

Kernimport und nukleolare Akkumulation von bakteriellen ribosomalen Proteinen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Mark Perić

aus Hamburg

Hamburg 2007

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Mai 2003 bis Januar 2007 am Institut für Molekulare Zellbiologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Joachim Kruppa durchgeführt.

Gutachter:

Prof. Dr. U. Hahn

Prof. Dr. J. Kruppa

Tag der Disputation: 18. Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Danksagung	1
2. Abkürzungsverzeichnis	2
3. Einleitung	4
3.1 Vorkommen und Funktion von Ribosomen	4
3.2 Biochemische Zusammensetzung von Ribosomen	4
3.3 Dreidimensionale Struktur prokaryontischer Ribosomen in atomarer Auflösung	7
3.4 Dreidimensionale Struktur eukaryontischer Ribosomen	10
3.5 Ribosomenbiogenese	11
3.5.1 Expression von eukaryontischen ribosomalen Genen	11
3.5.2 Struktur und Funktion der Nukleoli	12
3.5.3 Biogenese der ribosomalen Untereinheiten in Eukaryonten	14
3.5.3.1 Prozessierung der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit in der Hefe	16
3.5.3.2 Prozessierung der großen ribosomalen 60S Untereinheit in der Hefe	16
3.5.3.3 Export und Assoziation der ribosomalen Untereinheiten	16
3.5.3.4 Anlagerung der ribosomalen Proteine	17
3.6 Nukleozytoplasmatischer Transport	19
3.6.1 Der Kernporenkomplex (NPC)	19
3.6.2 Die Nukleoporine des Kernporenkomplexes	20
3.6.3 Mechanismen des aktiven nukleozytoplasmatischen Transports	21
3.6.3.1 Transportfaktoren	21
3.6.3.2 Der klassische Importmechanismus	22
3.6.3.3 Der RanGTP-Zyklus	24
3.6.3.4 Translokation durch den Kernporenkomplex	25
3.6.4 Kernlokalisierungssignale (NLS)	27
3.6.4.1 Bekannte Kernlokalisierungssignale ribosomaler Proteine	28
3.6.4.2 Bekannte Nukleoluslokalisationsdomänen (NuLD)	29
3.7 Evolution des Zellkerns	30
3.7.1 Das autogene Modell	31
3.7.2 Das Chimären-Modell	32
3.7.3 Vereinheitlichendes Modell	32
4. Aufgabenstellung	35

5. Material und Methoden	37
5.1 Materialien.....	37
5.1.1 Chemikalien.....	37
5.1.2 Enzyme	37
5.1.3 Oligonukleotide	37
5.1.4 Antikörper.....	37
5.1.5 Vektoren	38
5.1.6 Biologisches Material	39
5.1.6.1 Kompetente Zellen	39
5.1.6.2 Zelllinien.....	39
5.1.6.3 Genomische DNA.....	40
5.1.7 Geräte.....	40
5.1.8 Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	41
5.2 Molekularbiologische Methoden.....	46
5.2.1 PCR - Polymerase-Kettenreaktion.....	46
5.2.2 DNA-Quantifizierung im analytischen Agarosegel	47
5.2.3 DNA-Reinigung	47
5.2.4 Restriktion der DNA und der Plasmide.....	48
5.2.5 Gelelution aus präparativem Agarosegel.....	48
5.2.6 Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligonukleotiden	49
5.2.7 Ligation.....	50
5.2.8 Herstellung kompetenter Zellen	50
5.2.9 Transformation der Ligationsansätze mit kompetenten Zellen	51
5.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA	51
5.2.11 Sequenzierung der Plasmid-DNA	52
5.2.12 Anlegen von Dauerkulturen und Midipräparation von Plasmid-DNA.....	53
5.3 Zellkultur	55
5.3.1 Passagieren der HeLa- und COS-Zellen.....	55
5.3.2 Zellzahlbestimmung	55
5.3.3 Transfektion.....	56
5.3.3.1 Vorbereiten der Zellkulturschalen	56
5.3.3.2 Transfektion mit dem <i>FuGENE 6-Reagenz</i>	56
5.3.4 Nachweis von EGFP-Fusionsproteinen durch Fluoreszenzmikroskopie	57
5.3.5 Nachweis von β -Gal-Fusionsproteinen durch indirekte Immunfluoreszenz	57

5.3.6 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz.....	58
5.3.7 Ribosomenpräparation.....	58
5.3.8 Puromycinbehandlung von Polysomen	60
5.3.9 Fraktionierung der 40S, 60S und 80S Ribosomen sowie der Polysomen	60
5.3.10 Hochsalzbehandlung der Ribosomen	60
5.4. Proteinchemische Methoden	62
5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
5.4.2 Western Blot	63
5.4.3 Immunologischer Nachweis der geblotteten Proteine	64
6. Ergebnisse.....	65
6.1 Aktiver Import des ribosomalen Proteins S9 der Prokaryonten <i>Escherichia coli</i> und <i>Thermus thermophilus</i> in den Zellkern eukaryontischer Zellen.....	65
6.1.1 Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren und Lokalisation der exprimierten Proteine	65
6.1.1.1 Klonierung der Plasmide für EGFP-Fusionsproteine.....	65
6.1.1.2 Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine	67
6.1.1.3 Klonierung der Plasmide für β -Galaktosidase-Fusionsproteine	71
6.1.1.4 Lokalisation der β -Galaktosidase-Fusionsproteine	72
6.1.1.5 Klonierung der Plasmide der RPS9 ohne Reportermolekül	73
6.1.1.6 Lokalisation der RPS9 von Ec und Tt	74
6.2 Eingrenzung des NLS der RPS9 von <i>E. coli</i> und <i>T. thermophilus</i>	76
6.2.1 Lokalisation von EGFP-Fusionspeptiden	76
6.2.2 Lokalisation von β -Galaktosidase-Fusionspeptiden	78
6.3 Bestimmung einer minimalen Kernlokalisationssequenz des RPS9Ec.....	81
6.3.1. Weitere Eingrenzung des NLS des RPS9Ec durch EGFP-Fusionspeptide	81
6.3.2 Ermittlung einer minimalen Kernlokalisationssequenz des RPS9Ec	83
6.4 Verteilung der ribosomalen Proteine S9 von <i>E. coli</i> und <i>T. thermophilus</i> in..... zellularen Fraktionen eukaryontischer Zellen	86
6.4.1 Immunologische Detektion der RPS9 von Ec und Tt in HeLa-Zellfraktionen ..	86
6.4.2 Analyse des Polysomenprofils transfizierter HeLa-Zellen.....	88
6.4.3 Hochsalzbehandlung der Ribosomen transfizierter HeLa-Zellen	90
6.4.4 Lokalisation des eukaryontischen RPS16 in COS-Zellfraktionen	92

6.5 Lokalisation weiterer prokaryontischer RPs in eukaryontischen Zellen	94
6.5.1 Lokalisation der heterologen RPs S6 und S18 von <i>T. thermophilus</i>	94
6.5.2 Eingrenzung des NLS des ribosomalen Proteins S18 von <i>T. thermophilus</i>	95
6.6 Austausch von Domänen zwischen dem bakteriellen RPS9 von <i>E. coli</i> und	
dem humanen RPS16	98
6.6.1 Klonierung der Plasmide zur Expression spezifischer Domänen	98
6.6.2 Lokalisation der mit EGFP derivatisierten Domänen austausch-Konstrukte	98
6.6.3 Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte in HeLa-Zellfraktionen	100
6.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	103
6.7.1 Lokalisation der prokaryontischen ribosomalen Proteine S6, S9, S12, S17	
und S18 von <i>T. thermophilus</i> sowie des S9 von <i>E. coli</i>	104
6.7.2 Eingrenzung des NLS des prokaryontischen RPS9 von <i>E. coli</i>	105
6.7.3 Eingrenzung des NLS des prokaryontischen RPS18 von <i>T. thermophilus</i>	106
6.7.4 Lokalisation der β -Galaktosidase-Fusionspeptide des humanen RPS16	107
7. Diskussion	109
7.1 Passiver Kernimport von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 60 kDa	109
7.2 Aktiver Kernimport prokaryontischer ribosomaler Proteine	110
7.3 Kernlokalisationssignal und Nukleoluslokalisationsdomäne des RPS18Tt	111
7.4 Vergleich der prokaryontischen RPS9 von Ec und Tt sowie des RPS16Hs	114
7.4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Sekundärstrukturen	114
7.4.2 Vergleich der Tertiärstrukturen	116
7.4.3 Funktion und Bedeutung der Mitglieder der S9-Proteinfamilie	116
7.4.4 Intrazelluläre Lokalisation des humanen RPS16	118
7.4.4.1 Nukleolare Lokalisation des humanen RPS16	118
7.4.4.2 Hypothese für das NLS des RPS16Hs	119
7.4.5 Kernlokalisationssignale der RPS9	121
7.4.6 Nukleoluslokalisationsdomänen der RPS9	122
7.4.7 Interaktion des prokaryontischen RPS9 mit eukaryontischen Ribosomen	123
7.5 Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte	124
7.6 Evolutionäre Aspekte	125
8. Zusammenfassung	127
9. Abstract	129
10. Literaturverzeichnis	131

11. Anhang	139
11.1 Verwendete PCR-Programme	139
11.1.1 MP-S9gDNA	139
11.1.2 MP-Seq	139
11.2 Verwendete Primer und Oligonukleotide	140
11.2.1 Verwendete Primer für die Klonierung der EGFP-Fusionsproteine	140
11.2.2 Verwendete Primer für die Klonierung der β -Gal-Fusionsproteine	141
11.2.3 Verwendete Primer für die Klonierung der ribosomalen Proteine S9.....	141
11.2.4 Verwendete Primer für die Klonierung der EGFP-Fusionspeptide.....	142
11.2.5 Verwendete Primer für die Klonierung der β -Gal-Fusionspeptide	143
11.2.6 Verwendete Primer für die Klonierung der S9Ec-EGFP-Fusionspeptide	144
11.2.7 Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der S9Ec-Fusionspeptide..	145
11.2.8 Verwendete Primer für die Klonierung der β -Gal-Fusionsproteine	145
11.2.9 Verwendete Primer für die Klonierung der S18Tt- β -Gal-Fusionspeptide	146
11.2.10 Verwendete Primer für die S18Tt- β -Gal-Fusionspeptide mit Mutation.....	146
11.2.11 Verwendete Primer für die Domänen austausch-Konstrukte	147
11.2.12 Gefahrstoffliste	148
12. Curriculum vitae	149
13. Eidesstattliche Versicherung	151

1. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kruppa für die offene Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die intensive Betreuung während der Laborarbeit und beim Verfassen der Dissertation sowie für die interessanten Ideen und Anregungen hinsichtlich meines Projekts.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hahn für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung im Fachbereich Chemie bedanken.

Mein ganz spezieller Dank ist an Herrn Marc-Angelo Bisotti gerichtet. Er erleichterte mir einerseits die rasche Integration in Hamburg, andererseits vermittelte er mir mit bemerkenswerter Geduld die theoretischen und praktischen Grundlagen der molekularbiologischen Arbeit.

In diesem Sinne möchte ich mich ebenso bei Herrn Andreas Bauche bedanken, der aufgrund seiner intensiven Laborerfahrung immer kompetente Ratschläge und eine helfende Hand parat hatte. Seine Ausgeglichenheit und Ruhe haben mir in manch schwieriger Phase sehr geholfen.

Meinen Eltern und meiner Tante Elke möchte ich zunächst für die finanzielle Unterstützung danken.

Wichtiger noch war das Gefühl der Geborgenheit, das bei Aufenthalten daheim bzw. bei Besuchen von Freunden und Verwandten in Hamburg immer wieder für Ablenkung und neue Motivation sorgte.

2. Abkürzungsverzeichnis

Ak	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
AS	<u>A</u> minosäure(n)
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
β-gal, βgal	<u>β</u> - <u>G</u> alaktosidase
bidest.	Autoklaviertes, osmotisch aufgereinigtes Wasser
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
BSA	Rinderserumalbumin (<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CTP	<u>C</u> ytosin <u>t</u> riphosphat
Da	<u>D</u> alton
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidino-2-phenyl <u>i</u> ndol
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
Ec	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli (<u>E</u> . <u>c</u> oli)
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<u>E</u> nhanced green <u>f</u> luorescent protein)
Eppi	Eppendorfgefäß
FCS	Fötale Kälberserum (<u>F</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FITC	<u>F</u> luoreszeini <u>s</u> othiocyant
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent protein)
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
h	Stunde (<u>h</u> our)
HCl	<u>H</u> ydrogen <u>c</u> hl <u>o</u> rid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<u>H</u> orseraddish <u>p</u> eroxidase)
Hs	<u>H</u> omo <u>s</u> apiens (<u>H</u> . <u>s</u> apiens)
IBB	<u>I</u> mportin <u>β</u> <u>b</u> indende Domäne
IEP	<u>I</u> soelektrischer <u>P</u> unkt
kb	<u>K</u> ilobasen <u>p</u> aare
KCl	<u>K</u> alium <u>c</u> hl <u>o</u> rid
M	<u>M</u> olare Masse, definiert als mol pro l
mA	<u>M</u> illiampere
MCS	Multipler Klonierungsbereich (<u>M</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
MDa	<u>M</u> egad <u>a</u> lton
min.	<u>M</u> inute
mRNA	Boten-RNA (<u>M</u> essenger <u>R</u> NA)
MW	Molekulargewicht (<u>M</u> olecular <u>w</u> eight)
NaAc	<u>N</u> atrium <u>a</u> cet <u>a</u> t
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hl <u>o</u> rid
NEB	<u>N</u> ew <u>E</u> ngland <u>B</u> iolabs GmbH (Frankfurt am Main)
NK	<u>N</u> egativ <u>k</u> ontrolle
NLS	Kernlokalisierungssignal (<u>N</u> uclear <u>l</u> ocalisation <u>s</u> ignal)
NOR	Nukleolus-Organisationseinheit (<u>N</u> ucleolus <u>o</u> rganizer <u>r</u> egion)
NPC	Kernporenkomplex (<u>N</u> uclear <u>p</u> ore <u>c</u> omplex)
NuLD	<u>N</u> ukleolus <u>l</u> okalisations <u>d</u> omäne
Nups	Nukleoporine (<u>N</u> ucleoporins)
ORI	Replikationsursprung (<u>O</u> rig <u>i</u> n of replication)

p. a.	<u>P</u> ro <u>a</u> lysi
PBS	Salzhaltiger Phosphatpuffer (<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PK	<u>P</u> ositiv <u>k</u> ontrolle
rDNA	<u>R</u> ibosomale <u>D</u> NA
RNA	Ribonukleinsäure (<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
RNP	<u>R</u> ibonukleoproteinpartikel
RP	<u>R</u> ibosomales <u>P</u> rotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>R</u> ounds per <u>m</u> inute)
rRNA	<u>R</u> ibosomale <u>R</u> NA
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	<u>S</u> ekunde
S	<u>S</u> vedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel
snoRNP	Kleiner nukleolarer Ribonukleoproteinpartikel (<u>S</u> mall <u>n</u> ucleolar <u>r</u> ibonucleoprotein)
SV40	<u>S</u> imian Vacuolating <u>V</u> irus <u>40</u>
S16/S9	Konstrukt, das für folgendes Protein kodiert: S16 <i>H. sapiens</i> (AS 1-102)+S9 <i>E. coli</i> (AS 93-130)
2xEGFP S16/S9	Am N-Terminus mit zwei EGFP derivatisiertes Konstrukt, das für folgendes Protein kodiert: EGFP+EGFP+S16 <i>H. sapiens</i> (AS 1-102)+S9 <i>E. coli</i> (AS 93-130)
S9/S16	Konstrukt, das für folgendes Protein kodiert: S9 <i>E. coli</i> (AS 1-92)+S16 <i>H. sapiens</i> (AS 103-146)
2xEGFP S9/S16	Am N-Terminus mit zwei EGFP derivatisiertes Konstrukt, das für folgendes Protein kodiert: EGFP+EGFP+S9 <i>E. coli</i> (AS 1-92)+S16 <i>H. sapiens</i> (AS 103-146)
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
Temed	(N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min)
Tris	<u>T</u> ris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	<u>T</u> ransfer- <u>R</u> NA
Tt	<u>T</u> hermus <u>t</u> hermophilus (<u>T</u> . <u>t</u> hermophilus)
TTP	<u>T</u> hymintriphosphat
U	Einheit (<u>U</u> nit)
U/min.	Umdrehungen pro <u>M</u> inute
UTP	<u>U</u> raciltriphosphat
UV	<u>U</u> ltraviolett
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
w/v	Molekulargewicht pro Volumen (<u>W</u> eight per <u>v</u> olume)

3. Einleitung

3.1 Vorkommen und Funktion von Ribosomen

Ribosomen sind als einzige Zellorganelle ubiquitär in Lebewesen vorhanden. Als essentieller Bestandteil der Proteinbiosynthese nehmen sie eine zentrale Rolle hinsichtlich Struktur, Funktion und Wachstum von Zellen ein. Ribosomen sind Ribozyme, die die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren katalysieren. Sie stellen dadurch die Grundlage für die Entwicklung von Zellen und komplexen Organismen und somit generell für irdisches Leben dar.

Eukaryonten besitzen im Zytoplasma freie und membrangebundene Ribosomen, wobei letztere mit der Membran des endoplasmatischen Reticulums verbunden sind. Zusätzlich haben sie in ihren Mitochondrien bzw. Chloroplasten eigene, spezialisierte Ribosomen, deren Struktur und makromolekulare Zusammensetzung den prokaryontischen Ribosomen ähneln.

3.2 Biochemische Zusammensetzung von Ribosomen

Sämtliche Ribosomen bestehen aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, die durch Interaktion mit mRNA erst zum translationsaktiven Ribosom assoziieren. Dieses übersetzt unter Einbeziehung aminoacylierter tRNA die genetische Information der mRNA in Proteine. Dabei katalysiert die große Untereinheit aufgrund ihrer Peptidyltransferaseaktivität die Ausbildung der Peptidbindung, während die kleine Untereinheit für die korrekte Erkennung der mRNA, d. h. die Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA, verantwortlich ist.

Die beiden Untereinheiten bestehen aus rRNA und ribosomalen Proteinen, durch deren strukturegebende Funktion die Stabilität der Untereinheiten gewährleistet wird. Aufgrund der Vielfalt der ribosomalen Bestandteile sind alle drei eukaryontischen RNA-Polymerasen in die Ribosomenbiogenese involviert. Die rRNA als wichtigste Komponente ist neben der Katalyse der Peptidbindungen an der Dekodierung der mRNA und der Translokation der mRNA bzw. der tRNA beteiligt.

Prokaryonten besitzen eine 30S bzw. 50S Untereinheit, die zusammen das 70S Ribosom bilden, Eukaryonten entsprechend eine 40S und 60S Untereinheit, die zum 80S Ribosom assoziieren. Die Nomenklatur ist abgeleitet von der Größe der Partikel, die durch deren Sedimentationsverhalten charakterisiert und in Svedberg-Einheiten (S) angegeben wird. Durch Zentrifugation eines Bakterienextrakts über einen Sucrosegradienten bei niedrigen

Mg^{2+} -Konzentrationen (ca. 1 mM) werden die beiden Untereinheiten getrennt und sedimentieren im Schwerfeld der Ultrazentrifuge. Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (ca. 5 mM) assoziieren die Untereinheiten zum prokaryontischen 70S Ribosom (Knippers, 2001).

Eine Bakterienzelle des Prokaryonten *Escherichia coli* (*E. coli*) weist unter optimalen Lebensbedingungen mehr als 20.000 Ribosomen auf, was in etwa einem Viertel ihrer Trockenmasse entspricht. Exemplarisch wird hier die Zusammensetzung eines Ribosoms dargestellt, einem 21 nm großen Partikel (Schuwirth et al., 2005):

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Ribosoms bzw. der ribosomalen Untereinheiten von *E. coli*.

(Darge, 2004; Lodish et al., 2003; Knippers, 2001)

	Ribosom	kleine Untereinheit	große Untereinheit
Molekulargewichte in kDa	2520	930	1590
Sedimentationskoeffizienten	70S	30S	50S
Proteine	55	21	34
Sedimentationskoeffizienten der rRNAs		16S	23S und 5S
Anzahl der Nukleotide der rRNAs	4566	1542	2904 und 120

Schematisch lässt sich die Zusammensetzung des 70S Ribosoms folgendermaßen darstellen:

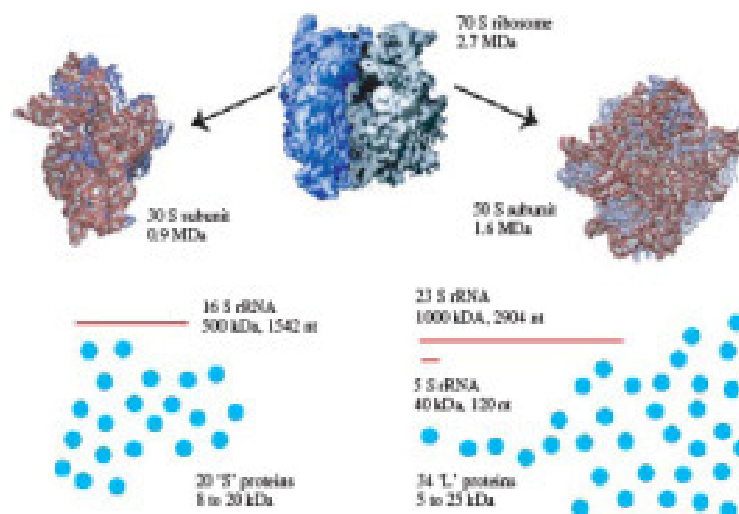


Abbildung 3.1: Komponenten des 70S Ribosoms.

(Williamson, 2005)

Die Nomenklatur sowohl der prokaryontischen als auch der eukaryontischen ribosomalen Proteine (RPs) erfolgt analog. So werden bei den Prokaryonten die RPs der kleinen ribosomalen Untereinheit als S1 bis S21 (S für small) bezeichnet, die der großen als L1 bis L36 (L für large). Mit Ausnahme des dimeren Proteinkomplexes L7/L12, der doppelt vorhanden ist, weisen die beiden Untereinheiten jeweils ein Exemplar der Proteine auf.

Die größere Komplexität eukaryontischer Ribosomen ist auf die höhere Anzahl der Nukleotide ihrer rRNAs und im Laufe der Evolution neu dazugekommene ribosomale Proteine zurückzuführen, was sich auch in ihrem höheren Molekulargewicht ausdrückt.

Tabelle 3.2: **Zusammensetzung des Ribosoms bzw. der ribosomalen Untereinheiten von Eukaryonten.**
(Darge, 2004; Lodish et al., 2003)

	Ribosom	kleine Untereinheit	große Untereinheit
Molekulargewichte in kDa	4220	1400	2820
Sedimentationskoeffizienten	80S	40S	60S
Proteine	82	33	49
Sedimentationskoeffizienten der rRNAs		18S	28S, 5.8S und 5S
Anzahl der Nukleotide der rRNAs	6872	1874	4718, 160 und 120

Eukaryonten besitzen 82 ribosomale Proteine im Gegensatz zu 55 bei *E. coli*. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die meisten prokaryontischen Proteine Homologe unter den Eukaryonten besitzen. Beachtet werden muss dabei, dass die Nomenklatur dieser Homologen nicht zwingend einheitlich ist, z. B. entspricht das prokaryontische RPS9 dem eukaryontischen RPS16.

Auch die eukaryontische rRNA ist komplexer. Dafür sorgt nicht nur die höhere Anzahl der Nukleotide, sondern auch die zusätzliche 5.8S rRNA, die in der großen Untereinheit der Eukaryonten in einem basengepaarten Komplex mit der 28S rRNA vorliegt und sequenzhomolog zum 5'-Ende der prokaryontischen 23S rRNA ist.

Generell lässt sich festhalten, dass die Architektur der Ribosomen im Laufe der Evolution konserviert geblieben ist. Ähnlichkeiten im Gesamtaufbau der ribosomalen Untereinheiten sind offensichtlicher als deren Unterschiede. Offensichtlich ist das Ribosom von der Natur nur einmal erfunden worden und dann in der Evolution den Anforderungen entsprechend weiterentwickelt worden.

3.3 Dreidimensionale Struktur prokaryontischer Ribosomen in atomarer Auflösung

Für das Verständnis der Vorgänge während der Translation ist die Aufklärung der dreidimensionalen Ribosomenstruktur essentiell. Bisher konnte mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur von kristallisierten Untereinheiten bzw. kompletten prokaryontischen Ribosomen beschrieben werden.

