xx	xx	xxx	xxx	xxx
149	xxx	xxx			
152	xxx	xxx	xx	xx	xx
162	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
164	x	x	xxx	xxx	xx
167	xxx	x	xxx	xx	xxx
179	xxx	xxx			
200	xxx	xxx	xx	x	xx
229			xxx	xxx	xx
256	xxx		xxx	xx	xx
260	xx	xx		xxx	
261	xx	xx	x	xxx	
262	xx	xx	x	xxx	x
270			xx	xxx	xxx
276	xxx	xxx			
278	x		xxx	xxx	xxx
279	x		xxx	xxx	xxx
294	xxx	xxx		xxx	
314	x	x	xx	xxx	
315	x	x	xx	xxx	
316	xxx	x		xx	
317			xxx		

319	xxx	xx	xx	xxx	xx
322	xxx	xx	xxx	x	x
323	xx	xx	xxx	xxx	xxx
340	xxx	x	xx		
362	xxx	xx	xx	xxx	xxx
368	xx	xx	x	x	xxx
391	xxx	xxx		xx	x
412	xxx	x		xxx	x
453	xxx	xxx			
460	xxx	xxx	xx	xxx	xx
470	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
471	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
477	xxx	xxxx	xx	x	xxx
482	xx	xx	xxx	xxx	xxx
490	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxx
496	xxx	xxx			xx
523	xxxx	xx	xx	xxxxxx	x
541	xxx	xxx	xxx	xxx	x
544	xxx	x	x	xxx	
896	xxx	xxx		xxx	xxx
996	xx	xx		xxx	xxx
1017	x	x	xxx	x	
1026			xxx	x	
1036			xxx		
1046	xxx	xxx			
1127	xxx	xx		xxx	xxx
1131	xx	xx		x	xxx
1136	xx	xx	xx	xxx	
1174	xxx	xxx			
1175	xxx	xxx			
1177	xxx	xxx	x		
1178	xxx	xxx			
1179	xxx	xxx			
1180	xxx	xxx	xx	xx	x
1181	xxx	xxx			
1193	xxx	xxx			
1195	xxx				
1197	xxx	xxx			
1204	xxx			xx	
1205	xxx	xxx	x	xx	xx
1208	xxx	x		xx	
1209	xxx	xx	x	xxx	xx
1211	xxx	xx	x	xxx	x
1234	xxx	x		x	
1239	xxx	x	x	xxx	
1241	xxx	x		xx	
1244	xxx	x		x	x
1268	xxx	xxx		xx	xx
1269	xxx	xxx		xx	xx

1270	xxx	xxx	xx	xx	xx
1271	xxx	xxx			
1272	xxx	xxx			
1284	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1288	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1321	xxx	xxx	x	x	xx
1329	xxx	xxx	xxx	x	x
1348	xxx	xxx	x	x	x
1354	xxx	xxx	x	x	xxx
1356	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1361	xx	xx	xx	xxx	xx
1367	xxx	xxx	xx	x	xx
1397	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1398	xxx	xx	xx	xxx	xx

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Poster:

MAI, P., HARTMANN, E., KALIES, K.U. Analysis of the interaction between ribosomes and protein-conducting channels by RNA-footprinting. Herbsttagung der GBM, Hamburg, 2007.

### Artikel:

HORI, O., MIYAZAKI, M., TAMATANI, T., OZAWA, K., TAKANO, K., OKABE, M., IKAWA, M., HARTMANN, E., MAI, P., STERN, D.M., KITAO, Y. AND OGAWA, S. (2006) Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. *Mol Cell Biol*, **26**, 4257-4267.

---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Petra Mai  
Geburtsdatum/-ort: 22. September 1976, Hildesheim  
Wohnort: Tünkenhagen 24; 23552 Lübeck  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

#### *Schule*

1982-1985 Grundschole Moritzberg, Hildesheim  
1985-1995 Robert-Bosch-Gesamtschule, Hildesheim;  
1992 Eintritt in die integrierte, gymnasiale Oberstufe  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### *Studium*

1995-2001 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Hochschulabschluss als Diplom-Biologin  
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Stefan Schütze, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Kiel  
Diplomarbeitsthema: „Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Aktivierung der endo-lysosomalen Aspartat-Protease Cathepsin D durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Ceramid“

### Berufstätigkeit

01/2002-05/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am „Institute of Biological Sciences“ im Labor von Prof. Katsuo Furukubo-Tokunaga, „University of Tsukuba“, Japan  
Seit Nov. 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie, Universität zu Lübeck  
Beginn der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enno Hartmann

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Petra Mai, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Petra Mai

Lübeck, August 2008

## 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 herantreten an das wissenschaftliche Arbeiten und die Unterstützung während der gesamten Zeit.

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

Danken möchte ich auch allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für die Hilfbereitschaft, 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.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Walther Traut für die Hilfe bei der Bearbeitung der Sequenzalignments. Priv.-Doz. Dr. Christian Schmitt danke ich für seine selbstverständliche Hilfbereitschaft bei Fragen zu Computerproblemen.

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! Insbesondere danke ich Martina und Christina für ihre unglaubliche Hilfbereitschaft. Cyrille danke ich für seine bedingungslose Unterstützung während der Endphase dieser Arbeit.

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