Im Jahre 2000 gelang erstmals die Darstellung der dreidimensionalen Struktur der großen 50S Untereinheit von *Haloarcula marismortui* mit einer Auflösung von 2.4 Å (Ban et al., 2000), ebenso wie die der 30S Untereinheit von *Thermus thermophilus* (Wimberly et al., 2000; Schlutzen et al., 2000). Da die rRNA in diesen Fällen dargestellt werden konnte, ließen sich neue sekundäre und tertiäre RNA-Struktur motive ermitteln. 2001 folgte dann die Ermittlung der Kristallstruktur des vollständigen 70S Ribosoms von *T. thermophilus* mit gebundener mRNA und tRNA bei einer Auflösung von 5.5 Å (Yusupov et al., 2001). Dabei gelang es den Autoren, die 16S, 23S und 5S rRNA-Moleküle, die tRNAs in A-, P- und E-Stellung sowie fast alle ribosomalen Proteine in die Elektronendichteverteilung einzupassen.

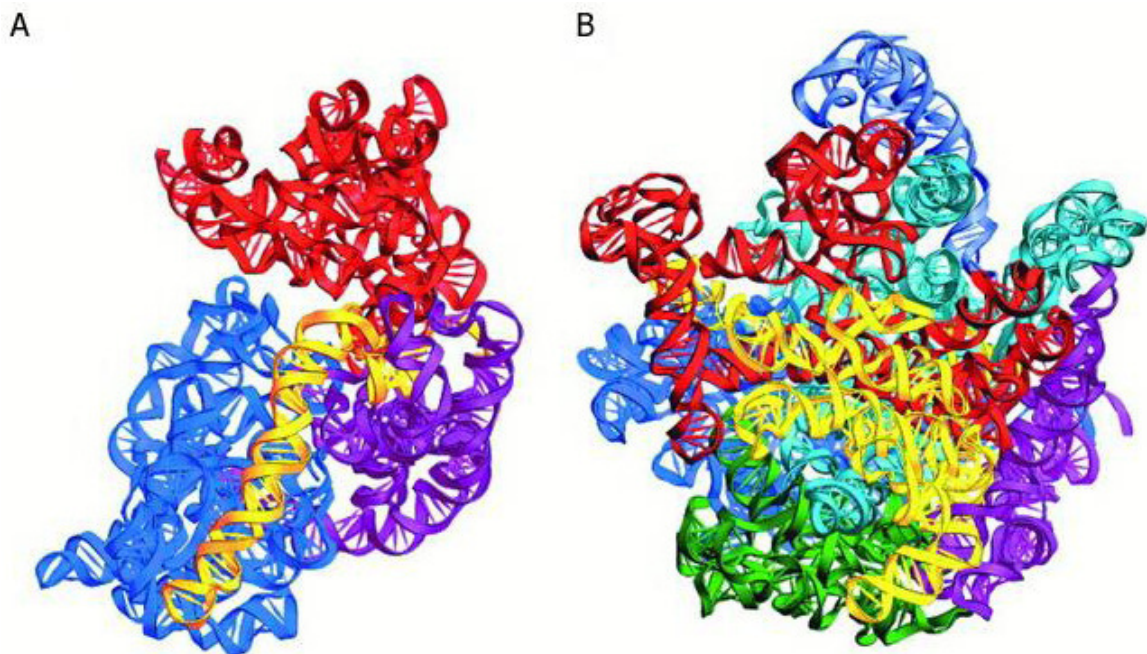


Abbildung 3.2: **Sekundär- und Tertiärstruktur der rRNA von prokaryontischen ribosomalen Untereinheiten.**

(Yusupov et al., 2001)

Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur von (a) der 16S rRNA und (b) der 23S und 5S rRNA von *T. thermophilus*. Abgebildet sind nur die rRNAs, der Übersichtlichkeit wegen wurde auf die ribosomalen Proteine verzichtet. Die 5S rRNA ist in magenta an der Spitze der 23S rRNA lokalisiert.

Auf die Darstellung der ribosomalen Proteine wurde in Abbildung 3.2 verzichtet. Die meisten RPs lokalisieren entweder an der Peripherie der ribosomalen Untereinheiten oder an der Grenzfläche zwischen großer und kleiner Untereinheit; an den verschiedenen tRNA-Bindungsstellen finden sich nur wenige (Yusupov et al., 2001). Diese Tatsache stützt die weit verbreitete Ansicht, dass für die Funktion der Ribosomen hauptsächlich die rRNA verantwortlich ist, die RPs in erster Linie die dreidimensionale Struktur stabilisieren. Dies wird auch anhand der nächsten Abbildung verdeutlicht, in der die Bindungsstellen der ribosomalen Proteine mit der rRNA der 30S Untereinheit von *T. thermophilus* dargestellt sind, basierend auf einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3.05 Å:

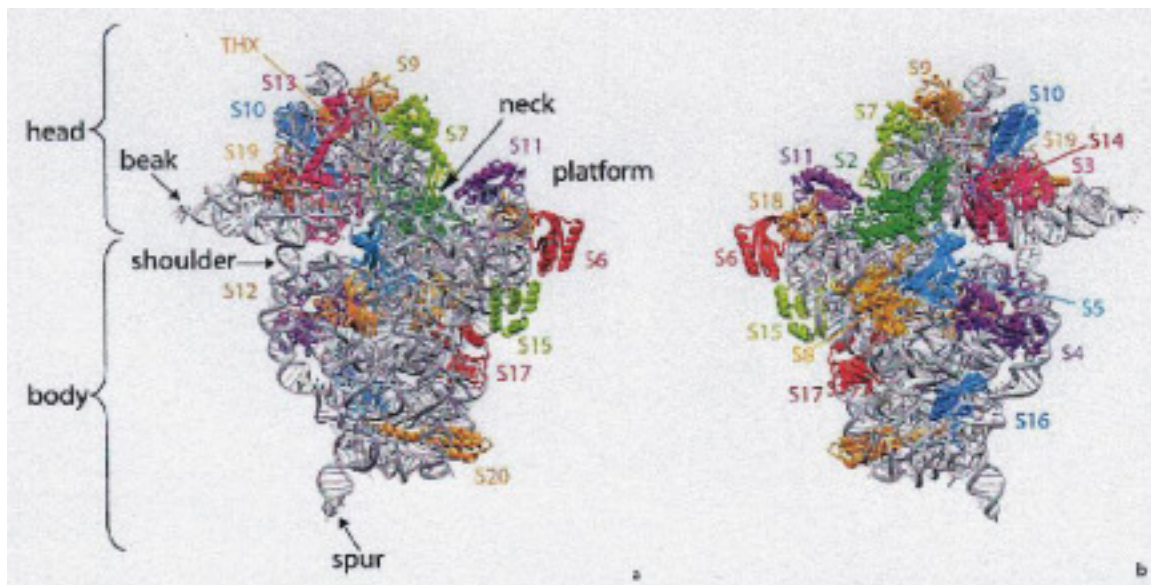


Abbildung 3.3: **Verteilung der ribosomalen Proteine von *T. thermophilus* auf der kleinen 30S Untereinheit.**

(Brodersen et al., 2002)

Die 16S rRNA ist in grau, die ribosomalen Proteine in verschiedenen Farben dargestellt. In (a) ist die Frontalansicht (hier erfolgt die Interaktion mit der großen 50S Untereinheit), in (b) die Rückansicht zu sehen. In (a) sind die englischen Bezeichnungen morphologischer Besonderheiten aus früheren Elektronenmikroskoprekonstruktionen eingezeichnet.

Die meisten ribosomalen Proteine weisen mehrere rRNA-Bindungsstellen auf und stabilisieren so durch Quervernetzungen die Struktur des gesamten Ribosoms bzw. der Untereinheiten. Besonders eignen sich hierfür globuläre Domänen mit langen Polypeptidschwänzen, die kaum eine Sekundärstruktur ausbilden und die bei vielen RPs vorhanden sind. Kleinere RPs sind i. d. R. vollständig von rRNA umgeben, größere Proteine mit mehreren unabhängigen globulären Domänen finden sich eher in der Peripherie der Untereinheit. Erst kürzlich gelang auch die Aufklärung der Ribosomenstruktur von *E. coli*. In früheren Publikationen war bereits die Struktur der 30S bzw. 50S Untereinheit aufgeklärt worden

(Ogle und Ramakrishnan, 2005; Moore und Steitz, 2003), doch erst 2005 gelang die Darstellung der Struktur des kompletten 70S Ribosoms mit einer Auflösung von 3.5 Å (Schuwirth et al., 2005). Dabei wurden zwei Strukturen eines intakten 70S Ribosoms kristallisiert und analysiert. Erstaunlicherweise fanden sich zwischen beiden deutliche Konformationsunterschiede, die auf Bewegungen der mRNA und tRNA innerhalb des Ribosoms während der Translokation zurückgeführt werden (Savelsbergh et al., 2003; Zavialov et al., 2005). Auch im Vergleich zur isolierten großen 50S Untereinheit zeigte das komplette Ribosom Abweichungen in der Struktur des Peptidyltransferasezentrums, die wohl aufgrund der Dynamik während der raschen Knüpfung der Peptidbindung auftreten.

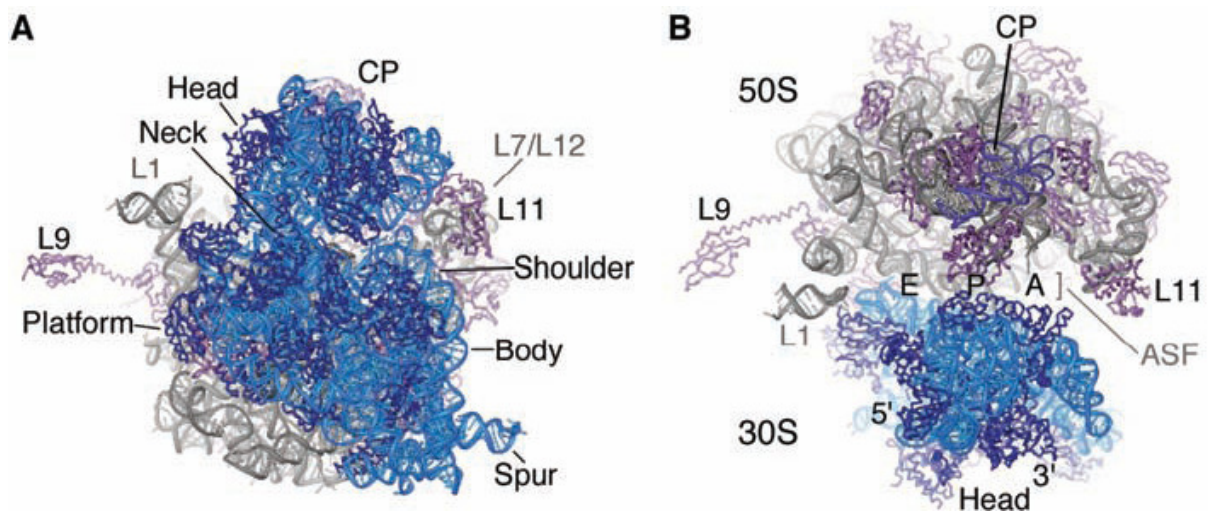


Abbildung 3.4: **Struktur des intakten 70S Ribosoms von *E. coli*.**

(Schuwirth et al., 2005)

(a) Ansicht von oben (30S Untereinheit oben, 50S unten); 16S rRNA bzw. Proteine der 30S Untereinheit sind hell- bzw. dunkelblau gefärbt; 23S rRNA bzw. Proteine der 50S Untereinheit sind in grau bzw. magenta dargestellt, 5S rRNA in violett. (b) gibt (a) nach einer Drehung der horizontalen Achse um 90° wieder. Die englischen Bezeichnungen morphologischer Besonderheiten aus früheren Elektronenmikroskoprekonstruktionen sind eingezeichnet.

Der Abbildung 3.4 kann man die morphologischen Besonderheiten der Untereinheiten entnehmen. Bei der 30S Untereinheit handelt es sich um Kopf (Head), Gerüst (Body), Schulter (Shoulder), Plattform (Platform) und Sporn (Spur), bei der großen 50S Untereinheit um den zentralen Höcker (CP, central protuberance) und die RNA-Helix des A-Seiten-Fingers (ASF). Beinahe alle rRNAs und ribosomalen Proteine sind in der Elektronendichteverteilung sichtbar.

3.4 Dreidimensionale Struktur eukaryontischer Ribosomen

Im Gegensatz zu prokaryontischen 70S Ribosomen konnten für Eukaryonten weder 40S bzw. 60S Untereinheiten rekonstituiert noch Kristalle generiert werden, was auf die höhere Komplexität und die größere strukturelle Flexibilität zurückzuführen ist.

Erste Erkenntnisse hinsichtlich der eukaryontischen Ribosomenstruktur konnten durch proteolytischen Verdau und chemische Quervernetzung extrahierter 40S bzw. 60S Untereinheiten aus Säugern gewonnen werden. So konnten ribosomale Oberflächenproteine identifiziert und zum Teil lokalisiert werden.

Allerdings konnten im Jahr 2004 mittels Cryoelektronenmikroskopie erste Strukturbilder des 80S Ribosoms von Hefe mit einer Auflösung von 11.7 Å gewonnen werden.

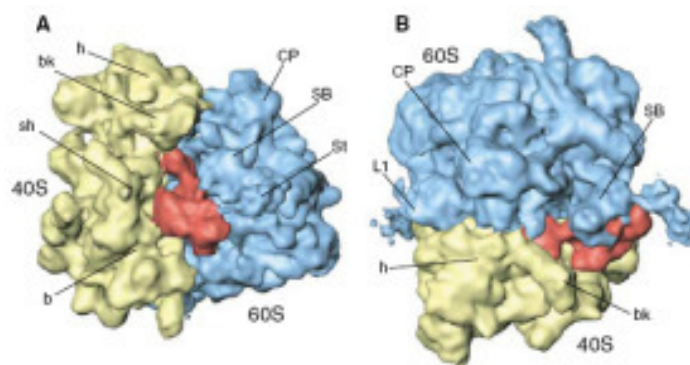


Abbildung 3.5: Elektronendichteverteilung des Hefe 80S-eEF2-Sordarin-Komplexes.

(Spahn et al., 2004)

Perspektive von (a) der Seite, (b) von oben mit einer Auflösung von 11.7 Å; die 40S Untereinheit ist in gelb, die 60S Untereinheit in blau und der Elongationsfaktor eEF2 in rot dargestellt. Die englischen Abkürzungen sind zu vernachlässigen.

Die Abbildung 3.5 dokumentiert eine hohe strukturelle Konservierung zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Ribosomen und stützt so die Hypothese, dass die Translationsmaschinerie, wie sie zu Beginn der Evolution geschaffen wurde, über alle Lebewesen hinweg konserviert wurde.

3.5 Ribosomenbiogenese

Die Expression ribosomaler Gene gilt als limitierender Faktor der Ribosomenbiogenese.

Da Prokaryonten keinen Zellkern besitzen, werden ihre rRNAs im Zytoplasma direkt aus der rDNA synthetisiert. Bei *E. coli* finden sich 7 rRNA-Gene, die auf 21 Abschnitte innerhalb des Genoms verteilt sind. Für die prokaryontische Transkription ist nur eine RNA Polymerase verantwortlich.

Aufgrund der räumlichen Trennung von Transkription und Translation in Eukaryonten ist dort die Ribosomenbiogenese wesentlich komplexer, was allerdings eine deutlich differenziertere Regulation ermöglicht. Dazu trägt auch die Verankerung der eukaryontischen DNA in variablen Chromatinstrukturen bei, die eine Deaktivierung der Gene ermöglicht. Zudem finden sich drei verschiedene RNA Polymerasen, die für die Transkription unterschiedlicher RNA-Spezies verantwortlich sind.

3.5.1 Expression von eukaryontischen ribosomalen Genen

Die rRNA-Gene von Säugetieren liegen in ca. 400 Kopien vor, von denen nur ein kleiner Teil zeitgleich transkribiert wird, da sie sich in einer euchromatischen Struktur befinden und die stillgelegten Gene eine heterochromatische nukleosomale Struktur aufweisen (Huang et al., 2006). Zwischen zehn und mehrere hundert aktive rRNA-Gene finden sich in stoffwechselaktiven Tieren, Pflanzen und Hefen (Raska et al., 2006).

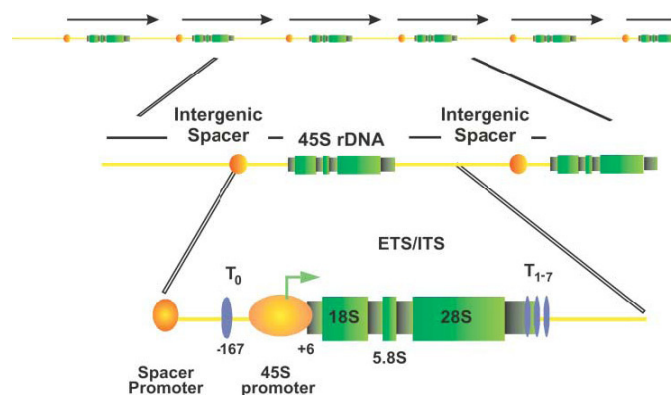


Abbildung 3.6: Anordnung der ribosomalen Gene bei Säugetieren.

(Huang et al., 2006)

Die Abbildung 3.6 zeigt, dass die Gene tandemartig in mehreren Wiederholungen mit gleicher Orientierung angeordnet sind. Sie verteilen sich über 6 bis 8 Chromosomen, wobei diese Regionen als Nukleolus-Organisationseinheiten (NORs) bezeichnet werden.

Die eukaryontischen 18S, 5.8S und 28S rRNAs entstehen durch Prozessierung einer 45S Vorläufer-rRNA (pre-rRNA). Diese wird von der RNA Polymerase I synthetisiert, die im

Nukleolus lokalisiert und nur für diese Synthese zuständig ist. Die 5S rRNA dagegen wird von der RNA Polymerase III hergestellt. Ihre Expressionsrate ist höher als die der anderen rRNAs, weil sie nicht nur Bestandteil des Ribosoms ist, sondern weitere Funktionen inne hat.

Die Syntheserate der rRNAs kann bis zu 80% der kompletten RNA-Syntheserate einer Säugerzelle betragen (Huang et al., 2006).

Die Produktion der ribosomalen Proteine erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei allen Proteinen. Nach Transkription der entsprechenden Gene im Zellkern muss die mRNA im Zytoplasma an den Ribosomen translatiert, das Protein aktiv in den Zellkern importiert und zum Nukleolus dirigiert werden, wo die Interaktion mit der rRNA stattfinden kann. Bis auf seltene Ausnahmen, bei denen zwei Gene für ein RP kodieren können, existiert i. d. R. ein Gen für ein RP. Einige RPs besitzen keine Introns und unterliegen somit keinem Spleißvorgang.

3.5.2 Struktur und Funktion der Nukleoli

Die Ribosomenbiogenese beginnt an den Nukleoli, die im Nukleoplasma eukaryontischer Zellen lokalisiert sind und dort klar differenziert werden können:

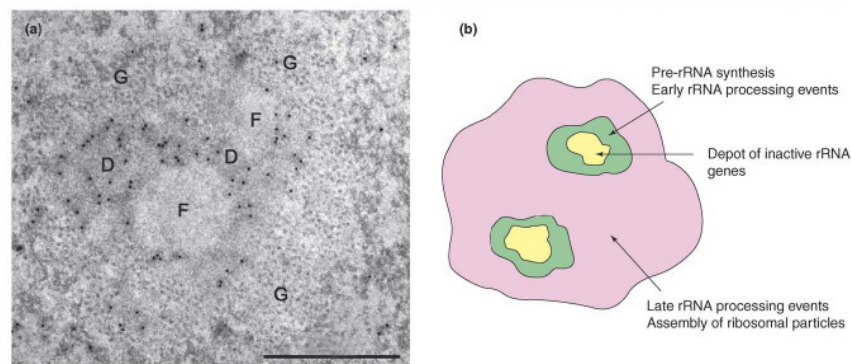


Abbildung 3.7: **Nukleolusstruktur.**

(Raska et al., 2006)

(a) Elektronenmikroskopische Aufnahme der nukleolaren Transkription in HeLa-Zellen. Der angegebene Maßstab rechts unten entspricht 0,25 µm. (b) Schematische Darstellung der nukleolaren Struktur; gelb entspricht dem fibrillaren Zentrum (F), grün der dichten fibrillaren Komponente (D) und pink der granularen Komponente (G).

Die Abbildung 3.7 (a) zeigt die Struktur eines Nukleolus aus einer HeLa-Zelle, in dem die drei typischen Subkompartimente: das fibrillare Zentrum (F), die dichte fibrillare Komponente (D) und die granuläre Komponente (G) erkennbar sind.

In (b) ist schematisch dargestellt, welche Funktionen die nukleolaren Regionen erfüllen. Im fibrillaren Zentrum befindet sich das Depot für inaktive rRNA-Gene, die dichte fibrilla-

re Komponente ist für die Synthese und frühe Prozessierung der Vorläufer-rRNAs zuständig. In der granularen Komponente erfolgen späte Prozessierungsschritte und die Assemblierung der ribosomalen Vorläuferpartikel.

Der Nukleolus erscheint als eigenständige Struktur aufgrund der Interaktion von rDNA und Proteinen, die ein mehr oder weniger stabiles Zentrum bilden, an welchem die komplexen nukleolaren Interaktionen und dynamischen Prozesse ablaufen. Die umgebenden nukleoplasmatischen Komponenten stehen in kontinuierlichem Austausch mit diesem Komplex. Daher ist die Lokalisation typischer nukleolarer Komponenten sehr variabel und wird beeinflusst durch Zellzyklus, -differenzierung, -wachstum, etc. Auch nicht-nukleolare Proteine oder Makromolekularkomplexe konnten in Nukleoli nachgewiesen werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Nukleoli weitere Funktionen ausüben, wie z. B. Virusinfektionskontrolle, Reifung nicht-nukleolarer RNAs oder RNPs, Regulation des Zellzyklus und der Telomeraseaktivität, etc. Am besten beschrieben ist die Assemblierung des Signalerkennungspartikels, der als RNA-Protein-Komplex Sekretions- und Membranproteine nach deren Translation zum endoplasmatischen Reticulum dirigiert (Pederson, 1998).

Weitere Studien belegen, dass Proteine sowohl im nuklearen als auch im nukleolaren Raum frei herumdifundieren (Handwerger et al., 2004) und die mittlere Verweildauer der meisten typischen nukleolaren Proteine in den Nukleoli nur einige Zehntelsekunden beträgt.

Wichtig ist die Feststellung, dass nukleolare Proteine nicht aufgrund eines nukleolaren Lokalisationssignals, sondern wegen funktioneller Interaktion mit bereits in Nukleoli vorhandenen Makromolekülen in den Nukleoli akkumulieren. Kürzlich konnte erstmals ein GTP-abhängiger Zyklus beschrieben werden, der die Retention des nukleolaren Proteins Nukleostemin in den Nukleoli bewirkt (Tsai und McKay, 2005).

Bislang wurde für die Organisation und Aufrechterhaltung der typischen nukleolaren Struktur die Transkription der rRNA-Gene durch die Polymerase I verantwortlich gemacht, wobei die Gene als Art Kondensationskeime betrachtet wurden (Scheer und Hock, 1999). Neuere Studien an Oozyten von *Xenopus* lassen aber darauf schließen, dass auch ohne transkriptionelle Aktivität der Polymerase I die Struktur durch die Aktivität spezifischer intrinsischer Proteine erhalten bleibt (Gonda et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Nukleolus ein dynamisches, sich selbst organisierendes System darstellt, das sich im ständigen Austausch mit dem umgebenden Nukleoplasma befindet und seine Morphologie entsprechend externer Einflüsse rasch und dramatisch anpassen kann.

3.5.3 Biogenese der ribosomalen Untereinheiten in Eukaryonten

Struktur und Funktion der reifen zytoplasmatischen Ribosomen sind mittlerweile gut erforscht, Kenntnisse über die Assemblierung und Prozessierung der ribosomalen Komponenten werden erst langsam erweitert.

Grob lässt sich die Ribosomenbiogenese in folgende Schritte unterteilen (Shaw und Jordan, 1995):

- Transkription der rRNA-Gene in den Nukleoli
- Posttranskriptionelle Prozessierung bzw. Modifizierung der Vorläufer-rRNAs zu reifen rRNAs
- Nukleolarer Transport der 5S rRNA
- Import der snoRNAs und der assoziierten Proteine
- Import ribosomaler Proteine und sequenzielle Addition an die rRNA der preribosomalen Zwischenstufen
- Export der preribosomalen 40S und 60S Untereinheiten durch den Kernporenkomplex ins Zytoplasma

Dabei wird die kontinuierliche Synthese der Untereinheiten durch die Bereitstellung von äquimolaren Mengen an rRNAs und ribosomalen Proteinen gewährleistet. Voraussetzung dafür ist die koordinierte Regulation auf verschiedenen Ebenen der Transkription, Translation und des nukleozytoplasmatischen Transports der Komponenten. Für ribosomale Proteine konnte gezeigt werden, dass diese bei Inhibierung der proteasomabhängigen Protein-degradation stark im Nukleoplasma akkumulieren. Das deutet darauf hin, dass RPs zunächst im Überschuss synthetisiert und sehr schnell in Zellkern und Nukleolus importiert werden. Dort können sie entweder in die entsprechenden Vorläuferpartikel eingebaut werden, oder sie werden ubiquitinyliert und im Nukleoplasma durch Proteasomen degradiert (Andersen et al., 2005).

Das folgende Modell gibt einen Überblick über die Vorgänge während Prozessierung und Export der ribosomalen 40S und 60S Untereinheiten:

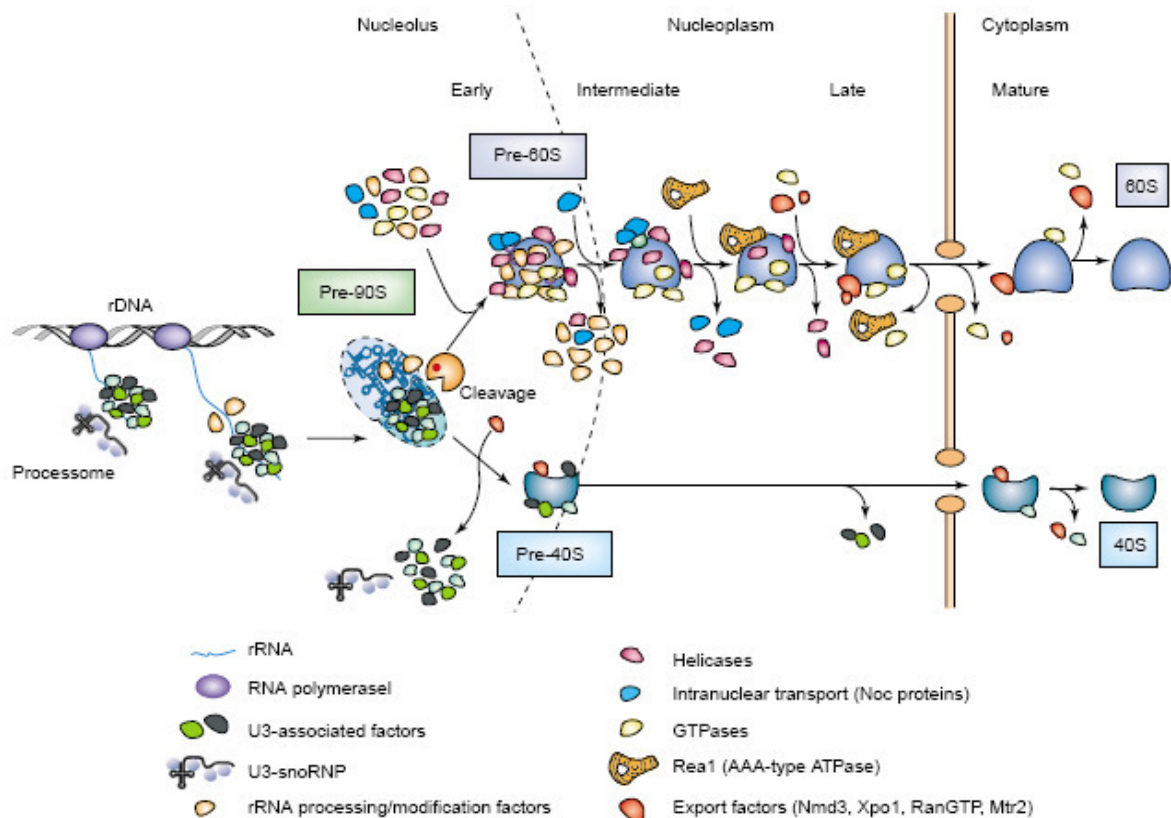


Abbildung 3.8: **Prozessierung und Export der ribosomalen 40S und 60S Untereinheiten.**

(Tschochner und Hurt, 2003)

Eukaryonten besitzen neben den konservierten rRNAs und RPs auch konservierte nicht-ribosomale Faktoren, die während der Biogenese vorübergehend mit den Vorläufern interagieren. Dabei handelt es sich um zahlreiche kleine nukleolare Ribonukleoproteinpartikel (snoRNPs) und nicht-ribosomale Enzyme, wie z. B. Endo- und Exonukleasen, Pseudouridinsynthasen oder Methyltransferasen, die für die Prozessierung der Vorläufer-rRNAs verantwortlich sind. Des weiteren unterstützen RNA-Helikasen oder RNA-Chaperone die Faltung bzw. den Umbau der RNPs. GTPasen bzw. AAA-ATPasen erleichtern die Proteinassoziation bzw. -dissoziation (Kressler et al., 1999; Brown, 2001).

Am Beginn der Ribosomenbiogenese steht die Transkription der rDNA und die Synthese der ribosomalen Proteine. Letztere werden wie die mRNAs im Nukleoplasma von der Polymerase II transkribiert und im Zytoplasma synthetisiert. Die Polymerase I produziert im Nukleolus eine 45S pre-rRNA, aus der später 28S bzw. 25S, 5.8S und 18S rRNAs entstehen. Die Polymerase III hingegen synthetisiert die 5S rRNA im Nukleoplasma.

3.5.3.1 Prozessierung der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit in der Hefe

Die Bindung der U3 snoRNP und assoziierter Proteine an den pre-90S-Partikel ist notwendig für dessen Spaltung und die Assemblierung der 40S Untereinheit (Venema und Tollervey, 1999). Dadurch wird die Separation der Prozessierung von 40S und 60S Untereinheit eingeleitet.

Bereits ein Großteil der Assemblierungsfaktoren der 40S Untereinheit findet sich im pre-90S-Partikel, doch werden die meisten nicht-ribosomalen Faktoren nach der Spaltung aus der Bindung entlassen, so dass ein ziemlich elementarer pre-40S-Partikel zurückbleibt. Die wenigen verbleibenden bzw. während der Passage des Nukleoplasmas neu assoziierenden Faktoren sind für die Reifung der 40S Untereinheit erforderlich. Darunter findet sich z. B. eine Methyltransferase, aber keine GTPasen und ATPasen wie bei der 60S Untereinheit.

3.5.3.2 Prozessierung der großen ribosomalen 60S Untereinheit in der Hefe

Im Gegensatz zur 40S Untereinheit werden die meisten Komponenten für die Prozessierung der 60S Untereinheit erst nach der Spaltung des pre-90S-Partikels an die entstandene 27S rRNA angelagert.

Alle bisher isolierten 60S Vorläuferpartikel in unterschiedlichen Prozessierungsstadien weisen neben den pre-rRNAs und dem Hauptanteil der ribosomalen Proteine bis zu 26 nicht-ribosomale Prozessierungsfaktoren auf. Diese übernehmen vielfältige Aufgaben, z. B. Modifikationen in den pre-rRNAs und nukleozytoplasmatischen Transport. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass zu Beginn ca. 50 nicht-ribosomale Proteine mit dem frühesten pre-60S-Partikel assoziiert sind, von denen aber nur etwa fünf an der gereiften 60S Untereinheit im Zytoplasma nachgewiesen werden können (Nissan et al., 2002).

3.5.3.3 Export und Assoziation der ribosomalen Untereinheiten

Aufgrund der räumlichen Trennung der Ribosomenbiogenese und dem Ort ihrer katalytischen Funktion müssen die Vorläufer der ribosomalen Untereinheiten von den nukleolaren Kompartimenten ins Nukleoplasma und von dort über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma transportiert werden. Ob dabei aktive Transportsignale oder Retentionssignale verwendet werden oder ob eine Qualitätskontrolle während der Prozessierung erfolgt, wird momentan spekuliert.

Allerdings konnte belegt werden, dass für den Export durch den Kernporenkomplex Interaktionen mit Nukleoporinen, Karyopherinen und Faktoren des RanGTP/GDP-Zyklus benötigt werden (Moy und Silver, 2002). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Inak-

tivierung des Proteins CRM1, einem Exportrezeptor für leucinreiche Kernexportsignale, in HeLa-Zellen der Export sowohl der pre-40S als auch der pre-60S Untereinheit unterbunden wurde. Dabei bleibt offen, ob CRM1 für den Export der Vorläuferpartikel direkt mit diesen interagiert oder weitere Adapterproteine eine Rolle spielen (Thomas und Kutay, 2003).

Die letzten Modifikationen an den Vorläufern der 40S und 60S Untereinheiten erfolgen im Zytoplasma, woraufhin die reifen Untereinheiten zusammen mit mRNA zum translationsaktiven 80S Ribosom assoziieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die ribosomalen Vorläuferpartikel während ihrer Reifung einer ständigen Änderung in ihrer Zusammensetzung unterliegen und die Synthese der 40S bzw. 60S Untereinheit nach Spaltung des pre-90S Partikels unabhängig voneinander verläuft (Liang und Fournier, 1997). Auch scheinen die diversen an der Prozessierung beteiligten Faktoren spezialisiert auf die jeweilige Untereinheit zu sein und nur dort funktionell aktiv zu sein.

3.5.3.4 Anlagerung der ribosomalen Proteine

Ribosomale Proteine werden im Zytoplasma synthetisiert und aktiv in den Zellkern importiert, wo sie sich sequenziell auf verschiedenen Stufen der Biogenese an die jeweiligen Vorläufer der ribosomalen Untereinheiten anlagern. Dies ermöglicht eine Einteilung in primäre, sekundäre und tertiäre RPs. Da in dieser Dissertation nur Proteine der kleinen 30S bzw. 40S Untereinheit untersucht wurden, wird im folgenden nur deren Bindungsverhalten dargestellt (Mizushima und Nomura, 1970; Held et al., 1974).

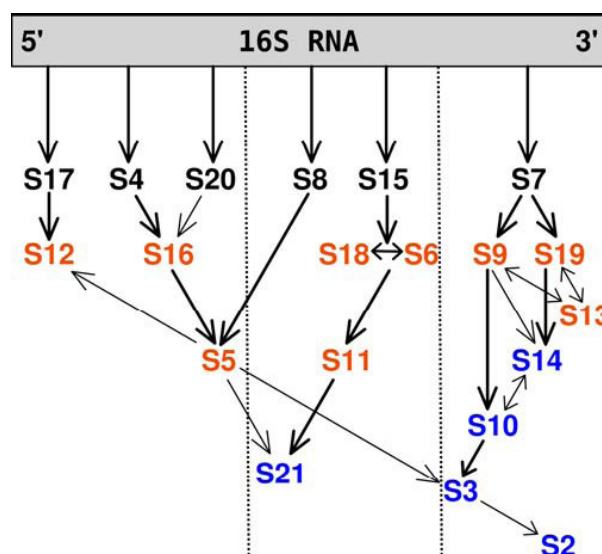


Abbildung 3.9: Assemblierungsschema der ribosomalen Proteine in der 30S Untereinheit von *E. coli*.

(Hamacher et al., 2006)

Primäre Bindungspartner sind schwarz, sekundäre orange und tertiäre blau gefärbt.

Abbildung 3.9 zeigt schematisch das Bindungsverhalten der RPs der kleinen 30S Untereinheit von *E. coli*, wie es *in vitro* experimentell ermittelt werden konnte. Die Pfeile geben an, welche RPs sich in ihrer Affinität zur 16S rRNA gegenseitig beeinflussen. Die Einteilung der RPs erfolgte je nachdem, ob sie alleine binden konnten (primär) oder nur in Anwesenheit bereits gebundener RPs. Theoretische Modellanalysen zeigen, dass die Anlagerung der RPs von *T. thermophilus* sehr ähnlich verläuft (Hamacher et al., 2006).

Die in dieser Arbeit genauer analysierten RPs S9 bzw. S18 werden in diesem Schema als sekundäre Bindungspartner klassifiziert, d. h. sie benötigen für ihre Bindung an die pre-16S-rRNA das Vorhandensein der Proteine S7 bzw. S15.

Für das humane RPS16 konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit drei weiteren RPs die stärkste Bindung an die 18S rRNA der kleinen 40S Untereinheit aufweist (Malygin et al., 2000), was auf einen primären oder zumindest sekundären Bindungspartner schließen lässt.

3.6 Nukleozytoplasmatischer Transport

Aufgrund der Kompartimentierung eukaryontischer Zellen muss ein Austausch zwischen den zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Kompartimenten ermöglicht werden. Dafür ist der Kernporenkomplex (NPC) zuständig, der in der Lipiddoppelschicht der Kernmembran verankert ist.

3.6.1 Der Kernporenkomplex (NPC)

Der NPC ermöglicht den bidirektionalen Transport von Ionen, kleinen Molekülen, Proteinen, RNAs und RNPs zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma während der Interphase des Zellzyklus. Der NPC von Vertebraten weist eine Masse von ca. 120 MDa auf und stellt die einzige Möglichkeit des zytoplasmatischen Transports dar. Sein Außendurchmesser beträgt etwa 120 nm, seine Höhe 90 nm. Seine engste Stelle liegt in der mittleren Ebene und ist ca. 40 nm breit. Die Kernporendichte variiert innerhalb der verschiedenen Zelltypen von 2 bis 60 NPCs/ μm^2 (Gerace und Burke, 1988).

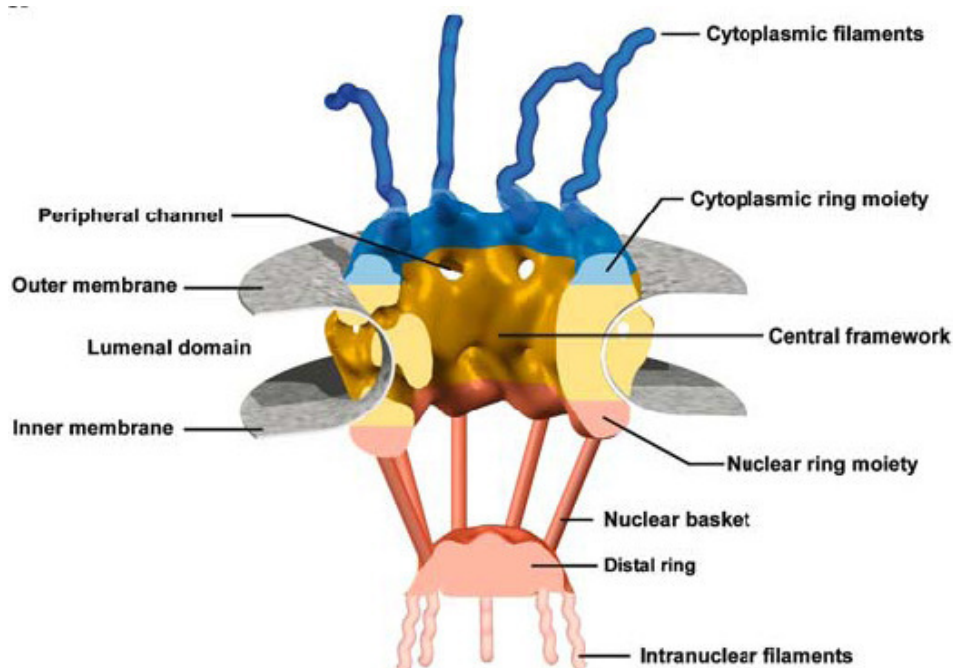


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes.

(Lim et al., 2006)

In Abbildung 3.10 sieht man, dass das Grundgerüst des NPC aus zwei zueinander coaxial angeordneten Ringen besteht, die radial durch acht Speichen miteinander verbunden sind. Der etwa 55 MDa große zentrale Speichenkomplex setzt sich aus einer luminalen, einer zentralen und einer inneren Speichendomäne zusammen. Innerhalb dieses Speichenkomplexes verläuft ein wässriger Kanal, durch den die Transportsubstrate ins jeweils andere

Kompartiment gelangen. Dieser weist einen Durchmesser von ca. 9 nm und eine Länge von ca. 15 nm auf, wodurch die passive Diffusion von Molekülen bis zu einer Masse von etwa 60 kDa ermöglicht wird. Der zytoplasmatische Ring mit einem Molekulargewicht von ca. 32 MDa ist mit acht in das Zytoplasma hineinragenden Fibrillen assoziiert. Vom nukleoplasmatischen Ring mit einer Masse von ca. 21 MDa erstrecken sich acht Fibrillen mit einer Länge von etwa 50 nm ins Nukleoplasma. Auf diesen befindet sich der distale Ring mit einem Durchmesser von 30 nm bis 50 nm, der eine korbähnliche Struktur bildet (Pante und Aebi, 1996).

Die Morphologie des distalen Rings variiert im Gegensatz zu den zytoplasmatischen Komponenten unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit von der Calcium-Ionenkonzentration (Stoffler et al., 1999). Der distale Ring wirkt wie eine blendenförmige Iris, die in Anwesenheit von Calcium-Ionen geöffnet, in deren Abwesenheit geschlossen vorliegt. Die calciumabhängige Konformationsänderung ist ATP-abhängig.

3.6.2 Die Nukleoporine des Kernporenkomplexes

Die etwa 30 Proteine des zentralen Gerüsts des NPC, die so genannten Nukleoporine (Nups), weisen eine achtfache Symmetrie auf, das heißt sie sind in jeweils 8 Kopien oder einem Vielfachen davon um den zentralen Kanal angeordnet (Lim und Fahrenkrog, 2006). Der Großteil der Nups ist symmetrisch verteilt auf zytoplasmatischer und nukleoplasmatischer Seite, nur ein kleiner Teil findet sich ausschließlich in einem der Kompartimente.

Etwa ein Drittel der Nukleoporine weist in der Primärstruktur als Besonderheit repetitive Motive bestehend aus den Aminosäuren Phenylalanin (F) und Glycin (G) auf. Diese so genannten FG-Wiederholungen vermitteln die Interaktion zwischen dem NPC und den löslichen Transportfaktoren, indem sie als Andockstellen für die nuklearen Transportrezeptoren und –effektoren fungieren.

Sehr kontrovers diskutiert wird das Vorhandensein eines zentralen Transporters im Innern der Kernpore. Dieser ist variabel hinsichtlich Volumen und Form und nimmt verschiedene Positionen an der zytoplasmatischen bzw. nukleoplasmatischen Peripherie des NPC ein (Beck et al., 2004). Bis jetzt konnte nicht vollständig geklärt werden, ob es sich dabei um eine zum NPC gehörende Barriere oder um Moleküle während des Transports handelt, wobei aktuellere Studien letzteres zu belegen scheinen.

Kinetische Analysen deuten darauf hin, dass ein einziger NPC pro Sekunde die Translokation von 10 MDa bis 20 MDa an Makromolekülen ermöglicht (Ribbeck und Gorlich, 2001).

3.6.3 Mechanismen des aktiven nukleozytoplasmatischen Transports

Die gängige Literatur zum nukleozytoplasmatischen Transport beschreibt, dass Moleküle bis zu einer Ausschlussgröße von 40 kDa bis 60 kDa passiv vom Zytoplasma durch den Kernporenkomplex ins Nukleoplasma und in umgekehrter Richtung diffundieren können (Poon und Jans, 2005), was in etwa einem Moleküldurchmesser von 10 nm entspricht. Der Transport von größeren Molekülen erfolgt energieabhängig und durch Interaktion mit löslichen Transportrezeptoren.

Da in dieser Arbeit der Kernimport im Mittelpunkt stand, wird auf den Kernexport nur am Rande eingegangen und der Import detailliert dargestellt.

Der bidirektionale Transport kann über viele Faktoren reguliert werden wie z. B. Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, etc. Am besten untersucht ist die posttranslationale Modifikation von Signalmolekülen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Zudem können die NLS bzw. NES durch intra- oder intermolekulare Maskierung an ihrer Interaktion mit den entsprechenden Transportrezeptoren gehindert und so ein Transport unterbunden werden.

3.6.3.1 Transportfaktoren

Die Transportfaktoren für den aktiven Transport durch den NPC lassen sich in die drei Kategorien Transportrezeptoren, Adaptermoleküle und Bestandteile des RanGTP/GDP-Zyklus einteilen.

Erstere gehören der Importin β -Superfamilie an, deren Mitglieder hoch konserviert und nach Importin β benannt sind, dem ersten beschriebenen Transportrezeptor. Je nach Transportrichtung spricht man von Importinen bzw. Exportinen.

Die Mitglieder der Importin β -Superfamilie weisen eine Masse von 90 kDa bis 130 kDa auf, ihr isoelektrischer Punkt (IEP) liegt durchschnittlich bei 5.1, ergo im sauren Bereich. An ihrem N-Terminus besitzen sie RanGTP-Bindungsmotive, die C-Termini sind sehr variabel und wahrscheinlich für die Erkennung der Transportsubstrate verantwortlich, bei denen es sich ausschließlich um Proteine mit NLS handelt. In höheren Eukaryonten wird davon ausgegangen, dass die Familie mehr als 20 verschiedene Transportrezeptoren umfasst (Kutay et al., 2000; Weis, 2003). Charakteristisch ist ihre Fähigkeit, die kleine GTPase Ran an die FG-Wiederholungen der Nukleopore und spezifische Transportsubstrate zu binden.

Die Struktur der Mitglieder der Importin β -Superfamilie weist charakteristische Superhelices mit 18 bis 20 so genannten HEAT-Wiederholungen auf, die es den Transportrezeptoren

ermöglichen, abhängig von ihrem funktionellen Status verschiedene Konformationen einzunehmen. Jede HEAT-Wiederholung enthält zwei antiparallele α -Helices, die über eine Drehung miteinander verbunden sind. Die Wiederholungen formen zwei C-förmige Bögen, die wiederum zusammen ein helikoidales Molekül generieren. Die relative Orientierung dieser Struktur variiert je nach Bindungspartner. Dadurch wird eine hohe Variabilität und Flexibilität erreicht.

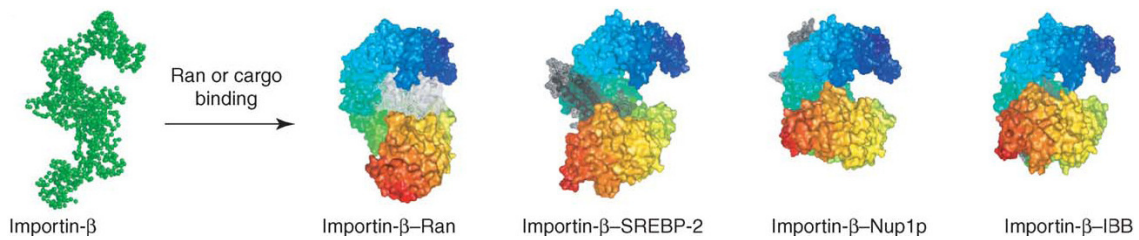


Abbildung 3.11: **Variabilität der Konformation von Importin β .**

(Conti et al., 2006)

Links ist das native Importin β dargestellt, rechts diverse Konformationen bei der Bindung an verschiedene Transportsubstrate.

Die in der Abbildung 3.11 dargestellte Flexibilität ermöglicht einerseits den Transport vieler verschiedener Substrate, andererseits wird so die Disassemblierung der Transportkomplexe nach erfolgter Translokation ohne hohen Energieaufwand sicher gestellt.

Einige Transportrezeptoren binden direkt an ihre Transportsubstrate, andere benötigen Adaptermoleküle für die Interaktion (Madrid und Weis, 2006), wie z. B. Importin α oder Snurportin, die die Interaktion mit bestimmten Transportsubstraten verstärken oder erst ermöglichen. Die Interaktion zwischen Transportrezeptor bzw. Adaptermolekül und dem Substrat wird durch RanGTP reguliert.

3.6.3.2 Der klassische Importmechanismus

Bisher konnten mehrere Transportwege für verschiedene Klassen von Transportsubstraten beschrieben werden (Nigg, 1997):

- Beim klassischen Weg sind Importin α und Importin β am Import von NLS-Proteinen beteiligt, wobei der Rücktransport von Importin α über den Exportfaktor CAS erfolgt.
- Transportin bewirkt den Import von hnRNP mit glycinreichen M9-Domänen (Pollard et al., 1996).
- Exportin 1 exportiert Proteine mit leucinreichen NES (Fukuda et al., 1997).
- Exportin t bewirkt den Transport von tRNA (Arts et al., 1998).

- Das Heterodimer TAP/p15 ist am Export von mRNA beteiligt (Rodriguez et al., 2004).
- Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass es auch Importmechanismen ohne rezeptorvermittelte Interaktion gibt, z. B. scheinen STAT-Proteine als Importsubstrate direkt mit den Nukleoporinen zu interagieren (Marg et al., 2004).

Folgendes Schema zeigt den klassischen Importweg mittels Importin α /Importin β -Komplex, den nur durch Importin β bewirkten Import sowie einen Exportweg, vermittelt durch den Rezeptor EXP:

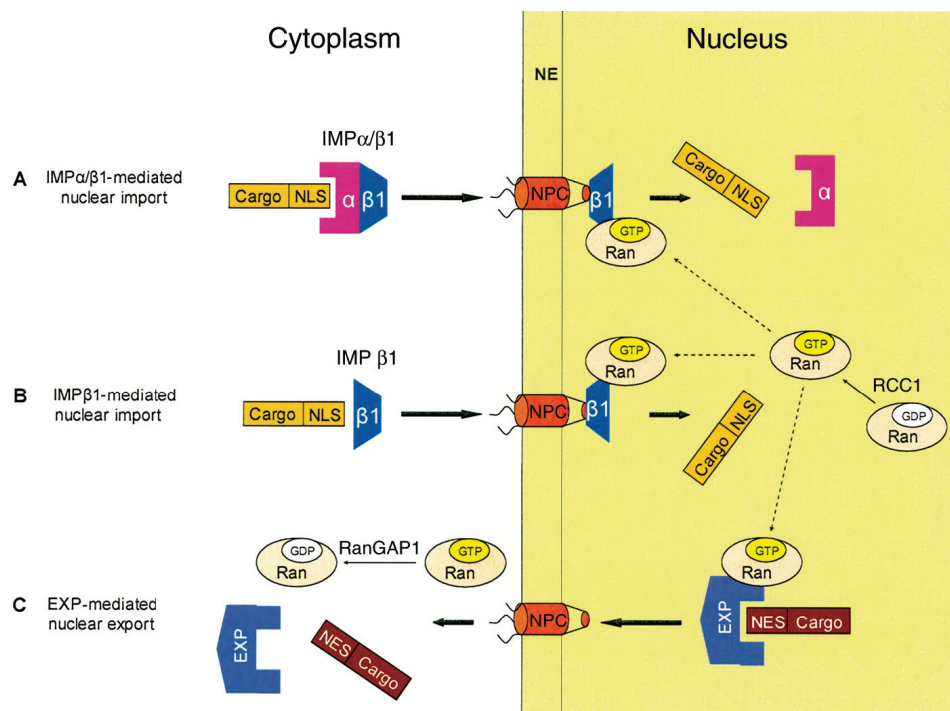


Abbildung 3.12: **Konventionelle Import- bzw. Exportwege.**

(Poon und Jans, 2005)

Schematisch dargestellt sind Import von Transportsubstraten mit NLS vermittelt durch (a) Interaktion mit dem zytosolischen heterodimerischen Importin α/β -Komplex (Imp=Importin), (b) durch Importin β allein sowie (c) Export durch Interaktion mit Exportinen (EXP).

Die dargestellte Translokation durch den NPC erfolgt über Interaktion mit den FG-Wiederholungen der Nukleoporine. Im folgenden wird genauer der in (a) skizzierte klassische Importmechanismus beschrieben.

Der heterodimerische Importin α/β -Komplex erkennt die diversen Kernlokalisationssignale der Importsubstrate. Importin α ist für deren Bindung zuständig und interagiert mittels der Importin β bindenden Domäne (IBB) mit der Importin β -Untereinheit. Der dadurch entste-

hende trimere Komplex bindet daraufhin über die Importin β -Untereinheit am distalen Ende der zytoplasmatischen NPC-Filamente.

Der Transport durch den NPC ist ein energieabhängiger Prozess und benötigt die durch Ran katalysierte Hydrolyse von GTP. Nach Translokation ins Nukleoplasma dissoziiert der trimere Importkomplex durch Bindung von RanGTP an die Importin β -Untereinheit. Diese Dissoziation ist der Schlüsselschritt im NLS-abhängigen Proteinimport. Da das an RanGTP gebundene Importin β eine geringere Affinität zu Importin α aufweist, wird die Reassemblierung von Transport- und Adaptermolekül auf nukleozytoplasmatischer Seite verhindert. So wird gewährleistet, dass Importin α durch den spezifischen Exportfaktor CAS separat aus dem Nukleus exportiert werden kann. Dieser weist zwei Bindungsstellen für RanGTP und Importin α auf. Durch RanGTP wird die Affinität von CAS zu Importin α um den Faktor 300 erhöht (Kutay et al., 1997).

Der trimere RanGTP/CAS/Importin α -Komplex wird ins Zytoplasma transportiert, wo RanBP1 an das Ran des trimeren Komplexes bindet. So ergibt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den beiden Komplexen RanBP1/RanGTP und CAS/Importin α . Allerdings wird aufgrund der GTP-Hydrolyse durch RanGAP1 eine irreversible Dissoziation der beiden Komplexe bewirkt. Da CAS ohne Bindung mit Ran eine weitaus geringere Affinität zu Importin α aufweist, wird dieses freigesetzt. CAS steht somit für den nächsten Transportzyklus zur Verfügung und kann energieunabhängig ohne Transportfaktoren in den Zellkern diffundieren.

Der Rücktransport von Importin β erfolgt gebunden an RanGTP. Im Zytoplasma dissoziiert dieser Komplex durch die Hydrolyse von GTP.

Die freien Transportfaktoren Importin α und Importin β können wieder interagieren und der Zyklus von neuem durchlaufen werden.

3.6.3.3 Der RanGTP-Zyklus

Die kleine GTPase Ran ist ein Mitglied der Ras-Superfamilie und in großen Mengen in eukaryontischen Zellen vorhanden. Sie gehört zu den am höchsten konservierten Proteinen. Ran bildet die Grundlage für den RanGTP/GDP-Zyklus, da es wie ein molekularer Schalter zwischen der GTP- und der GDP-gebundenen Form wechseln kann. Dieser Zyklus ist essentiell für den aktiven Transport von NLS-Proteinen durch den NPC.

Deren Import findet nur bei niedriger zytoplasmatischer RanGTP-Konzentration statt und wird im Nukleoplasma durch eine hohe Konzentration terminiert.

Durch die unterschiedliche Lokalisation der Ran-Regulatoren - RCC1 findet sich im Zellkern, RanGAP im Zytoplasma - wird der für den Kerntransport benötigte RanGTP/RanGDP-Konzentrationsgradient aufrechterhalten. Im Nukleoplasma wird Ran durch RCC1, das auch als RanGEF bezeichnet wird (Guanine exchange factor), in RanGTP umgewandelt, im Zytoplasma hingegen sorgt RanGAP1 für die Überführung in RanGDP. Erleichtert wird dies durch den zytoplasmatischen Faktor RanBP1.

Die asymmetrische Verteilung von RCC1, RanGAP1 und RanBP1 führt zu einem RanGTP-Gradienten entlang der Kernmembran mit niedriger RanGTP-Konzentration auf zytoplasmatischer und hoher auf nukleoplasmatischer Seite. Dieser Gradient ist für die Assoziation bzw. Dissoziation des Importin α/β -Komplexes verantwortlich.

3.6.3.4 Translokation durch den Kernporenkomplex

Eine aktuelle Studie deutet darauf hin, dass ein großer Teil der passiv diffundierenden Moleküle im Vergleich zu aktiv transportierten Substraten einen alternativen Weg durch den NPC beschreitet (Naim et al., 2007). Bereits 1992 postulierten Hinshaw et al., dass dabei Kanäle in der Peripherie des zentralen Kanals genutzt werden könnten, die diesen umschließen.

Auch bei der rezeptorvermittelten Translokation durch den NPC handelt es sich um einen energieunabhängigen, passiven Diffusionsprozess, bei dem den FG-Wiederholungen der Nups eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird (Ribbeck et al., 1999). Proteine ohne Bindungsmöglichkeit an diese Wiederholungen passieren den NPC durch einen Kanal von etwa 8 nm bis 10 nm (Keminer und Peters, 1999), FG-bindende Proteine können dagegen bis zu einem Durchmesser von 39 nm aktiv transportiert werden (Pante und Kann, 2002).

Zur Zeit werden unterschiedliche Modelle diskutiert, wie die Translokation durch den NPC erfolgt. Besonders im Fokus stehen die Modelle der Brownschen Toraffinität und der selektiven Phase.

Das Modell der Brownschen Toraffinität sieht vor, dass die ins Zytoplasma sowie ins Nukleoplasma hineinragenden Nukleoporine mit ihren FG-Wiederholungen als Fangarme fungieren, um Transportkomplexe zum NPC zu dirigieren, den diese dann durch passive Diffusion durchqueren (Rout und Aitchison, 2000). Die Ausschlussgröße wird in diesem Modell von der Größe des NPC vorgegeben. Jedoch kann so die Translokation von Makrokomen wie z. B. den ribosomalen Untereinheiten nicht erklärt werden. Zudem führte die Deletion zytoplasmatischer Nups zu keinem Verlust der Translokationseffizienz (Walther et al., 2002).

Dem Modell der selektiven Phase liegt die Idee eines Netzwerks zugrunde, das bestimmte Nups innerhalb des NPC durch ihre FG-Wiederholungen ausbilden. Die Transportkomplexe könnten demnach durch Interaktion mit den FG-Wiederholungen dieses Netzwerk lokal auflösen und so durch die Kernpore diffundieren (Ribbeck und Gorlich, 2001). In diesem Modell wird die Ausschlussgröße durch die Maschengröße des Nukleoporinnetzwerks vorgegeben und würde einen Transport von Makrokomplexen ermöglichen. Jedoch konnte die Existenz eines solchen Netzwerks bislang nicht nachgewiesen werden.

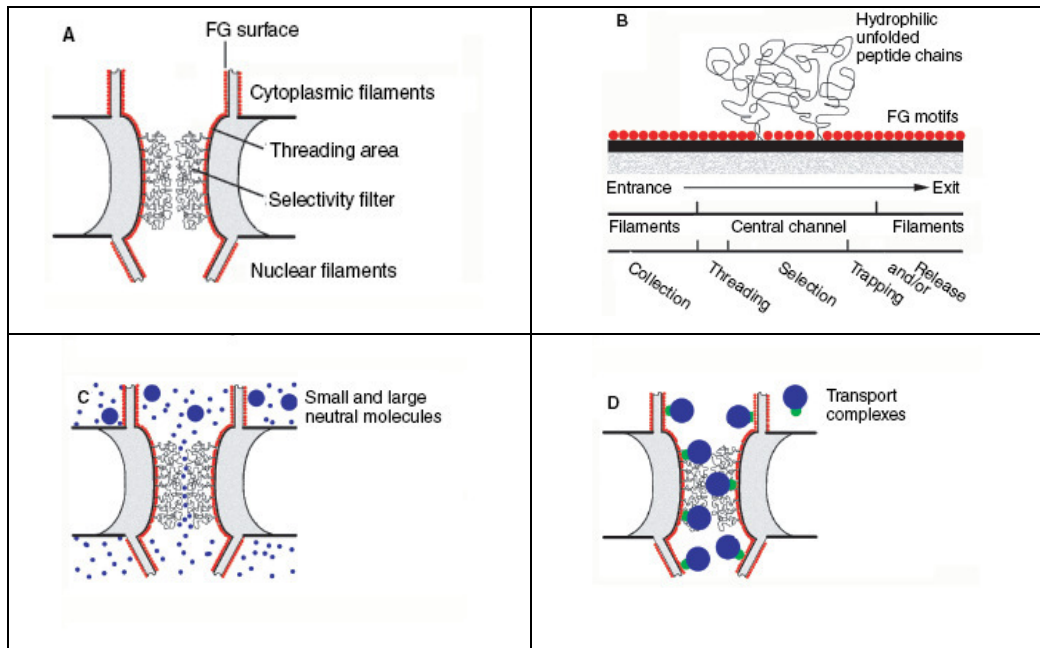


Abbildung 3.13: **Schematische Darstellung des Dimensionierungsreduzierungsmodells.**

(Peters, 2005)

Die Abbildung 3.13 zeigt das Dimensionierungsreduzierungsmodell, in dem die beiden vorherigen Modelle kombiniert und ergänzt werden. Es beschreibt einen Translokationsmechanismus, bei dem die Filamente und der zentrale Kanal des NPC von FG-Wiederholungen bedeckt sind (a). Ein im zentralen Kanal sitzender Selektivitätsfilter verhindert die passive Diffusion großer Komplexe durch die Kernpore. Die FG-Wiederholungen übernehmen je nach Lokalisation verschiedene Funktionen (b). Die zytoplasmatischen bzw. nukleoplasmatischen Filamente sind für das Einfangen und die Bindung von Transportkomplexen zuständig, während sie im Inneren des NPC die Diffusion von bindenden Komplexen erleichtern und so ein Netzwerk bilden, das als Selektivitätsfilter Makrokomplexe jenseits der 10 nm Grenze ohne Rezeptorvermittlung nicht passieren lässt (c). Transportsubstrate, die mit einem Transportfaktor assoziiert sind, können über Interaktionen mit den Nups den NPC wie im Modell der selektiven Phase passieren (d) (Peters, 2005).

3.6.4 Kernlokalisierungssignale (NLS)

Kernlokalisierungssignale ermöglichen den selektiven Proteintransport vom Zytoplasma ins Nukleoplasma. Die zwei hinreichenden Kriterien für die Definition von NLS lauten:

- Deletion und Mutation eines NLS führen zu einer Blockade des Imports.
- Zytoplasmatisch lokalisierte Proteine werden nach Kopplung mit einem NLS in den Zellkern importiert.

Durch die Identifizierung von homologen NLS konnte die Minimalsequenz K-(K/R)-X-(K/R) als klassisches NLS charakterisiert werden, wobei X durch die Aminosäuren K, R, V, P und A besetzt sein kann, nicht aber durch N (Chelsky et al., 1989).

Tabelle 3.3: **Klassische monopartite und bipartite Kernlokalisierungssignale.**

[(a) Kalderon et al., 1984; (b) Dingwall et al., 1989]

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben und die basischen AS sind fett hervorgehoben.

Protein	NLS-Typ	Aminosäuresequenz
SV40 T-Antigen ^a	monopartit	126 PKKKRKV 132
Nukleoplasmin ^b	bipartit	155 KRPAATKKAGQAKKKKL 171

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Bezeichnung der klassischen NLS darauf beruht, dass es sich um die ersten charakterisierten NLS handelt, aber keine Rückschlüsse auf die Häufigkeit der Nutzung des klassischen Importmechanismus zulässt. Mittels mathematischer Analyse wurde das Hefeproteom auf das Vorhandensein klassischer monopartiter und bipartiter NLS durchsucht (Lange et al., 2006). Die 5850 dabei analysierten Proteine enthalten demnach zu 16.5% ein bipartites und zu 28.6% ein monopartites NLS. Dies deutet darauf hin, dass der klassische Importmechanismus tatsächlich sehr wichtig ist, da ca. 45% aller untersuchten Hefeproteine zumindest die Voraussetzung für dessen Nutzung erfüllen. Zudem fanden sich bei 57% der nuklear bzw. nukleolar akkumulierenden Proteine klassische NLS.

Klassische NLS werden vom Importrezeptor Importin β als Transportkomplex mit dem Adaptermolekül Importin α importiert und haben folgende Gemeinsamkeiten:

- Die NLS besitzen keine bestimmte Position im Protein und werden nach dem Transport nicht abgespalten.
- Die NLS sind i. d. R. positiv geladen und bestehen aus 4 bis 8 Aminosäuren.
- In der Nähe der NLS befinden sich häufig helixunterbrechende Aminosäuren wie Prolin und Glycin.

- Proteine können mehrere NLS besitzen.
- Bei bipartiten NLS sind beide Teile für den Kerntransport essentiell. Der zwischen diesen Teilen liegende Aminosäurenbereich kann jedoch eine große Variabilität hinsichtlich Länge und Sequenz aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* gemessene Affinität eines klassischen NLS zu Importin α mit der nuklearen Akkumulation und der Importrate des NLS-Substrats *in vivo* korreliert. So wurde ein Bereich um etwa 10 nM für die Bindungskapazität eines klassischen NLS mit Importin α bestimmt, in dem die Interaktion und der nachfolgende Transport möglich sind. Liegt die Bindungskapazität darunter, erfolgt eine zu schwache Bindung an den Adapter, liegt sie darüber, kann die Dissoziation des Transportkomplexes im Zellkern nicht erfolgen, so dass in beiden Fällen der Transport entweder nicht stattfindet oder seine Effizienz deutlich eingeschränkt ist. Import und Akkumulation des Importsubstrats sind also einerseits von seiner Affinität zu Importin α , andererseits von der Konzentration des Adapters abhängig (Hodel et al., 2006).

Es finden sich auch Kernlokalisierungssignale ohne die typischen basischen Aminosäurenbereiche. So enthält z. B. eines der beiden NLS des transkriptionalen Repressors MAT α 2 aus *Saccharomyces cerevisiae*, das sich aus 13 Aminosäuren zusammensetzt, neben zwei basischen zahlreiche hydrophobe Aminosäuren (Hall et al., 1990).

3.6.4.1 Bekannte Kernlokalisierungssignale ribosomaler Proteine

Ribosomale Proteine stellen eine überaus vielfältige Klasse von Importsubstraten dar. Sie sind i. d. R. sehr basisch und weisen neben den klassischen monopartiten und bipartiten NLS auch komplexere NLS auf.

Tabelle 3.4: **Klassische Kernlokalisierungssignale von humanen ribosomalen Proteinen.**

[(a) Rosorius et al., 2000; (b) Schmidt et al., 1995; (c) Annilo et al., 1998]

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben und die basischen AS sind fett hervorgehoben.

Protein		Aminosäuresequenz	NLS-Typ
L5 ^a	NLS I	21 RR REGKTDYYARKRLV 36	monopartit
	NLS II	255 KKPKKEVKKKR 265	monopartit
S6 ^b	NLS I	167 KKPR 170	monopartit
	NLS II	188 KRRR 191	monopartit
	NLS III	215 KR 216 und 230 KRRR 233	bipartit
S7 ^c	NLS	115 KRPR 118	monopartit

Rosorius et al. konnten für das ribosomale Protein L5 zeigen, dass eines der beiden NLS sowohl dessen Import ins Nukleoplasma als auch die Akkumulation an den Nukleoli ermöglicht. Das humane ribosomale Protein S2 kann als Beispiel für ein nicht-klassisches NLS herangezogen werden (Antoine et al., 2005). Innerhalb dieses Proteins wurde ein Bereich von 72 Aminosäuren ermittelt, der essentiell und gleichzeitig ausreichend für einen aktiven Kernimport ist und der keinerlei Gemeinsamkeiten mit bereits beschriebenen NLS besitzt.

3.6.4.2 Bekannte Nukleoluslokalisationsdomänen (NuLD)

Nukleolare Proteine besitzen i. d. R. Signalsequenzen, die es ihnen nach dem Import in den Zellkern ermöglichen, an den Nukleoli zu akkumulieren. Sie werden im folgenden als Nukleoluslokalisationsdomänen (NuLD) bezeichnet.

Tabelle 3.5: **Nukleoluslokalisationsdomänen von humanen ribosomalen Proteinen.**

[(a) Schmidt et al., 1995; (b) Annilo et al., 1998]

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben und die basischen AS sind fett hervorgehoben.

Protein	Aminosäuresequenz der NuLD
S6 ^a	188 KRRRI ALKKQRT KKNK 203
S7 ^b	98 RRILPKPTRKSR 109

Leider konnten diese Signale bisher nicht so eindeutig charakterisiert werden wie die klassischen Kernlokalisierungssignale, doch auch bei ihnen spielen die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin eine entscheidende Rolle.

Erst kürzlich konnte ein GTP-Zyklus im Nukleolus beschrieben werden, der die Akkumulation des nukleolaren Proteins Nukleostemin bewirkt (Tsai und McKay, 2005). Dabei wurde die Information für die Nukleoliakkumulation des Proteins durch Mutationen in einer seiner beiden GTP-Bindungsdomänen zerstört, so dass es nur mehr im Nukleoplasma lokalisierte.

3.7 Evolution des Zellkerns

Bei den ersten frei lebenden Zellen handelte es sich wahrscheinlich um eubakterielle und archaebakterielle Chemoautotrophen, die vor ca. 3.8 Milliarden Jahren entstanden. Darauf lassen Kohlenstoffisotopenanalysen schließen, die eine biologische CO₂-Fixierung in Sedimenten dieser Zeit belegen (Nisbet und Sleep, 2001). Diese beiden prokaryontischen Linien dürften sich unabhängig voneinander entwickelt haben, worauf ihre dramatisch differente Membranlipidbiosynthese hindeutet, die eine der Grundlagen für frei lebende Zellen darstellt. Während Archaebakterien Isoprenoid-Ether-Membranen besitzen, sind Eubakterien ebenso wie Eukaryonten von einer Fettsäuren-Ester-Membran umhüllt.

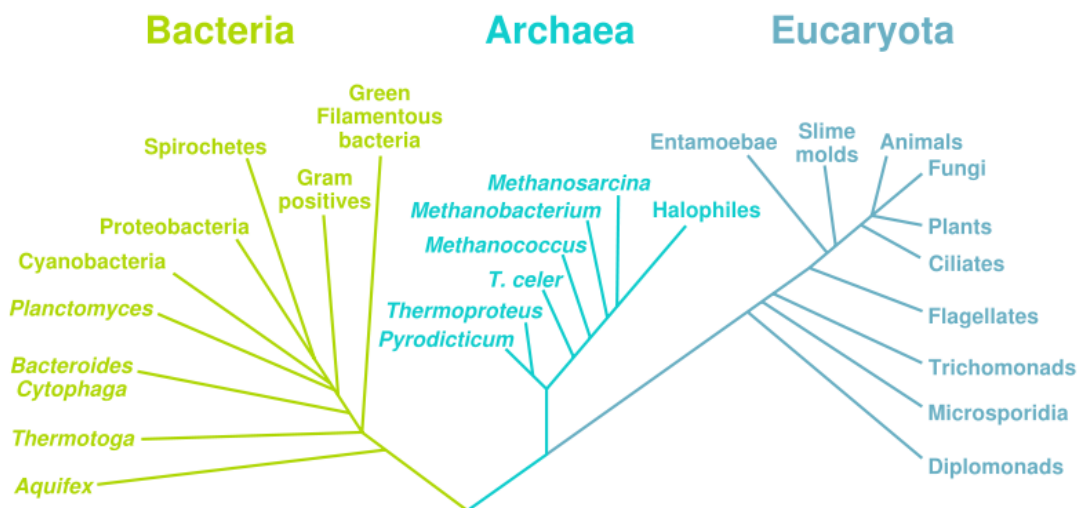


Abbildung 3.14: **Stammbaum des Lebens.**

Die heterotrophen Eukaryonten, die sich vermutlich vor 1.5 bis 2 Milliarden Jahren gebildet haben (Javaux et al., 2001), weisen viele Gemeinsamkeiten sowohl mit den Archaebakterien als auch mit den Eubakterien auf (Martin und Russell, 2003). Daher wird bis heute nicht nur die Entstehung des Lebens im Allgemeinen, sondern auch die Weiterentwicklung der Prokaryonten zu Eukaryonten sehr kontrovers diskutiert.

Im Mittelpunkt der Frage nach der Entstehung der Eukaryonten steht der Ursprung des Zellkerns, da dieser kein offensichtliches Äquivalent bei den Prokaryonten aufweist. Phylogenetische Untersuchungen und komparative Genomik konnten in den letzten Jahren viel zur Aufklärung beitragen, andererseits fanden sich viele Daten, die bis heute keine schlüssige allgemein akzeptierte Theorie zulassen. So zeigt sich das Paradox, dass die molekulare Maschinerie der Eukaryonten, die involviert ist in Replikation, Transkription und Transla-

tion, hinsichtlich Struktur und Konservierung der Aminosäuresequenz wesentlich mehr Ähnlichkeiten mit Archaeobakterien als mit Eubakterien besitzt.

Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass die operationalen Gene, verantwortlich für Metabolismus und biosynthetische Stoffwechselvorgänge, einen eubakteriellen Ursprung haben. Auch die Zusammensetzung der Zellmembran ist bei Eukaryonten und Eubakterien sehr ähnlich (Lopez-Garcia und Moreira, 2006; Martin, 2005). Demnach handelt es sich beim eukaryontischen Genom um eine Art Chimäre mit essentiellen Bestandteilen aus beiden prokaryontischen Linien. Im folgenden sollen die wichtigsten momentan im Mittelpunkt stehenden Theorien zur Entstehung der Eukaryonten skizziert werden und ein vereinheitlichendes Modell vorgestellt werden, das auch auf die bisher eher vernachlässigten Triebkräfte dieses Prozesses eingeht.

3.7.1 Das autogene Modell

Das autogene Modell sieht vor, dass die Entstehung des eukaryontischen Endomembransystems, zu dem Zellkern und endoplasmatisches Reticulum gehören, durch Invaginationen der Plasmamembran eines prokaryontischen Vorläufers hervorgerufen wurde, was sich im Einklang mit den momentanen Kenntnissen der Zellbiologie befindet.

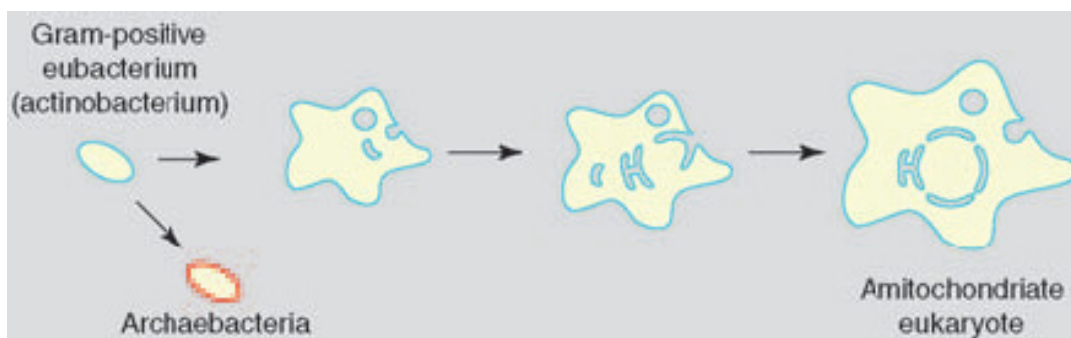


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des autogenen Modells.

(Martin, 2005)

Demnach soll ein Prokaryont aufgrund des Verlusts seiner Plasmamembran eine Art Phagozytose entwickelt haben, woraufhin die ursprünglich mit der Plasmamembran assoziierten Ribosomen internalisiert wurden und so ein primitives Endomembransystem entstand, das zunächst das endoplasmatische Reticulum und letztlich die Kernhülle ausbildete.

Neuere Versionen dieses Modells berufen sich auf einen archaeähnlichen Ursprung, was die Gemeinsamkeiten der Proteinsynthesemaschinerie der Eukaryonten und der Archaeobakterien erklären würde. Die bakterienähnlichen Gene des Metabolismus wären demnach

erst später in der Evolution durch die Mitochondrien hinzugekommen. Die weit verbreitete Endosymbiontentheorie besagt, dass sich Mitochondrien im Zuge der Endosymbiose des Eubakteriums α -Proteobakterium im Ursprungsorganismus entwickelten.

3.7.2 Das Chimären-Modell

Im Gegensatz zum autogenen Modell verneint das chimärisch symbiotische Modell die Existenz des archaeähnlichen Vorläufers, für den bisher keinerlei Beleg gefunden werden konnte. Es postuliert dagegen eine Fusion von Archaeobakterium und Eubakterium.

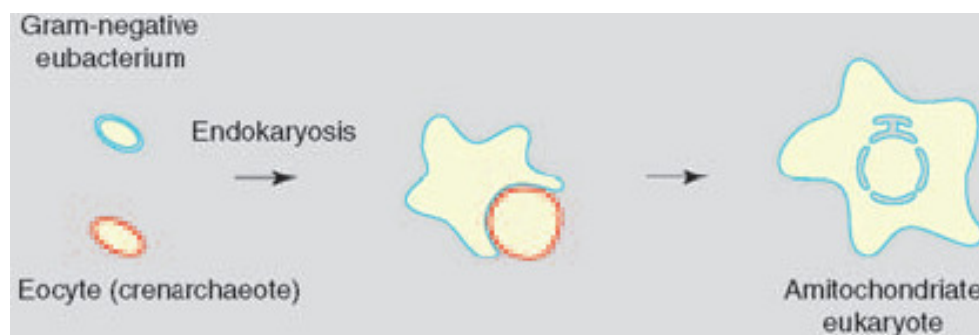


Abbildung 3.16: **Schematische Darstellung des Chimären-Modells.**

(Martin, 2005)

Dadurch kann problemlos das Auftreten von Genen der beiden prokaryontischen Linien im eukaryontischen Genom erklärt werden, neue charakteristische eukaryontische Gene wären als Innovationen im Zuge von Genredundanz bzw. Evolution anzusehen. Die Schwäche dieses Modells ist, dass es bisher kein plausibles Szenario für die Evolution der Kernhülle bereit hält. Die einfachsten chimärischen Hypothesen, nach denen die Inkorporation des zukünftigen Mitochondriums in ein Archaeobakterium den Ursprung der Eukaryonten bildete, können zudem nicht erklären, warum bakterielle Lipide nach der Inkorporation ins Archaeobakterium dessen Lipide substituiert haben sollten.

3.7.3 Vereinheitlichendes Modell

Das vereinheitlichende Modell versucht, das Chimären-Modell und das autogene Modell zu kombinieren und so Schwächen und Widersprüche der beiden Hypothesen zu eliminieren.

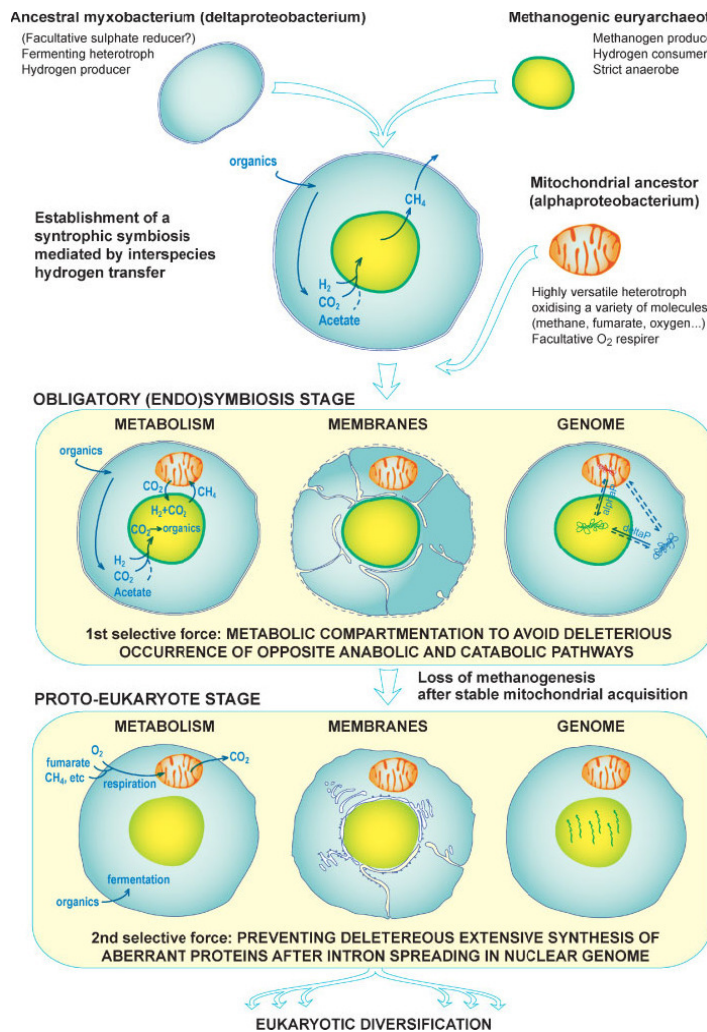


Abbildung 3.17: **Schematische Darstellung des vereinheitlichenden Modells.**

(Lopez-Garcia und Moreira, 2006)

Abbildung 3.17 zeigt, dass das vereinheitlichende Modell auf zwei unabhängigen symbiotischen Ereignissen beruht, an denen drei Prokaryonten beteiligt sind. Dabei handelt es sich um ein methanogenes Archaeobakterium, ein Myxobakterium und das bereits erwähnte α -Proteobakterium, den Vorläufer der Mitochondrien.

Am Beginn der Entwicklung der Eukaryonten stand demnach eine obligate Symbiose zwischen dem methanogenen Archaeobakterium und dem Myxobakterium, in welcher der anaerobe Hydrogentransfer zwischen beiden von zentraler Bedeutung war. Solche metabolischen Symbiosen sind weit verbreitet in sauerstoffarmen Sedimenten.

Methanogene Archaeobakterien gewinnen ihre Energie durch die strikt anaerobe Reduktion von CO₂ mit Wasserstoff. Myxobakterien stellen eine einzigartige Gruppe von Heterotrophen dar, die eine gut entwickelte Zell-Zell-Kommunikation und einen komplexen Entwicklungszyklus aufweisen. In der postulierten Symbiose produziert das Myxobakterium

durch Fermentation Wasserstoff, CO₂ und Acetat. Diese Metabolite können vom methanogenen Archaeobakterium aufgenommen und wiederum zu Methan verstoffwechselt werden. Da weder Fermentation noch Methanogenese effiziente Energiesyntheseweg darstellen, könnte in einem zweiten Schritt durch das Hinzukommen des metabolisch vielseitigen α -Proteobakteriums zum bereits bestehenden Konsortium die Energieausbeute entscheidend verbessert worden sein. So wurde der Weg für die sauerstoffabhängige Atmungskette geebnet, was in der Folge die Besiedelung sauerstoffreicher Umgebungen ermöglichte. Dabei entwickelte sich das methanogene Archaeobakterium zum Zellkern, das Myxobakterium bildete die Grundlage für das Zytoplasma und das α -Proteobakterium für die Mitochondrien. Der Nukleolus kann als funktioneller Rest des Zytoplasmas des Archaeobakteriums interpretiert werden.

Das vereinheitlichende Modell postuliert einen klar endosymbiotischen Ursprung, wobei zwei selektive Kräfte eine entscheidende Rolle spielen. Durch die Kompartimentierung der Zelle konnte zum einen der Metabolismus beider Prokaryonten getrennt erfolgen, um zu verhindern, dass sich anaboler und kataboler Stoffwechsel gegenseitig negativ beeinflussen, zum anderen wurde so eine anomale Proteinsynthese durch die Translation der Gene des einen Organismus mittels der Ribosomen des anderen verhindert.

Die Zellkernmembran und das endoplasmatische Reticulum stammen von der myxobakteriellen Plasmamembran ab, was in sehr guter Übereinstimmung zum autogenen Modell steht. Der Kernporenkomplex entwickelte sich zusammen mit der Kernmembran und bildete im Laufe der Evolution eine immer größere Komplexität aus. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Nachweis von NPC-ähnlichen Strukturen in einigen Planctomyceeten, was belegt, dass Bakterien solche Strukturen eigenständig ausbilden können.

Interessanterweise finden sich bei Myxobakterien die am nächsten stehenden Verwandten der kleinen eukaryontischen GTPasen und sie besitzen ein gut ausgebildetes sekretorisches System. Zudem konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur große Sekretionsporen in ihrer Membran aufweisen, sondern dass sie über ihre äußere Kernmembran mit anderen Zellen fusionieren können (Nudleman et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach dem vereinheitlichenden Modell das eukaryontische Genom aus der Integration dreier prokaryontischer Vorläufer resultiert. Dabei muss auf allen Ebenen ein horizontaler Gentransfer stattgefunden haben, so dass sich bis heute Relikte der Vorläufer in Eukaryonten finden lassen (Lopez-Garcia und Moreira, 2006).

4. Aufgabenstellung

Die Kompartimentierung eukaryontischer Zellen ermöglicht eine deutlich effizientere Regulation von Transkription und Translation im Vergleich zu den Prokaryonten, die keinen Zellkern besitzen.

Eukaryontische ribosomale Proteine (RPs) müssen nach ihrer Synthese im Zytoplasma aktiv durch den Kernporenkomplex ins Nukleoplasma importiert werden und an den Nukleoli akkumulieren, um dort im Zuge der Ribosomenbiogenese mit der rRNA zu interagieren. Dafür benötigen sie Kernlokalisierungssignale (NLS), um an einen Transportrezeptor binden zu können, der den Import bewirkt. Charakteristisch für klassische NLS ist das gehäufte Auftreten basischer Aminosäuren (AS) in einem bestimmten Bereich.

Da Prokaryonten keinen Zellkern haben, liegt die Vermutung nahe, dass ihre RPs auch keine NLS aufweisen. Betrachtet man aber ihre Aminosäuresequenzen genauer, finden sich viele Regionen mit mehreren basischen AS, mitunter sogar klassische NLS-Sequenzen.

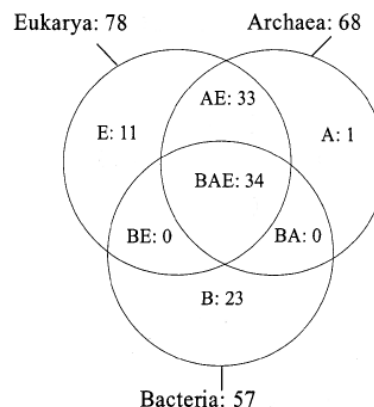


Abbildung 4.1: Verteilung der Mitglieder der Familie ribosomaler Proteine in Bakterien (B), Archaeobakterien (A) und Eukaryonten (E).

(Lecompte et al., 2002)

Abbildung 4.1 zeigt, dass Bakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten 34 homologe ribosomale Proteine besitzen. Bei einer Gesamtzahl von 82 RPs im humanen Ribosom ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Ribosomen im Zuge der Evolution einmal erfunden wurden und in erster Linie durch Modifikationen an bereits bestehenden Strukturen stetig verbessert wurden. Auch die Strukturvergleiche der rRNAs von Prokaryonten und Eukaryonten belegen große Ähnlichkeiten.

Da der Ursprung der Eukaryonten unmittelbar mit dem Entstehen des Zellkerns verbunden ist und bis heute sehr kontrovers diskutiert wird, ist es von Interesse herauszufinden, ob

prokaryontische RPs mittels der eukaryontischen Kerntransportmaschinerie aktiv ins Nukleoplasma eukaryontischer Zellen importiert werden und evtl. an deren Nukleoli akkumulieren.

Daher sollte in dieser Dissertation zunächst die Lokalisation diverser prokaryontischer RPs nach Derivatisierung mit unterschiedlichen Reportermolekülen und transienter Expression in eukaryontischen Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

Im nächsten Schritt sollten die Kernlokalisationssignale sowie die für die Nukleoliakkumulation verantwortlichen Nukleoluslokalisationsdomänen durch Klonierung von Fusionspeptiden charakterisiert werden.

Des weiteren sollte die zelluläre Lokalisation bzw. die Interaktion der RPS9 der Prokaryonten *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* mit den eukaryontischen Ribosomen eingehend untersucht werden. Dafür sollten die Proteine transient in HeLa-Zellen exprimiert und diese im Anschluss fraktioniert werden. Für die Analyse der Ribosomeninteraktion sollten Polysomenprofile erstellt sowie die Ribosomen mit Puromycin dissoziiert bzw. einer Hochsalzbehandlung unterzogen werden.

Im letzten Teil des Projekts sollte durch Austausch von Domänen zwischen dem RPS9 von *E. coli* und seinem humanen Homolog S16 der Einbau ins eukaryontische Ribosom bewirkt werden. Dazu sollte jeweils der C-Terminus des einen Proteins entfernt und durch den C-Terminus des anderen ersetzt werden. Die Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte sollte sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch immunologisch ermittelt werden.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

In dieser Dissertation wurden Chemikalien der Firmen Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), GE Healthcare Europe GmbH (München), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Pfizer AG (Zürich) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) in pro analysi- (p. a.), mikro- oder molekularbiologischer Qualität verwendet.

5.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, Taq-Polymerase, T4-DNA Ligase (400.000 U/ml), T4-Poly-nukleotidkinase (10.000 U/ml) und dNTP-Mix sowie die zugehörigen Puffer wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs GmbH (NEB, Frankfurt am Main) und Promega GmbH (Mannheim) bezogen.

Für die Sequenzier-PCR wurde das *BigDye Terminator Kit* von ABI, bestehend aus der BigDye-Reaktionslösung und dem HalfTerm-Puffer, herangezogen. Die Auswertung erfolgte im internen Service-Labor des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Für die diversen Klonierungen kamen folgende Restriktionsendonukleasen zum Einsatz:

Afl II, *BamH I*, *Bgl II*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Hind III*, *Nhe I* und *Spe I*.

5.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide stammen von der MWG-Biotech AG (Ebersberg).

5.1.4 Antikörper

Für die Detektion der β -Galaktosidase wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen von Abcam plc (Cambridge, UK) verwendet. Dieser ist bereits mit dem Chromophor FITC konjugiert, so dass kein Zweitantikörper mehr für die Detektion benötigt wurde.

Die Detektion der ribosomalen Proteine S9 von *E. coli* und *T. thermophilus* erfolgte durch Kombination zweier Antikörper. Als Erstantikörper diente jeweils ein polyklonaler S9-Antikörper aus dem Schaf, der mir freundlicherweise von Dr. Richard Brimacombe vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt wurde. Für die indirekte Fluoreszenzmikroskopie kam als Zweitantikörper ein mit Alexa Fluor 488 konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Schaf-Immunglobuline (Molecular Probes) zum Einsatz. Für den Western Blot wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Schaf-

Immunglobuline von der Dako Deutschland GmbH (Hamburg) als Zweitantikörper verwendet. Dieser ist bereits mit dem Enzym HRP konjugiert, das eine Detektion über das *ECL Plus Detektionskit* von der GE Healthcare Europe GmbH (München) ermöglicht.

Das humane ribosomale Protein S16 konnte über einen polyklonalen S16-Antikörper aus Kaninchen von der Aviva Systems Biology Corporation (San Diego, USA) detektiert werden. Als Zweitantikörper kam hierbei ein ebenfalls HRP-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline von der Dako Deutschland GmbH (Hamburg) zum Einsatz.

Der Antikörper Ki-67 von der Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) wurde optional bei einigen Fluoreszenzanalysen benutzt, um eine Markierung der Nukleoli eukaryontischer Zellen im roten Farbbereich zu erhalten. Die Zellkerne wurden für die Fluoreszenzmikroskopie immer mit einer DAPI-Färbelösung blau eingefärbt.

Für die Detektion der Polysomenprofile wurde als Erstantikörper optional ein in diesem Arbeitskreis generierter S6-Ak aus Kaninchen eingesetzt (Tier 2414). Als Zweitantikörper diente der bereits beschriebene HRP-konjugierte Ak gegen Kaninchen-Immunglobuline.

5.1.5 Vektoren

Für direkte Fluoreszenzanalysen wurden die Vektoren pEGFP-C1 bzw. pEGFP-N1 von Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Sie ermöglichen die Derivatisierung von Proteinen mit EGFP (Chalfie et al., 1994), das im Ergebnisteil detailliert beschrieben wird.

Um in diese Vektoren ein bzw. zwei EGFP einzufügen, wurde der Vektor pBluescript II KS(-) von der Stratagene Corporation (Cedar Creek, USA) für die jeweiligen Zwischenklonierungen herangezogen.

Indirekte Fluoreszenzanalysen wurden mit dem Vektor pASH, einem in diesem Arbeitskreis konstruierten Vektor für die Derivatisierung von Proteinen mit β -Galaktosidase, durchgeführt (Walter, 2000; Lipsius et al., 2005). Er wurde durch Modifikationen am Vektor pRc/RSV von der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) hergestellt.

Für hohe Expressionsausbeuten kam der Vektor pcDNA5/FRT/TO der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) zum Einsatz. Nach Transfektion mit diesem konnten die Ribosomen bzw. Polysomen der eukaryontischen Zellen separiert und analysiert werden oder mittels geeigneter Antikörper indirekte Fluoreszenzanalysen im Mikroskop durchgeführt werden.

5.1.6 Biologisches Material

5.1.6.1 Kompetente Zellen

- *Escherichia coli* DH5 α , mit folgendem Genotyp:

F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*rk*⁻, *mk*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

Der Marker ϕ 80dlacZ Δ M15 ermöglicht ein sogenanntes Blue/White-Screening durch Alpha-Komplementierung der β -Galaktosidase. *RecA1* erhöht die Stabilität der transformierten DNA, *endA1* die Qualität der Plasmid-DNA.

- *Escherichia coli* XL1-Blue, mit folgendem Genotyp:

RecA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F['] proAB lacI^q Z Δ M15 TN10 (Tet^r)].

Aufgrund der Gene *recA1* und *endA1* weist er ähnliche Eigenschaften auf wie der Stamm DH5 α .

- *Escherichia coli* InvF α , mit folgendem Genotyp:

RecA1, *endA1*, *hsdR17*(*r*⁻*k*, *m*⁺*k*), *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*, ϕ 80lacZ Δ M15 (*lacZYA-argF*), *deoR*⁺, F['].

Dieser Stamm eignet sich besonders zur Transformation relativ großer Plasmide und wurde für den β -Galaktosidase-exprimierenden Vektor verwendet.

5.1.6.2 Zelllinien

- COS-1-Zellen:

Bei COS-1-Zellen (American Tissue Culture Collection, ATCC) handelt es sich um eine von Affen-Fibroblasten abgeleitete Zelllinie, die mit einer Mutante des Affenvirus SV40 (Simian Vacuolating Virus 40) transformiert wurde und für das *large T-Antigen* kodiert. Dieses stellt einen starken Promotor dar, der von den Zellen in großer Menge exprimiert wird. Da die verwendete SV40-Mutante einen Defekt im ORI (Origin of replication) aufweist, können die COS-1-Zellen nach Transfektion mit einem Vektor, der ein intaktes SV40-ORI enthält, hohe Proteinraten exprimieren.

- HeLa-Zellen:

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die als erste menschliche Zellen zu einer permanenten Zelllinie etabliert wurden (Scherer et al., 1953). Sie weisen eine schwache p53- und eine normale pRB-Expression auf.

5.1.6.3 Genomische DNA

Die genomische DNA von *Escherichia coli* wurde aus DH5 α -Zellen extrahiert und aufgereinigt. Mein Dank für die Bereitstellung der genomischen DNA von *Thermus thermophilus* HB8 (10 ng/ μ l) gilt Dr. Daniel Wilson, Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

5.1.7 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer GNA (Pharmacia)
Analysenfeinwaage (Sauter)
Autoklav
Bakterienschüttelinkubator G25 (New Brunswick)
Brutschrank HeraCell (Heraeus) für Zellkultur (37°C, 5% CO₂-Atmosphäre, 100% Luftfeuchtigkeit)
Brutschrank (Mettler) für Genlabor (37°C)
Durchflussphotometer 2238 Uvicord S II (LKB)
Eismaschine (Scotsman)
Fraktionssammler 2112 Rediv (LKB)
Gefrierschränke (−20°C)
Gefriertruhe (−80°C)
Geldokumentationssystem mit Digitalkamera Olympus C-5050Zoom
Gradientensauger Densi-Flow IIC (Buchler)
Heizblock Thermomixer comfort (Eppendorf)
Kühlhochleistungszentrifuge RC-5 (Sorvall)
Kühlkabinett (Colora)
Kühlschränke (4°C)
Laborwaage P1210 (Mettler)
Laborwaage R3000 (Sauter)
Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss)
Mikroskop Diavert (Leitz)
Mikrowelle R-6270 (Sharp)
PCR-Thermocycler Personal Cyclor (Biometra)
pH-Meter PHM82 Standard (Radiometer)
Photometer BioPhotometer (Eppendorf)
Powersupply E835 (Consort)
Powersupply Phero-stab. 200 (Biotec Fischer)
Schlauchpumpe Minipuls 2 (Gilson)
Schüttler (Gerhardt)
Spülmaschine Desinfektor Automatic G7735 (Miele)
Sterilwerkbank Hera Safe (Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge 13 (Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus)
Tischzentrifuge Minifuge T (Heraeus)
Ultrazentrifuge L5 65 (Beckmann) mit den Rotoren Ti 50, Ti 60 und SW 41
UV-Transilluminator FLX-20.M (Biometra)
Vakuumzentrifuge (Rühe-Zentrifugen)
Wasseraufbereitungsanlage Elix 5 (Millipore)
Wasserbad (GFL)
Zweikanalschreiber (LKB)

5.1.8 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Standardlösungen für den Einsatz in der Molekularbiologie wurden mit Hilfe des Standardwerks *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) oder dem Laborführer *Lab FAQs – Find a quick solution* der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) hergestellt. Für sämtliche Lösungen wurde autoklaviertes, osmotisch aufgereinigtes Wasser der Elix-Wasseraufbereitungsanlage verwendet (bidest.). Sterile Lösungen wurden im Autoklaven dampfsterilisiert oder bei Hitzeempfindlichkeit mit dem Membranfilter Minisart (Sartorius) mit einer Porengröße von 0.2 µm sterilfiltriert.

30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid

30% (w/v) Acrylamid (Roth)

0.8% (w/v) N,N'-Methylen-Bis-acrylamid (Serva)

Agarosegellösung

1% bis 2% (w/v) Agarose (Seakem) wurden durch Aufkochen in 0.5-fachem TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlen auf ca. 50°C im Wasserbad mit 0.5 µg Ethidiumbromid pro ml Agarosegellösung versetzt und zum Polymerisieren in die Gelkammer gegossen.

Amersham *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare)

Ampicillin

50 mg/ml Ampicillin-Stammlösung (Sigma)

sterilfiltriert

10% APS (w/v)

BigDye-Reaktionslösung (Applied Biosystems)

Blockierlösung

5% Milchpulver in 1x TBS-Tween (für Western Blot) bzw. in 1x PBS (für Zellkultur) gelöst

10 mg/ml BSA-Stammlösung (NEB)

Cycloheximid 50 µg/ml

DAPI-Färbelösung

1 µg/ml DAPI (Molecular Probes) in 1x PBS gelöst

DAPI-Stammlösung

2 mg/ml DAPI (Molecular Probes) in bidest. gelöst

6x DNA-Probenpuffer

0.25% (w/v) Bromphenolblau (Serva)

0.25% (w/v) Xylencyanol (Fluka)

30% (v/v) Glycerol (Merck)

dNTP-Mix [Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)]

Je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Dulbecco Modified minimal Essential Medium (DMEM)

Das DMEM-Trockenpulver (Seromed) wurde laut Angaben des Herstellers mit bidest. versetzt, 3.75 g NaHCO₃ zugegeben und mit HCl auf pH 7.2 eingestellt. Danach wurde auf ein l l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Für sämtliche Zellkulturarbeiten und Zelllinien wurde dieses Nährmedium mit einem Zusatz an 10% FCS-Stammlösung verwendet. Einzige Ausnahme stellte die Transfektion der Zelllinien dar, bei der im ersten Schritt das *FuGENE 6-Reagenz* in serumfreies Medium pipettiert wurde.

10 mg/ml Ethidiumbromid (Serva)

FCS (Seromed)

Formaldehyd-Fixierlösung

37%-ige Formaldehydlösung (Merck) wurde mit 1x PBS auf 4% verdünnt.

FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)

Hochsalzpuffer für Puromycinbehandlung von Polysomen

150 mM bis 500 mM KCl

50 mM Tris-HCl

2.5 mM MgAc

Kanamycin-Stammlösung

30 mg/ml Kanamycin

sterilfiltriert

Kompensationspuffer

1 M KCl

100 mM Tris-HCl

5 mM MgAc

Kompetenzpuffer 1

60 mM CaCl₂

10 mM KCl

10 mM Tris-HCl, pH 7.4

Kompetenzpuffer 2

60 mM CaCl₂

10 mM KCl

10 mM Tris-HCl

15% Glycerin, pH 7.4

LB-Agar

1% (w/v) Bacto-Trypton (Difco)

0.5% (w/v) Hefeextrakt (Difco)

1% (w/v) NaCl

1.5% (w/v) Agar (Difco)

pH 7.0 mit NaOH einstellen

autoklaviert

LB-Medium

1% (w/v) Bacto-Trypton (Difco)

0.5% (w/v) Hefeextrakt (Difco)

1% (w/v) NaCl

pH 7.0 mit NaOH einstellen

autoklaviert

Midipräparationspuffer (Genomed)

Puffer E1: 0.05 M Tris-HCl
0.05 mg/ml RNase, pH 8.0

Puffer E2: 0.2 M NaOH
1% SDS

Puffer E3: 3.1 M KAc, pH 5.5

Puffer E4: 0.6 M NaCl
0.1 M NaAc
0.15% TritonX-100, pH 5.0

Puffer E5: 0.8 M NaCl
0.1 M NaAc, pH 5.0

Puffer E6: 1.25 M NaCl
0.1 M Tris-HCl, pH 8.5

Minipräparationspuffer (Qiagen)

- Puffer P1: 0.05 M Tris-HCl
0.01 M EDTA
0.05 mg/ml RNase, pH 7.5
- Puffer P2: 0.2 M NaOH
1% SDS
- Puffer N3: 3.1 M KAc, pH 5.5
- Puffer PE: Waschpuffer mit Ethanol

Molekulargewichtsmarker

- Marker III: 100 ng/μl λ-DNA restringiert mit *EcoR I* und *Hind III* (Appligene)
- 100 bp DNA Marker: 500 ng/μl (NEB)
- 1 kb DNA Marker: 500 ng/μl (NEB)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) entspricht gefärbter Proteinleiter
- Low Molecular Weight (LMW) Proteinmarker (Amersham)

Mowiol

6 g Glycerol und 2.4 g Mowiol 4-88 (Hoechst) wurden in ein 50 ml Falconröhrchen eingewogen. Das Gemisch wurde sorgfältig im Schüttler gelöst, 6 ml bidest. hinzugefügt und 2 h bei RT stehen gelassen. Dann wurde 0.2 M Tris (pH 8.5) zugefügt und bei 53°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, bis alles gelöst war. Abschließend wurde zentrifugiert (5.000 U/min., 20 min., RT) und die klare Lösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3 M NaAc, pH 5.2 (Merck)

1x PAA-Laufpuffer

- 192 mM Glycerin (Merck)
- 25 mM Tris (ICN)
- 0.1% (w/v) SDS (ICN)

1x PBS

- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 8.1 mM Na₂HPO₄
- 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4
- autoklaviert

PCR-Aufreinigungspuffer [*QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen)]

- Puffer PB Bindungspuffer
- Puffer PE Waschpuffer mit Ethanol
- Puffer QG Nur zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen

1x PCR-Reaktionspuffer

- 50 mM KCl
- 10 mM Tris-HCl
- 1.5 mM bzw. 4 mM MgCl₂
- 0.8% Nonidet P40, pH 8.8

Polylysinlösung

- 0.03% (w/v) Polylysin
- sterilfiltriert

Ponceau-Färbelösung

- 0.1% (w/v) Ponceau S (Sigma)
- 5% (v/v) Essigsäure (Merck)

10 mM Puromycinlösung

Restriktionspuffer (NEB)

1x Puffer 1: 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT, pH 7.0

1x Puffer 2: 10 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT, pH 7.9

1x Puffer 3: 50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT, pH 7.9

1x Puffer *EcoR* I: 50 mM NaCl

100 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

0.025% Triton X-100, pH 7.5

1x Puffer *BamH* I: 150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT, pH 7.9

Bei Bedarf (abhängig von den beteiligten Restriktionsenzymen) wurde den Restriktionsansätzen 1% BSA zugesetzt.

RSB-Puffer

10 mM Tris-HCl

10 mM KCl

1.5 mM MgAc, pH 7.4

10%-ige (w/v) SDS-Lösung (ICN)

1x SDS-Probenpuffer

320 mM Tris-HCl (pH 6.8) (ICN)

0.008% (w/v) Bromphenolblau (Serva)

8% (w/v) SDS (ICN)

40% (v/v) Glycerin (Merck)

5% (v/v) β-Mercaptoethanol (Sigma)

SepharoseA (Santa Cruz Biotech. Inc.)

2 M STKM-Kissen

2 M Saccharose

50 mM Tris-HCl

25 mM KCl

10 mM MgAc

Sucrosegradient

10%, 30% bzw. 40% Saccharose (w/v)

50 mM Tris-HCl

25 mM KCl

10 mM MgCl₂, pH 7.4

10x T4-DNA Ligasepuffer

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

1 mM ATP

0.025% (w/v) BSA, pH 7.4

1x TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Puffer)

40 mM Tris (ICN)

1 mM EDTA (ICN)

20 mM Eisessig (Merck)

1x TBS

100 mM Tris-HCl

150 mM NaCl (Merck), pH 7.5

1x TBS-Tween (1x TBST)

100 mM Tris-HCl

150 mM NaCl (Merck)

0.05% Tween20 (ICN), pH 7.5

Temed (Serva)

1x TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris-HCl

10 mM EDTA, pH 8

Tetrazyklin-Stammlösung

30 mg/ml Tetrazyklin

sterilfiltriert

Transferpuffer

Puffer I: 3.63% (w/v) Tris Base (ICN)

20% (v/v) Methanol (Merck)

Puffer II: 0.3% (w/v) Tris Base (ICN)

20% (v/v) Methanol (Merck)

Puffer III: 0.3% (w/v) Tris Base (ICN)

0.524% (w/v) 6-Amino-Capronsäure

20% (v/v) Methanol (Merck)

Trypsinlösung

0.05% (w/v) Trypsin in 1x PBS, pH 7.4

sterilfiltriert

5.2 Molekularbiologische Methoden

Gentechnologische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 wurden unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften (Gentechnikgesetz) durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) erfolgte ausschließlich in den dafür vorgesehenen Räumen.

DNA wurde in autoklaviertem, osmotisch aufbereitetem Wasser aufgenommen, um die Aktivität von Enzymen in Folgereaktionen nicht zu beeinträchtigen. Für eine längere Lagerung wurden einige DNA-Proben in 1x TE-Puffer gelöst und bei -20°C weggefroren.

5.2.1 PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Die Oligonukleotide (Primer) für die PCR wurden alle bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) bestellt.

Der eingesetzte 10x PCR-Puffer und der 10 mM dNTP-Mix stammen von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), die Taq-Polymerase (5.000 U/ml) von Appligene.

In Abbildung 5.1 sind die jeweiligen Mengen bzw. Konzentrationen für ein Standard-PCR-Programm mit einem Gesamtvolumen von 25 μl angegeben:

10x PCR-Puffer	2.5 μl
MgCl ₂	1.5 mM bis 4 mM
Templat	10 ng bis 100 ng
5' Primer (Sense)	15 pmol
3' Primer (Antisense)	15 pmol
dNTP-Mix	0.2 mM
Taq-Polymerase	2.5 U
bidest.	ad 25 μl

Abbildung 5.1: **Pipettierschema für ein Standard-PCR-Programm.**

Im Anhang sind unter 11.1.1 die Temperaturprofile und die Inkubationszeiten des PCR-Programms MP-S9gDNA dargestellt. Dieses diente als Grundlage für alle Klonierungs-PCRs, und nur in Ausnahmefällen wurde das Temperaturprofil angepasst, sofern im Agarsegel nach der PCR keine DNA-Banden nachgewiesen werden konnten.

5.2.2 DNA-Quantifizierung im analytischen Agarosegel

Die Charakterisierung der DNA aus der PCR erfolgte in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur in 1%- bis 2%-igen Agarosegelen bei Spannungen zwischen 80 V und 110 V in 1x TAE-Puffer. Sowohl für analytische als auch präparative Gele wurde die entsprechende Agarosemenge eingewogen, mit 0.5x TAE-Puffer verdünnt und über dem Bunsenbrenner aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C im Wasserbad wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml zugesetzt und in die Gelkammer gegossen.

Je 1 µl der 25 µl PCR-Ansätze wurde mit 4 µl bidest. versehen, 1 µl 6x DNA-Probenpuffer zugegeben und in die Taschen eines 1%- bis 2%-igen Agarosegels pipettiert. Das Gel wurde für ca. 30 min. bis 45 min. laufen gelassen, so dass sich die DNA aufgrund ihrer Größe auftrennte, und anschließend das Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator analysiert. Parallel zu den zu analysierenden Proben wurde ein geeigneter Molekulargewichtsmarker aufgetragen, dessen Banden von bekannter Größe sind und so einen Vergleich mit der Größe der DNA-Banden aus der PCR ermöglichen. Gleiches gilt für die Intensität, so dass eine ungefähre Abschätzung der DNA-Menge im Bereich von 10 ng bis 1 µg pro µl DNA erfolgen konnte. Mittels eines Geldokumentationssystems wurden die Daten gespeichert.

5.2.3 DNA-Reinigung

Die Aufreinigung der DNA aus der PCR erfolgte mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Nach jeder Zentrifugation wurde der Zentrifugationsüberstand verworfen bzw. abgesaugt.

Zunächst wurden zu den verbliebenen 24 µl der PCR-Ansätze 120 µl PB-Puffer (5-fache Menge) pipettiert und auf eine QIAquick Spinsäule gegeben, die in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß platziert wurde. Die Bindung der DNA an die Säule erfolgte per Zentrifugation (13 krpm, RT, 60 s). Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer zum Waschen auf die Säule gegeben und 2x zentrifugiert (13 krpm, RT, 60 s), beim letzten Mal nur die leere Säule, um mögliche Ethanolrückstände komplett zu entfernen. Danach wurde die Säule in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Für die Elution wurden entweder 30 µl auf 50°C vorgewärmtes bidest. oder 30 µl EB-Puffer auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (13 krpm, RT, 60 s). Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei –20°C gelagert.

5.2.4 Restriktion der DNA und der Plasmide

Für die diversen Klonierungen kamen folgende Restriktionsendonukleasen zum Einsatz:

Afl II, *BamH I*, *Bgl II*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Hind III*, *Nhe I* und *Spe I*.

Die Restriktionsansätze umfassten jeweils 30 µl und wurden im Doppelverdau (z.B. *Afl II* und *Hind III*) oder sequenziell (z.B. *EcoR I* oder *BamH I*) durchgeführt. Die Informationen hierzu wurden dem Katalog bzw. der Internetseite von NEB entnommen, ebenso wie die empfohlenen Inkubationszeiten (von 2 h bis 20 h) und Puffer der jeweiligen Enzyme. Dargestellt ist hier das Pipettierschema eines Doppelverdauansatzes:

10x Restriktionspuffer	3 µl
100% BSA	0.3 µl (optional)
aufgereinigte DNA bzw. Plasmid	24 µl bzw. 10 µg
Restriktionsenzym 1	10 U bis 100 U
Restriktionsenzym 2	10 U bis 100 U
bidest.	ad 30 µl

Abbildung 5.2: **Pipettierschema für einen Doppelverdau.**

Die Ansätze wurden in ein 1.5 ml Eppi pipettiert und im Brutschrank (37°C) inkubiert. Optional wurde 1% BSA zugegeben, da dieses für die Aktivität einiger Enzyme benötigt wird, andere Enzyme aber nicht beeinträchtigt.

Bei sequenziellem Verdau wurden die Ansätze nach der ersten Restriktion aufgereinigt (analog zu 5.2.3) und die zweite Restriktion angesetzt. Danach wurde genauso verfahren wie mit den Doppelansätzen.

Analog wurde die Restriktion der Plasmide durchgeführt, in welche die restringierten DNA-Fragmente einkloniert wurden.

5.2.5 Gelelution aus präparativem Agarosegel

Die restringierten 30 µl-Ansätze wurden gelelektrophoretisch bei 80 V für ca. 40 min. bis 1 h in einem 1%- bis 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Das zugesetzte Ethidiumbromid ermöglichte die Detektion der DNA-Banden mittels eines UV-Transilluminators. Sie wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppi überführt.

Im Anschluss wurde die DNA mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) eluiert, wobei nach jeder Zentrifugation der Zentrifugationsüberstand verworfen bzw. abgesaugt wurde.

Zu den ausgeschnittenen Agarosegelstücken wurden 840 µl des QG-Puffers (entspricht in etwa dem dreifachen Volumen) zugegeben und das Eppi im Heizblock inkubiert (1.400 rpm, 50°C, 10 min.). Danach wurde mit 280 µl Isopropanol (entspricht in etwa dem einfachen Volumen) gefällt, und 750 µl der Lösung wurden auf eine QIAquick Spinsäule pipettiert. Nach Bindung der DNA durch Zentrifugation (13 krpm, RT, 60 s) wurde die restliche Probenmenge auf die Säule gegeben und der Vorgang wiederholt. Es erfolgte das Waschen mit 750 µl PE-Puffer. Die Säulen wurden 2x zentrifugiert (13 krpm, RT, 60 s), beim zweiten Mal in leerem Zustand, und danach in ein 1.5 ml Eppi überführt. Für die Elution der DNA wurden entweder 30 µl auf 50°C vorgewärmtes bidest. oder 30 µl EB-Puffer auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (13 krpm, RT, 60 s). Die Lagerung der restringierten und eluierten DNA sowie der Vektoren erfolgte bei –20°C.

5.2.6 Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die nicht als PCR-Primer verwendet, sondern direkt in die Ligation eingesetzt wurden, mussten vorher hybridisiert und mittels T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert werden.

Für die Hybridisierung wurden je 500 pM des Sense- und des Antisense-Oligonukleotids in 44 µl bidest. vereinigt und im Heizblock inkubiert (96°C, 10 min.). Nach langsamem Abkühlen auf RT wurde die Phosphorylierungsreaktion nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

10x Ligasepuffer	5 µl
hybridisierte Oligonukleotide	44 µl
T4-Polynukleotidkinase	10 U = 1 µl

Abbildung 5.3: Pipettierschema für die Phosphorylierung von Oligonukleotiden.

Nach der Inkubation (37°C, 35 min.) wurde die T4-Polynukleotidkinase inaktiviert (65°C, 25 min.) und die phosphorylierten Oligonukleotide wurden bei –20°C weggefroren.

5.2.7 Ligation

Die aus der Gelelution gewonnene DNA bzw. die phosphorylierten Oligonukleotide sowie die Vektoren wurden mit Hilfe eines analytischen Agarosegels (siehe 5.2.2) quantifiziert und in 20 μ l Ligationsansätzen verwendet.

10x Ligasepuffer	2 μ l
eluierte bzw. phosphorylierte DNA	100 ng bis 200 ng
eluiertes Vektor	50 ng bis 100 ng
T4-DNA Ligase	200 U bis 400 U
bidest.	ad 20 μ l

Abbildung 5.4: Pipettierschema für einen Ligationsansatz.

Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte über Nacht (16 h bis 24 h) bei 14°C bis 16°C im Heizblock.

5.2.8 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli*-Zellen InvF α , DH5 α und XL1Blue wurde nach dem gleichen Protokoll vollzogen. Im Falle der XL1Blue konnte die Übernachtskultur mit Tetrazyklin selektioniert werden, wohingegen InvF α und DH5 α kein entsprechendes Resistenzgen aufweisen. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Eine 2 ml Übernachtskultur wurde in 1x LB-Medium angesetzt (bei XL1Blue mit 60 μ g Tetrazyklin) und im Schüttelinkubator kultiviert (37°C, 250 rpm). Am nächsten Tag wurden 500 μ l der Übernachtskultur in 200 ml 1x LB-Medium gegeben, und wieder im Schüttelinkubator kultiviert (37°C, 250 rpm) bis sie die frühe logarithmische Wachstumsphase ($OD_{600} = 0.3$ bis 0.5) erreichten. Diese wurde im UV-Photometer bestimmt und i. d. R. nach 2 h bis 4 h erlangt. Es folgten eine Zentrifugation (4 krpm, 4°C, 10 min.) und vorsichtiges Resuspendieren in 40 ml Kompetenzpuffer 1.

Die folgenden Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt. Nachdem die Zellen mindestens 30 min. inkubiert hatten, wurden sie abzentrifugiert (4 krpm, 4°C, 10 min.), in 20 ml Kompetenzpuffer 1 resuspendiert und für 30 min. auf Eis stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, nur wurden die Zellen nach der zweiten Zentrifugation in 10 ml Kompetenzpuffer 2 resuspendiert, der durch seinen Glycerinanteil die Lagerung bei –80°C ermöglicht. Auf Eis wurden die Zellen in 1.5 ml Eppis aliquotiert und bei –80°C weggefroren.

5.2.9 Transformation der Ligationsansätze mit kompetenten Zellen

Die Transformation der Ligationsansätze erfolgte nach dem gleichen Protokoll unter der Sterilwerkbank. Je nach Zielvektor wurden die entsprechenden kompetenten Zellen eingesetzt.

Für das Gießen der Agarplatten wurde zunächst 1x LB-Agar in der Mikrowelle aufgekocht und im Wasserbad auf ca. 60°C abgekühlt. Dann wurden für die Antibiotikaselektion – je nach Resistenzgen des Zielvektors – entweder 50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zugegeben, und unter der Sterilwerkbank 12 ml bis 15 ml in Petrischalen abgefüllt. Nach dem Abkühlen wurden die Agarplatten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je 150 µl zu den Ligationsansätzen pipettiert. Nach mindestens 35 min. auf Eis wurde ein Hitzeschock (42°C, 90 s) durchgeführt und die Transformationsansätze anschließend für weitere 5 min. auf Eis gegeben. 1 ml 1x LB-Medium wurde jedem Eppi hinzugefügt und für 60 min. bis 75 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze zentrifugiert (10 krpm, RT, 1 min.), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl 1x LB-Medium resuspendiert und auf den Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert (16 h bis 20 h).

I. d. R. wurden eine Positivkontrolle - ein bereits fertiges Plasmid mit entsprechendem Resistenzgen -, eine Negativkontrolle - nur 150 µl kompetente Zellen, behandelt wie die Ligationsansätze - und eine Religationskontrolle - nur restringierter Vektor ohne Insert im Ligationsansatz - mit ausplattiert.

5.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA

Auf den Agarplatten gewachsene Klone wurden mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) überprüft. Nach jeder Zentrifugation wurde der Zentrifugationsüberstand verworfen bzw. abgesaugt.

Zunächst wurde in einem Blue-Cap-Röhrchen eine 3 ml Übernachtkultur mit 1x LB-Medium sowie 150 µg Ampicillin bzw. 90 µg Kanamycin angesetzt, in die per Pipettenspitze ein Klon von der Agarplatte überführt wurde. Nach Inkubation im Schüttelinkubator (37°C, 250 rpm) für 16 h bis 20 h wurden 2 ml der Übernachtkultur in ein 2 ml Eppi gefüllt. Der Rest wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Das 2 ml Eppi wurde zentrifugiert (13 krpm, RT, 1 min.) und das Pellet in 250 µl Minipräparationspuffer P1 resuspendiert. Um die darin enthaltene RNase aktiv werden zu lassen, wurde das Eppi für 15 min. bei RT stehen gelassen, woraufhin 250 µl Minipräparations-

puffer P2 zupipettiert und die Eppis vorsichtig 5x gewendet wurden. Nach 5 min. Inkubation wurde mit 350 µl Minipräparationspuffer N3 neutralisiert, die Eppis wurden kräftig geschüttelt und zentrifugiert (13 krpm, RT, 10 min.). Der Zentrifugationsüberstand wurde auf eine QIAprep Spinsäule gegeben, die in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß platziert wurde. Um die Plasmid-DNA am Säulenmaterial binden zu lassen, wurde die Säule zentrifugiert (13 krpm, RT, 1 min.), mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und 2x zentrifugiert (13 krpm, RT, 1 min.), beim zweiten Mal in leerem Zustand. Für die Elution wurde sie in ein 1.5 ml Eppi überführt, mit 30 µl auf 50°C vorgewärmtem bidest. versehen und nach einer Minute Inkubation zentrifugiert (13 krpm, RT, 1 min.). Gelagert wurde die eluierte Plasmid-DNA bei -20°C.

Um überprüfen zu können, ob das eluierte Plasmid Insert und Vektor der erwünschten Größe enthält, wurde ein Testverdau durchgeführt. Dieser erfolgte analog zur Restriktion der DNA und der Plasmide (siehe 5.2.4) mit dem Unterschied, dass die Ansätze insgesamt nur 10 µl aufwiesen und die Mengen an Puffer und Restriktionsenzymen dementsprechend angepasst wurden. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme, mit denen das Insert in den Vektor inkloniert wurde. Da die Inkubationszeit nur 2 h bis 5 h betrug, wurde der Testverdau immer als Doppelverdau angesetzt.

Die Analyse des Testverdaus erfolgte in einem analytischen Agarosegel (siehe 5.2.2) mit geeignetem Molekulargewichtsmarker.

5.2.11 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung wurde das *BigDye Terminator Kit* von ABI, bestehend aus der BigDye-Reaktionslösung und dem HalfTerm-Puffer, verwendet. Die Auswertung erfolgte im internen Service-Labor des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Im Anhang sind unter 11.1.2 die Temperaturprofile und Inkubationszeiten des PCR-Programms MP-Seq dargestellt. Das Reaktionsvolumen der Sequenzier-PCR-Ansätze betrug 20 µl.

2.5x HalfTerm-Puffer	4.5 µl
Plasmid-DNA	500 ng bis 750 ng
BigDye-Reaktionslösung	3.5 µl
bidest.	ad 20 µl

Abbildung 5.5: Pipettierschema für einen Sequenzier-PCR-Ansatz.

Die PCR-Produkte wurden in ein 1.5 ml Eppi überführt und 80 µl 0.3 M NaAc (pH 5.2) zugegeben. Ab hier erfolgten alle Arbeiten auf Eis, wobei die Plasmid-DNA zunächst mit 250 µl eisgekühltem, absolutem Ethanol gefällt wurde. Nach Zentrifugation (13 krpm, 4°C, 30 min.) wurde das Pellet vorsichtig mit 500 µl eisgekühltem 70%-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (13 krpm, 4°C, 2 min.). Der Überstand wurde abgesaugt und der restliche Ethanol verdunstete bei RT in den offenen, lichtgeschützten Eppis.

Die Eppis wurden ins interne Service-Labor gebracht, dort mit einem ABI PrismTM377 DNA-Sequenzierer (Applied Biosystems) analysiert und die Sequenzprofile als 4-Farben-Elektropherogramme dargestellt.

Die Auswertung der Profile erfolgte am Computer mit Hilfe einer kostenlosen Version der Software BioEdit.

5.2.12 Anlegen von Dauerkulturen und Midipräparation von Plasmid-DNA

Sobald die Korrektheit der Plasmid-DNA durch die Sequenzierung bestätigt war, wurde eine 100 ml Übernachtkultur angesetzt. 100 ml 1x LB-Medium wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt und 5 mg Ampicillin bzw. 3 mg Kanamycin sowie 20 µl der entsprechenden Minipräparation zugegeben. Nach Inkubation im Schüttelinkubator (37°C, 250 rpm) für 16 h bis 20 h wurden unter der Sterilwerkbank 500 µl der Übernachtkultur in ein 1.5 ml Eppi überführt und ca. 400 µl 87%-iges Glycerin hinzupipettiert. Diese Dauerkultur wurde gut gemischt und bei –80°C weggefroren.

Der Rest der Übernachtkultur wurde mit dem *JETstar Plasmid MIDI Kit 50* von Genomed aufgearbeitet. Dazu wurde sie auf zwei 50 ml Falconröhrchen verteilt und zentrifugiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min.). Die Pellets wurden jeweils mit 2.5 ml Midipräparationspuffer E1 resuspendiert, vereinigt und 15 min. bei RT inkubiert, um die RNase aktiv werden zu lassen. Daraufhin wurden 5 ml Midipräparationspuffer E2 zugesetzt, das Falconröhrchen vorsichtig 5x gewendet und für 5 min. inkubiert. Nach Zugabe des Midipräparationspuffers E3 zur Neutralisation und kräftigem Schütteln wurde wieder zentrifugiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min.). Parallel dazu wurden die Midipräparationssäulen mit 10 ml des Midipräparationspuffers E4 versehen, um sie zu äquilibrieren.

Der Zentrifugationsüberstand wurde in ein Flip-Cap-Röhrchen überführt und nochmals zentrifugiert (11 krpm, 4°C, 20 min.), um eine möglichst reine Plasmid-DNA-Ausbeute zu gewährleisten. Anschließend wurde der Überstand für die Bindung der Plasmid-DNA auf die äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Durchlauf wurde 2x mit 10 ml Midipräparationspuffer E5 gewaschen und mit 5 ml Midipräparationspuffer E6 eluiert.

Die DNA wurde mit 3.5 ml eisgekühltem Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (11.5 krpm, 4°C, 30 min.). Der Isopropanol wurde verworfen und das Pellet mit 8.5 ml eisgekühltem 70%-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (11.5 krpm, 4°C, 30 min.). Nach dem Trocknen des Pellets in einer Vakuumzentrifuge wurde dieses zunächst in 50 µl TE-Puffer gelöst und anschließend mit 100 µl auf 50°C vorgewärmtem bidest. nachgespült. Die Plasmid-DNA wurde in ein 1.5 ml Eppi überführt und wie schon bei der Mini-präparation (siehe 5.2.10) durch Testverdau und Agarosegel auf ihre Korrektheit überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Zum Reinigen wurde 70%-iger Ethanol verwendet. Der Umgang mit transfizierten HeLa- bzw. COS-Zellen (GVOs) erfolgte unter Beachtung des Gentechnikgesetzes ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten.

Als Nährmedium für beide Zelllinien wurde Dulbecco Modified minimal Essential Medium (DMEM) eingesetzt, je nach Anwendung mit oder ohne Zusatz von 10% FCS (fötal-les Kälberserum). Zum Waschen wurde 1x PBS und zum Ablösen der Zellen eine Trypsinlösung verwendet. Sämtliche Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf RT vorgewärmt. Um die Autoproteolyse der Trypsinlösung zu verhindern, wurde diese als 4°C kalte Lösung eingesetzt.

5.3.1 Passagieren der HeLa- und COS-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte als Monolayerkulturen im Brutschrank bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 100% in 92 x 17 mm Zellkulturschalen (Nunc). Das Passagieren, d. h. das Umsetzen der Zellen, wurde alle 2 bis 5 Tage durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in Verdünnung auf neue Zellkulturschalen transferiert und frisches Medium zugegeben. I. d. R. passierte dies bei konfluenten Zellkulturschalen.

Das alte Medium wurde abgesaugt und ca. 10 ml 1x PBS zum Waschen hinzugegeben. Nach erneutem Absaugen wurde ca. 1 ml Trypsinlösung hineinpipettiert und im Brutschrank für 4 min. bis 8 min. bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst hatten. Zur Inhibierung des Trypsins wurden 10 ml DMEM+10% FCS zugesetzt und die Zellen in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Es folgten eine Zentrifugation (800 rpm, RT, 5 min.) und das Absaugen des Überstands. In 10 ml frischem DMEM+10% FCS wurden die Zellen mittels Pipette sorgfältig resuspendiert und in geeigneter Verdünnung passagiert.

5.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl – sehr wichtig für die Transfektion, um die richtige Dichte der Zellen abschätzen und dementsprechend aussäen zu können – erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach der Resuspendierung der Zellen.

5.3.3 Transfektion

5.3.3.1 Vorbereiten der Zellkulturschalen

Die Transfektion für die transiente Expression von Plasmiden wurde in 12-Loch-Schalen (Costar) unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Schalen mussten zunächst mit sterilen Deckgläschen mit einem Durchmesser von 20 mm bestückt werden. Dafür wurden die Deckgläschen mit 70%-igem Ethanol gespült, über dem Bunsenbrenner abgeflammt und auf die einzelnen Löcher verteilt. Nach Verdampfen der Ethanolreste wurde je 1 ml Polylysinslösung hineinpipettiert, 5 min. inkubiert und das Polylysin wieder abgesaugt. Die Trocknung erfolgte unter der Sterilwerkbank bei RT.

Für das Aussäen der Zellen wurden i. d. R. konfluente Zellkulturschalen passagiert. Je nachdem, ob die Zellen nach der Transfektion 24 h oder 48 h inkubiert wurden, wurden sie auf die Löcher der 12-Loch-Schalen so verteilt, dass sie eine Ausgangsdichte von ca. 25% oder 12.5% aufwiesen. Die Kultivierung der 12-Loch-Schalen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und bei einer Luftfeuchtigkeit von 100%.

5.3.3.2 Transfektion mit dem *FuGENE 6-Reagenz*

Ungefähr 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen unter Verwendung des *FuGENE 6 Transfection Reagent* (Roche) unter der Sterilwerkbank transfiziert.

In einem sterilen 1.5 ml Eppi wurden 97 µl serumfreies DMEM bei RT vorgelegt und 3 µl des *FuGENE 6-Reagenzes* hinzugegeben. Um die Adsorption des Reagenzes an der Wandung des Eppis zu verhindern, wurde es direkt ins Medium pipettiert. Nach 5 min. Inkubation bei RT wurden 1 µg bis 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA zugesetzt. Durch Antippen wurde der Transfektionsansatz gemischt und 30 min. bis 60 min. bei RT inkubiert. Das Medium wurde von der 12-Loch-Schale abgesaugt, der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und 5 min. inkubiert. Zu guter Letzt wurden jedem der Löcher 2 ml DMEM+10% FCS zugegeben und die 12-Loch-Schalen für 24 h bis 48 h im Brutschrank bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und bei 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

In verschiedenen Versuchsreihen wurde festgestellt, dass die Lokalisation der transfizierten Plasmid-DNA unabhängig von der Inkubationszeit ist.

5.3.4 Nachweis von EGFP-Fusionsproteinen durch Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopische Detektion der EGFP-Fusionsproteine wurden in erster Linie HeLa-Zellen verwendet, nur in seltenen Fällen kamen COS-Zellen zum Einsatz.

Nach jedem Waschschrift des Protokolls wurde das 1x PBS abgesaugt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit der Transfektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Für die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen wurde 1 ml 4%-ige Formaldehydlösung zugegeben und inkubiert (8 min., RT). Danach wurde 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen, dann wurden je 100 µl der DAPI-Färbelösung zugegeben und nach 2 min. abgesaugt. Es folgte 2x Waschen mit 1 ml 1x PBS und 1x Waschen mit 1 ml bidest. Danach wurden die Zellen mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert und zum Aushärten des Mowiole 24 h bei RT ohne Lichteinwirkung inkubiert. Anschließend wurden sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 (Zeiss) bei 630-facher Vergrößerung (Objektiv: Plan Apochromat 63 /1.40 Oil Ph 3). Für die Dokumentation der Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine wurde das *Kappa Imaging System* herangezogen.

5.3.5 Nachweis von β -Gal-Fusionsproteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Sämtliche Transfektionen mit β -Galaktosidase-Fusionsproteinen wurden in COS-Zellen durchgeführt, da eine Detektion von Signalen in HeLa-Zellen nicht gelang.

Nach jedem Waschschrift des Protokolls wurde das 1x PBS abgesaugt.

Von den transfizierten Zellen wurde das Medium entfernt, diese 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen und mit 1 ml 4%-iger Formaldehydlösung fixiert (RT, 8 min.). Nach erneutem 2x Waschen mit 1 ml 1x PBS wurde mit 1 ml 0.2 M Glycinlösung inkubiert (RT, 10 min.) und 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellen wurde 1 ml 0.2% Triton X-100-Lösung zugegeben (RT, 5 min.) und 2x mit 1 ml 1x PBS gespült.

Anschließend wurde 1 ml der Blockierlösung (5%-ige Milchpulverlösung in 1x PBS) auf die Zellen gegeben und inkubiert (RT, 1.5 h bis 2 h), um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren. Nach 2x Waschen mit 1 ml 0.5%-iger Milchpulverlösung wurden die Zellen mit 100 µl des β -Galaktosidase-Antikörpers (Abcam) (Verdünnung 1:200 in 1x PBS) versetzt, Parafilm auf die Deckgläschen gegeben und die 12-Loch-Schale im Kühlschrank inkubiert (4°C, 16 h bis 20 h). Der Parafilm wurde entfernt, der Antikörper abgesaugt und 3x mit 1 ml 0.5%-iger Milchpulverlösung gespült. Da der Antikörper bereits mit dem Chromophor FITC konjugiert ist, entfiel die Zugabe eines Zweitantikörpers. Da-

her wurde direkt im Anschluss 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen, je 100 µl der DAPI-Färbelösung zugegeben und letztendlich 2x mit 1 ml 1x PBS und 1x mit 1 ml bidest. gespült.

Eindeckeln der Zellen mit Mowiol, Lagerung und Detektion im Fluoreszenzmikroskop verliefen wie unter 5.3.4 bereits beschrieben.

5.3.6 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe des Vektors pcDNA5/FRT/TO in der Transfektion wurden die ribosomalen Proteine S9 von *E. coli* bzw. *T. thermophilus* ohne Reportermolekül in HeLa-Zellen exprimiert. Für deren Detektion wurde als Erstantikörper ein polyklonaler S9-Antikörper aus dem Schaf eingesetzt (Verdünnung 1:100 in 1x PBS), als Zweitantikörper diente ein polyklonaler Antikörper gegen Schaf-Immunglobuline von Molecular Probes (Verdünnung 1:200 in 1x PBS), der mit dem Alexa Fluor 488 konjugiert ist und im Fluoreszenzmikroskop ein grünes Leuchten bewirkt.

Optional wurde zusätzlich zum Erstantikörper der Ak Ki-67 (Becton Dickinson) in einer Verdünnung von 1:40 zugegeben, der die Nukleoli der transfizierten Zellen rötlich leuchten lässt.

Um den Antikörpern die Bindung innerhalb der Zellen zu ermöglichen, mussten diese mittels Triton X-100 permeabilisiert werden.

Das Protokoll entspricht dem unter 5.3.5 beschriebenen, nur dass nach der Inkubation mit dem Erstantikörper und dem 3x Waschen mit 1 ml 0.5%-iger Milchpulverlösung mit dem Zweitantikörper inkubiert wurde (RT, 1 h bis 1.5 h). Nach dem Absaugen wurden die Zellen dann erneut 3x mit 1 ml 0.5%-iger Milchpulverlösung gewaschen und im Weiteren so behandelt wie unter 5.3.5 beschrieben.

5.3.7 Ribosomenpräparation

Ribosomen wurden aus HeLa- und COS-Zellen isoliert. Optional wurde den Zellen 10 min. vor dem Abtrypsinieren Cycloheximid (50 µg/ml) zugegeben (gelöst in DMEM+10% FCS) und bei RT inkubiert. Das Antibiotikum Cycloheximid hemmt die Translation von Eukaryonten, die gerade aktiven Polysomen dissoziieren nicht mehr von der mRNA ab, so dass deren Anteil bei der Zellfraktionierung erhöht werden kann (Wettstein et al., 1964).

Zunächst wurden die Zellen auf einer 92 x 17 mm Zellkulturschale (Nunc) ausgesät, so dass diese eine Zelldichte von etwa 25% aufwies. Nach 24 h wurden die Zellen wie unter 5.3.3.2 beschrieben transfiziert (nur die Negativkontrolle blieb unbehandelt), wobei die

eingesetzten Mengen angepasst wurden, so dass 240 µl vorgelegtem serumfreiem DMEM-Medium 10 µl *FuGENE 6-Reagenz* und 5 µg bis 7.5 µg Plasmid-DNA zugegeben wurden. Nach ca. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und bei einer Luftfeuchtigkeit von 100% wurde die konfluente Schale 1x mit 10 ml 1x PBS gewaschen, die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung abtrypsinisiert, in 10 ml DMEM+10% FCS aufgenommen und zentrifugiert (800 rpm, RT, 5 min.).

Das Medium wurde abgesaugt und ab hier erfolgten alle Arbeiten auf Eis und mit auf 4°C vorgekühlten Puffern.

Den 15 ml Falconröhrchen mit den Zellpellets wurden 10 ml 1x PBS hinzugefügt und die Zellen durch leichtes Schütteln resuspendiert. Es folgten Zentrifugation (800 rpm, 4°C, 5 min.) und erneutes Resuspendieren in 10 ml 1x PBS. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und die Zellen am Ende in 1 ml 1x PBS aufgenommen und in ein 1.5 ml Eppli überführt. Nach erneuter Zentrifugation (1.600 rpm, 4°C, 4 min.) wurden sie in 500 µl 1x RSB-Puffer resuspendiert und 5 min. zum Schwellen auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden 55 µl 10%-iges Triton X-100 zupipettiert (Endkonzentration des Triton X-100 betrug 1%), gemischt und 2 min. auf Eis ruhen gelassen. 50 µl dieses Gesamtzelllysats wurden in ein 1.5 ml Eppli abgefüllt und bei –20°C weggefroren.

Nach Zentrifugation der verbliebenen Zellen (4 krpm, 4°C, 5 min.) zur Pelletierung der Zellkerne, wurde der postnukleare Überstand in ein neues 1.5 ml Eppli überführt. Die pelletierten Zellkerne wurden nochmals mit 225 µl 1x RSB-Puffer sowie 25 µl 10% Triton versehen, gemischt und zentrifugiert (4 krpm, 4°C, 5 min.). Der Überstand wurde mit dem postnuklearen Überstand in dem anderen Eppli vereinigt und das Zellkernpellet mit 300 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei –20°C weggefroren.

Nun wurden in einem Ultrazentrifugenröhrchen 3 ml des 2 M STKM-Kissens vorgelegt und der postnukleare Überstand vorsichtig auf das Kissen geschichtet. Ca. 50 µl des postnuklearen Überstands wurden für die spätere Immunzytologie im Eppli belassen und bei –20°C weggefroren.

Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden für mindestens 15 h zentrifugiert (40 krpm, 4°C), der Überstand als Kontrolle in ein 1.5 ml Eppli überführt und das Ribosomenpellet sorgfältig in 100 µl 1x RSB-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

5.3.8 Puromycinbehandlung von Polysomen

Puromycin ist ein Aminoacyl-tRNA-Analogon, das den Abbruch der Peptidsynthese bedingt, und unter Hochsalz zur Dissoziation der ribosomalen 40S und 60S Untereinheiten führt, so dass keine 80S Ribosomen bzw. Polysomen mehr vorliegen (Nathans, 1964).

Zu 100 µl der in 5.3.7 beschriebenen isolierten Ribosomen wurden 20 µl 10 mM Puromycinlösung und 100 µl 1x Kompensationspuffer gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (37°C, 10 min.), vorsichtig auf einen 10%- bis 30%-igen Sucrosegradienten im Hochsalzpuffer geladen und im SW 41-Rotor zentrifugiert (40 krpm, 18°C, 2 h 45 min.). Die Gradienten wurden kontinuierlich von oben abgesaugt, und die optische Dichte wurde direkt mit einem UV-Durchflussphotometer bei 260 nm verfolgt, so dass die 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten getrennt gesammelt werden konnten. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation der Ribosomenfraktionen im Ti 60-Rotor (40 krpm, 4°C, 16 h) und die Resuspendierung der Untereinheitenpellets in 50 µl RSB. Gelagert wurden die Proben bei -20°C.

5.3.9 Fraktionierung der 40S, 60S und 80S Ribosomen sowie der Polysomen

100 µl des in 5.3.7 beschriebenen postnuklearen Überstands wurden auf einen 10%- bis 40%-igen Sucrosegradienten geladen und zentrifugiert (40 krpm, 4°C, 90 min.). Die Gradienten wurden kontinuierlich von oben abgesaugt, was mit einem UV-Durchflussphotometer bei 260 nm verfolgt wurde, und mittels Fraktionssammler in 15 bis 25 gleich großen Fraktionen gesammelt.

Jede Fraktion wurde mit 100%-iger Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) für 30 min. auf Eis gefällt, zentrifugiert (13 krpm, 4°C, 15 min.), mit 1 ml Aceton gewaschen und wieder zentrifugiert (13 krpm, 4°C, 10 min.). Die Pellets wurden in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Proben bei -20°C gelagert.

5.3.10 Hochsalzbehandlung der Ribosomen

Für die Hochsalzbehandlung der Ribosomenextrakte wurden drei verschiedene Hochsalzpuffer mit KCl-Konzentrationen von 150 mM, 300 mM und 500 mM verwendet.

10 µl der in 5.3.7 beschriebenen präparierten Ribosomen wurden mit 750 µl des entsprechenden Puffers vereinigt und vorsichtig auf 1 ml eines 2 M STKM-Kissens geladen, dessen KCl-Konzentration jeweils angepasst worden war. Abbildung 5.6 gibt die genauen Mengen an:

STKM-Kissen		2 M STKM	2 M KCl	1 M Tris-HCl	2 M MgCl ₂	bidest.
1	für 150 mM	500 µl	75 µl	25 µl	2.5 µl	ad 1 ml
2	für 300 mM	500 µl	150 µl	25 µl	2.5 µl	ad 1 ml
3	für 500 mM	500 µl	250 µl	25 µl	2.5 µl	ad 1 ml
Ribosomen		Ribosomen	2 M KCl	1 M Tris-HCl	2 M MgCl ₂	bidest.
1	für 150 mM	10 µl	56 µl	37.5 µl	3.75 µl	ad 750 µl
2	für 300 mM	10 µl	112 µl	37.5 µl	3.75 µl	ad 750 µl
3	für 500 mM	10 µl	187.5 µl	37.5 µl	3.75 µl	ad 750 µl

Abbildung 5.6: **Pipettierschema für die Hochsalzbehandlung der Ribosomen.**

Es erfolgte eine Zentrifugation im Ti 50-Rotor (40 krpm, 4°C, 16 h). Der Überstand wurde überführt und die verbliebenen Pellets nach Aufnahme in 15 µl 1x SDS-Probenpuffer bei –20°C weggefroren.

Die Fällung des Überstands geschah mit 100%-iger Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) für 30 min. auf Eis, anschließend wurde zentrifugiert (13 krpm, 4°C, 15 min.), mit 1 ml Aceton gewaschen und wieder zentrifugiert (13 krpm, 4°C, 10 min.). Die Pellets wurden in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Proben bei –20°C gelagert.

5.4. Proteinchemische Methoden

Die Analyse sämtlicher Proben, die in den unter 5.3.7 bis 5.3.10 beschriebenen Protokollen gewonnen wurden, erfolgte wie im folgenden beschrieben.

5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine aufzutrennen, wurde ein SDS-PAGE (Laemmli, 1970), bestehend aus Sammel- und Trenngel, gegossen. Folgendes Pipettierschema gibt die Zusammensetzung eines 5%-igen Sammelgels sowie eines 15%- bzw. 17.5%-igen Trenngels wieder:

	Sammelgel 5%	Trenngel 15%	Trenngel 17.5%
bidest.	1.38 ml	2.5 ml	1.9 ml
3 M Tris-HCl (pH 8.9)	-	875 µl	875 µl
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	250 µl	-	-
30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid	340 µl	3.5 ml	4.1 ml
	<i>Entgasen</i>	<i>Entgasen</i>	<i>Entgasen</i>
10% SDS	20 µl	70 µl	70 µl
Temed	2 µl	7 µl	7 µl
10% APS	5 µl	20 µl	20 µl

Abbildung 5.7: Pipettierschema für ein 5%-iges Sammelgel und ein 15%- bzw. 17.5%-iges Trenngel.

Um das SDS-PAGE zu gießen, wurden zunächst die Glasplatten mit Spülmittel gereinigt und abgetrocknet. Nach Anlegen des Abstandshalters der Glasplatten, wurden diese zusammengelegt und mit Klammern befestigt.

Die ersten drei Substanzen wurden in einem 50 ml Falconröhrchen zusammenpipettiert und im Vakuum-Exsikator entgast. Darauf erfolgte die Zugabe der restlichen Chemikalien und das Trenngel wurde bis ca. 2 cm vor dem oberen Rand zwischen die Platten eingefüllt und mit ca. 200 µl bidest. überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von mind. 30 min. wurde das überstehende bidest. weggekippt, die Sammelgellösung eingefüllt sowie die Schablone für die Probestaschen eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation wurden Schablone, Klammern und Abstandhalter entfernt und das Gel bis zum Lauf bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die Proteinproben wurden mit Hilfe des 4x SDS-Probenpuffers auf eine einfache SDS-Endkonzentration verdünnt, so dass jeweils 5% β -Mercaptoethanol enthalten waren. Das

Probenvolumen betrug 15 µl bis 30 µl. Anschließend wurden die Proben 5 min. bei 96°C erhitzt.

Die Gelkammer wurde in die Elektrophoreseapparatur gesetzt, 1x PAA-Laufpuffer zugegeben und die denaturierten Proteinproben in die jeweiligen Probentaschen eingefüllt. Nach Zugabe eines geeigneten Molekulargewichtsmarkers wurde die Elektrophorese bei 20 mA gestartet. Sie wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Front das Ende des Laufgels erreichte, oder – im Falle der gefärbten Proteinleiter – die gewünschte Laufhöhe erreicht war, die während der Elektrophorese an den gefärbten Banden des Markers abgelesen werden konnte.

5.4.2 Western Blot

Für den Western Blot wurden die Nitrocellulosemembran (Hybond C-Extra Nitrocellulosemembran, Amersham Bioscience) und 15 Whatman 3 MM Filterpapiere entsprechend der Größe des zu blottenden SDS-PAGE zurechtgeschnitten.

Die Semi-Dry-Blotting Apparatur wurde wie folgt zusammengebaut, wobei durch Walzen mit einer Bürette sorgfältig darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen zwischen den Granitplatten und den einzelnen Filterpapierschichten entstanden:

Kathode

7 Lagen in Transferpuffer III getränktes Filterpapier

SDS-PAGE

Nitrocellulosemembran (in Transferpuffer II getränkt)

3 Lagen in Transferpuffer II getränktes Filterpapier

5 Lagen in Transferpuffer I getränktes Filterpapier

Anode

Der Deckel der Blotting Apparatur wurde aufgesetzt und mit ca. 1 kg beschwert. Der Proteintransfer erfolgte bei 60 mA bis 70 mA.

5.4.3 Immunologischer Nachweis der geblotteten Proteine

Alle Inkubations- und Waschschr tte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Vor dem immunologischen Nachweis wurde die Nitrocellulosemembran mit der Ponceau-Färbelösung inkubiert (RT, 2 min.), um zu überprüfen, ob generell ein Transfer von Proteinen stattgefunden hat. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit bidest. gespült, bis deutliche Proteinbanden zu unterscheiden waren. Mit Kugelschreiber wurden die Markerbanden gekennzeichnet und die Nitrocellulosemembran mit ca. 15 ml Blockierlösung (5% Milchpulver in 1x TBS-Tween) für 1 h bis 2 h bei RT inkubiert.

Es folgten drei Waschschr tte mit 15 ml 1x TBST (RT, 5 min.) und die Zugabe von 15 ml der jeweiligen Erstantik rperl sung. Die Antikörper wurden in 15 ml 4 C kalter Blockierlösung verdünnt, im Falle des polyklonalen S9-Antikörpers aus dem Schaf im Verhältnis 1:5.000, beim polyklonalen S16-Antikörper aus Kaninchen 1:1.600 und beim Anti-S6-Ak 1:1.000. Inkubiert wurde für mindestens 16 h bei 4 C auf dem Schüttler.

Die Ak-Lösungen wurden bei -20 C weggefroren und die Nitrocellulosemembran 5x mit 1x TBST (RT, 5 min.) gewaschen. Es folgte die Detektion mit den entsprechenden HRP-konjugierten Zweitantikörpern gegen Schaf- bzw. Kaninchen-Immunglobuline. Auch diese wurden in 15 ml Blockierlösung verdünnt (1:5.000) und für 1 h bis 1.5 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach wiederum 5 Waschschr tten mit 1x TBST (RT, 5 min.) wurde die Nitrocellulosemembran in eine trockene Plastikscha e überführt.

Die Detektion erfolgte mittels *ECL Plus Detektionskit* (GE Healthcare Europe GmbH). Hierfür wurden Lösung A und B im Verhältnis 40:1 gemischt und auf der Nitrocellulosemembran inkubiert (RT, 5 min.). Die Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt, in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 2 s bis 20 min. aufgelegt und dieser anschließend entwickelt.

6. Ergebnisse

6.1 Aktiver Import des ribosomalen Proteins S9 der Prokaryonten *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* in den Zellkern eukaryontischer Zellen

Im Gegensatz zu Eukaryonten besitzen Prokaryonten keinen Zellkern. Daher würde man erwarten, dass prokaryontische ribosomale Proteine nicht aktiv in den Nukleus eukaryontischer Zellen importiert werden, was auch in der einschlägigen Literatur über Kernlokalisierungssignale Erwähnung findet (Rout et al., 1997; Wool et al., 1995). Aufgrund von gegenteiligen Beobachtungen zu Beginn dieser Arbeit wurde entschieden, dieses Phänomen genauer zu analysieren und durch geeignete Experimente zu verifizieren.

6.1.1 Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren und Lokalisation der exprimierten Proteine

Um untersuchen zu können, ob das ribosomale Protein S9 (RPS9) der Prokaryonten *Escherichia coli* (*E. coli*, Ec) und *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*, Tt) aktiv - also durch Interaktion mit Importinen - in den Zellkern eukaryontischer Zellen importiert wird, wurde das RPS9 jeweils in geeignete Expressionsvektoren kloniert. Dadurch konnte es als Fusionsprotein, entweder gekoppelt an das grün fluoreszierende Protein EGFP oder an das Enzym β -Galaktosidase, exprimiert werden. Nach Transfektion eukaryontischer Zelllinien wurde die Lokalisation der Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

6.1.1.1 Klonierung der Plasmide für EGFP-Fusionsproteine

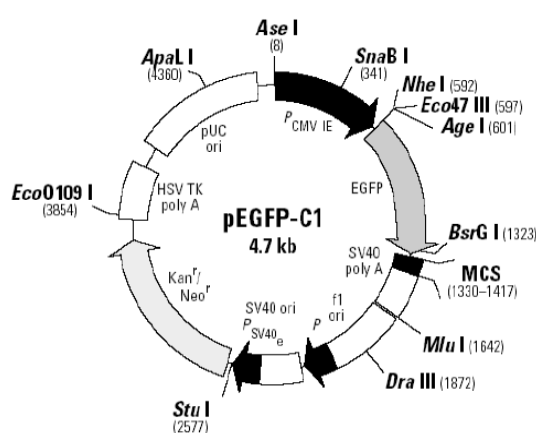


Abbildung 6.1: Vektorkarte des
pEGFP-C1-Vektors.

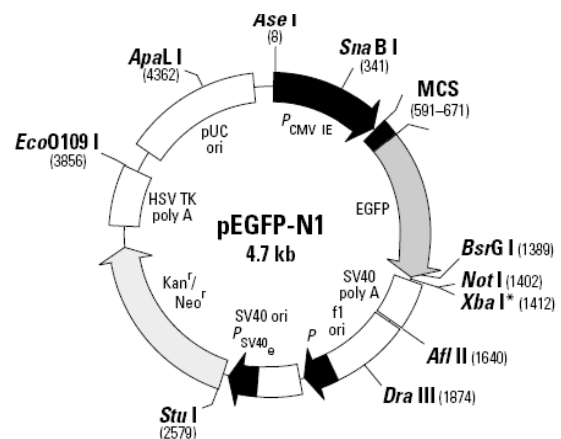


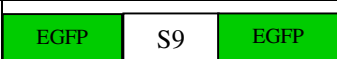
Abbildung 6.2: Vektorkarte des
pEGFP-N1-Vektors.

(Die Vektorkarten wurden übernommen von www.bdbiosciences.com)

Die Expression von EGFP-Fusionsproteinen wurde durch Klonierung von ribosomalen Proteinen in die Expressionsvektoren pEGFP-C1 bzw. pEGFP-N1 ermöglicht. Beide kodieren für eine rot verschobene Variante des Wildtyp-GFP (Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994), die zugunsten einer helleren Fluoreszenz und höheren Expressionsrate in Mammalia-Zellen optimiert wurde. Sie unterscheiden sich nur dadurch, dass die exprimierten Fusionsproteine entweder an ihrem N-Terminus (pEGFP-C1) oder ihrem C-Terminus (pEGFP-N1) mit EGFP derivatisiert sind.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass eine passive Diffusion der Fusionsproteine aufgrund ihres Molekulargewichts (MW) von ca. 41 kDa (27 kDa des EGFP + theoretisch berechnete 14 kDa des RPS9) nicht ausgeschlossen werden kann (Gerace und Burke, 1988; Wang und Clapham, 1999). Daher wurden die Vektoren derart modifiziert, dass sie ein bzw. zwei zusätzliche EGFP exprimierten. Folgende Plasmide wurden für die Importversuche der EGFP-Fusionsproteine konstruiert, wobei das RPS9 sowohl von *E. coli* als auch von *T. thermophilus* analog einkloniert wurde:

Tabelle 6.1: Konstruierte EGFP-Plasmide und Lokalisation der EGFP-Reporter am RPS9.

Plasmide	Lokalisation der EGFP-Reporter	
pEGFP-C1 + RPS9	einfach N-terminal	
pEGFP-C1x2 + RPS9	zweifach N-terminal	
pEGFP-N1 + RPS9	einfach C-terminal	
pEGFP-N1x2 + RPS9	einfach N-terminal sowie einfach C-terminal	
pEGFP-N,Cx3 + RPS9	zweifach N-terminal sowie einfach C-terminal	

Die Primer für diese Klonierung sind im Anhang unter 11.2.1 abgebildet.

In einem ersten Schritt wurden die RPS9-Gensequenzen über PCR amplifiziert. Als Templat diente die jeweilige genomische DNA der Bakterien. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind III* und *EcoR I* in die Vektoren pEGFP-C1 bzw. pEGFP-N1 kloniert.

Um die durch diese Plasmide kodierten Fusionsproteine um ein weiteres EGFP zu verlängern, wurde in einer zweiten PCR die Gensequenz des EGFP amplifiziert, wobei als Templat der pEGFP-C1-Vektor herangezogen wurde. Nach Restriktion mit den Enzymen

Bgl II und *Hind III* konnte das EGFP jeweils in die ebenfalls verdauten Plasmide pEGFP-C1+RPS9Ec bzw. pEGFP-C1+RPS9Tt ligiert werden. In einer weiteren PCR wurden dann die DNA-Sequenzen, die für EGFP-S9Ec bzw. EGFP-S9Tt kodieren, vervielfältigt, und unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bgl II* und *EcoR I* in den Vektor pEGFP-N1 ligiert. Diese PCR war notwendig, um den offenen Leserahmen der Fusionsproteine beizubehalten.

Zu guter Letzt wurden dann durch Restriktion mit den Enzymen *Nhe I* und *EcoR I* Plasmide konstruiert, die für die Fusionsproteine EGFP-EGFP-S9Ec-EGFP bzw. EGFP-EGFP-S9Tt-EGFP kodieren.

6.1.1.2 Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine

Die Plasmide für die EGFP-Fusionsproteine wurden in kompetente *E. coli-DH5α*-Zellen transformiert und deren DNA isoliert. Die durch Sequenzierung bestätigte Plasmid-DNA konnte in eukaryontischen Zelllinien transfiziert werden.

Die EGFP-Fusionsproteine wurden in erster Linie in HeLa-Zellen exprimiert, zur Kontrolle auch in COS-Zellen, um Unterschiede in deren Lokalisation aufgrund der verwendeten Zelllinie ausschließen zu können. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

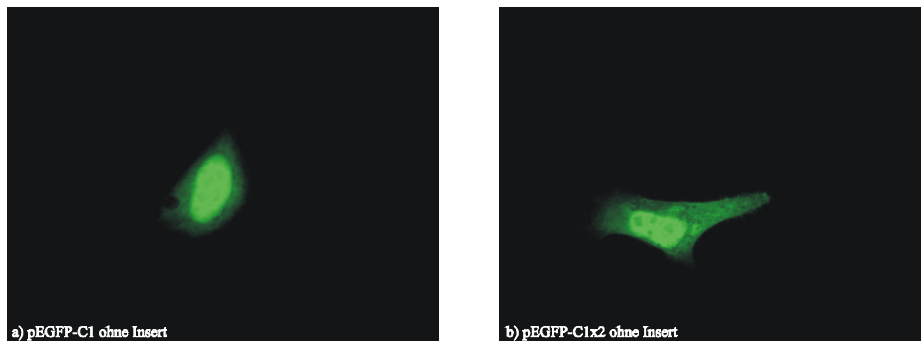


Abbildung 6.3: Intrazelluläre Lokalisation der Proteine EGFP bzw. EGFP-EGFP in HeLa-Zellen.

Die Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1 und (b) pEGFP-C1x2, jeweils ohne Insert.

In Abbildung 6.3 sieht man, dass HeLa-Zellen, die mit den Vektoren pEGFP-C1 bzw. pEGFP-C1x2 jeweils ohne Insert transfiziert wurden, eine deutliche nukleare Akkumulation der exprimierten Proteine zeigen. In (a) wird nur das Protein EGFP, in (b) hingegen ein Protein mit zwei aufeinander folgenden EGFP exprimiert. Obwohl diese Proteine definitiv kein Kernlokalisierungssignal besitzen, diffundieren sie in den Nukleus der HeLa-Zellen. Dieser Befund wird in der Diskussion erläutert. Man sieht, dass das Zytoplasma der HeLa-Zellen eindeutig eine grüne Fluoreszenz aufweist. Die Nukleoli sind im Nukleo-

plasma nicht durch eine intensivere Färbung erkennbar, d. h. beide grün fluoreszierenden Proteine akkumulieren dort nicht. Diese Aufnahmen dienen als Vergleich, um bei den weiteren EGFP-Konstrukten Rückschlüsse auf eine passive Diffusion ziehen zu können.

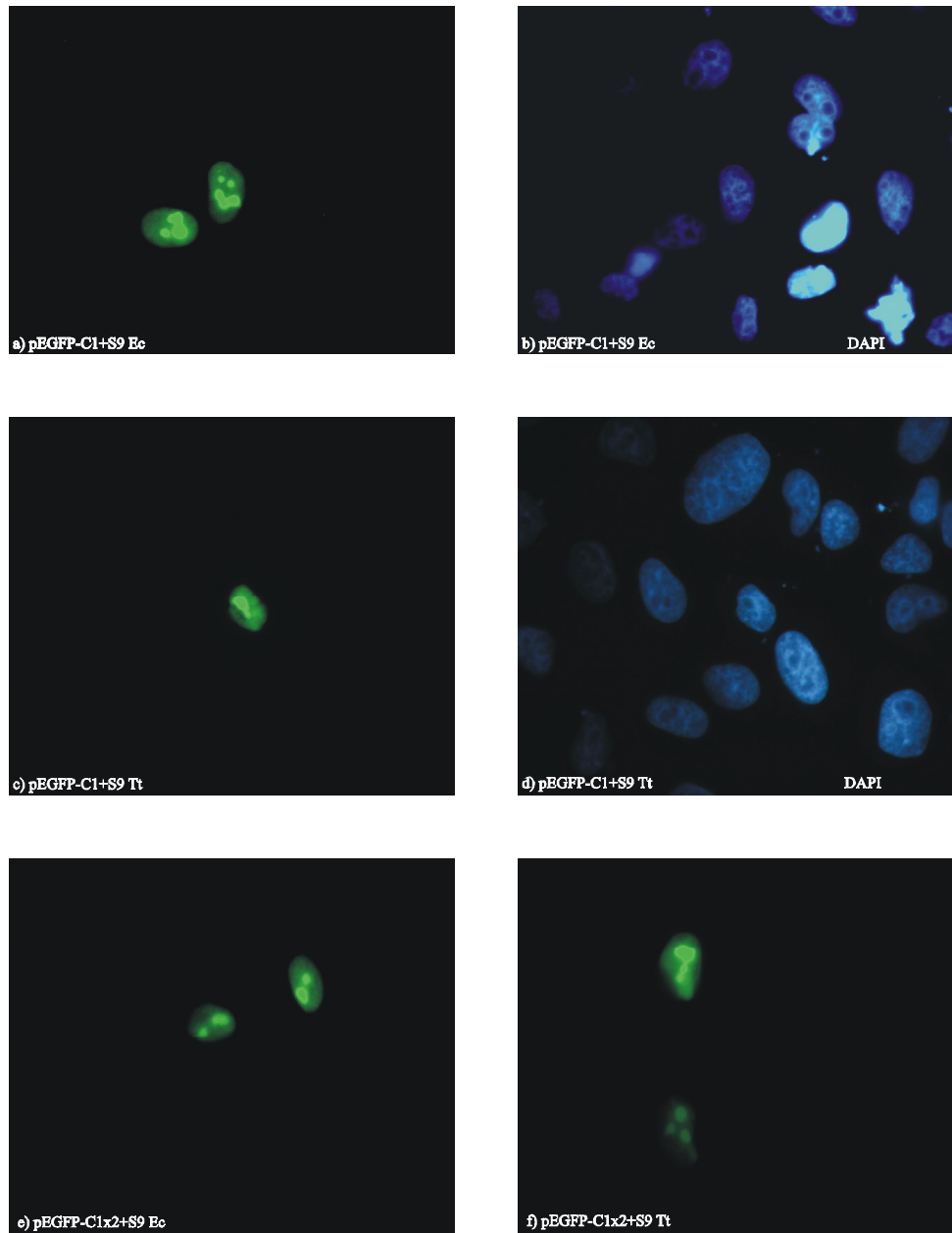


Abbildung 6.4: **Intrazelluläre Lokalisation der S9-EGFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen.**

Die Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1+S9Ec, (c) pEGFP-C1+S9Tt, (e) pEGFP-C1x2+S9Ec und (f) pEGFP-C1x2+S9Tt; (b) und (d) zeigen die jeweilige DAPI-Färbung zu (a) und (c); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Die Abbildung 6.4 zeigt die Fusionsproteine mit einem einfachen bzw. zweifachen EGFP-Reporter am N-Terminus. Zur Kontrolle sind die entsprechenden DAPI-Aufnahmen dargestellt, in denen nur der Zellkern blau angefärbt ist und die Nukleoli deutlich ausgespart

sind. DAPI wird in der Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von DNA eingesetzt, da es sich an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert und bei Anregung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich blau fluoresziert.

Die Fusionsproteine beider Prokaryonten finden sich eindeutig nur im Nukleoplasma und akkumulieren dort stark in den Nukleoli, erkennbar an der intensiveren Färbung. Das Zytoplasma weist keinerlei Fluoreszenz auf. Diese Beobachtungen gelten sowohl für das einfach als auch das zweifach derivatisierte RPS9.

Um feststellen zu können, ob der Terminus, an welchem das EGFP derivatisiert ist, von Bedeutung für die Lokalisation ist, wurden die RPS9 umklontiert, so dass EGFP C-terminal exprimiert wird.

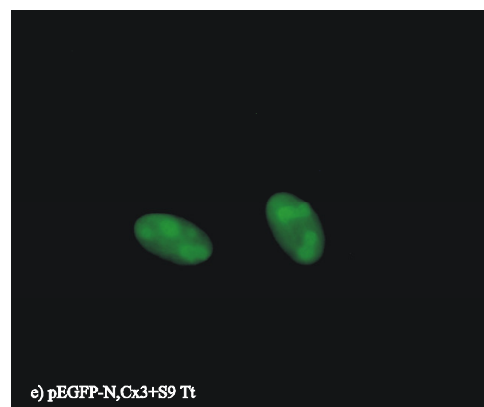
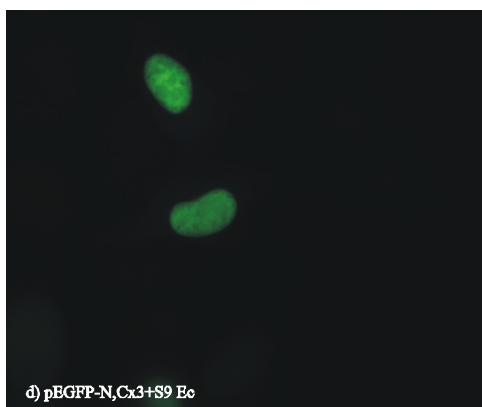
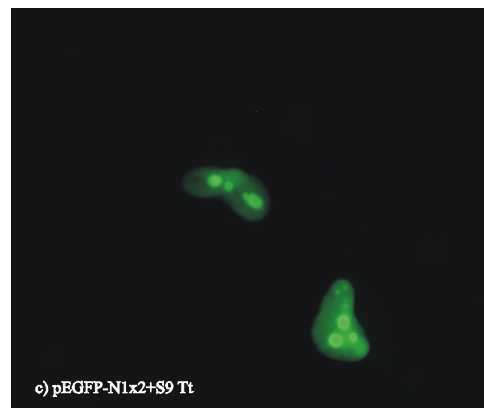
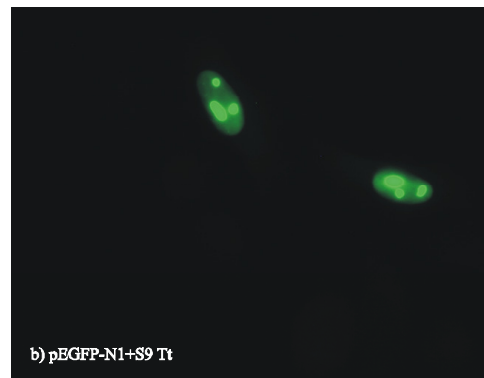
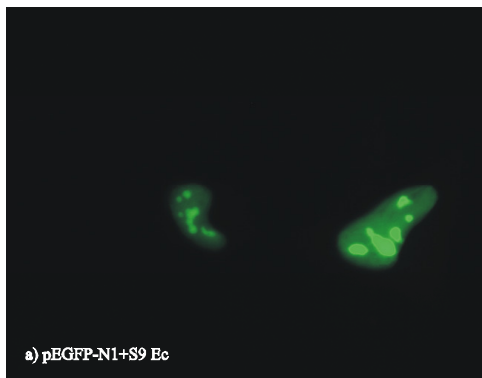


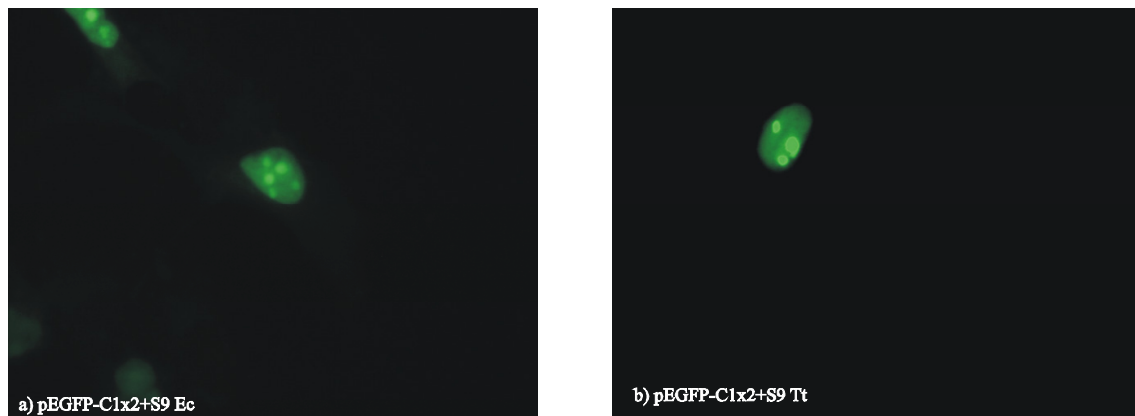
Abbildung 6.5: **Intrazelluläre Lokalisation der S9-EGFP-Fusionsproteine mit EGFP am C-Terminus.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-N1+S9Ec, (b) pEGFP-N1+S9Tt, (c) pEGFP-N1x2+S9Tt, (d) pEGFP-N,Cx3+S9Ec und (e) pEGFP-N,Cx3+S9Tt; für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Diese Bilder veranschaulichen, dass es für die Lokalisation der einfach bzw. zweifach derivatisierten RPS9 unerheblich ist, ob das EGFP am N- oder am C-Terminus des Fusionsproteins exprimiert wird. Bei den C-terminalen Konstrukten in (a), (b) und (c) ist ebenfalls ein Import ins Nukleoplasma und eine deutliche Akkumulation in den Nukleoli zu beobachten.

Betrachtet man hingegen die Aufnahmen der dreifach derivatisierten RPS9 fällt auf, dass zwar auch hier ein Import ins Nukleoplasma festzustellen ist, allerdings die Akkumulation an den Nukleoli eindeutig schwächer ausfällt als bei den kürzeren Fusionsproteinen. Dennoch kann im Falle des RPS9 von *E. coli* eine schwache Akkumulation um die Nukleoli herum, und beim RPS9 von *T. thermophilus* in den Nukleoli beobachtet werden. Warum diese schwächer ausfällt, wird später eingehend diskutiert werden.

Da die Expression der β -Galaktosidase-Fusionsproteine nur in COS-Zellen gelang, wurden exemplarisch die zweifach N-terminal mit EGFP fusionierten RPS9 in COS-Zellen transfiziert, um mögliche zellabhängige Unterschiede in deren Lokalisation aufzudecken.

Abbildung 6.6: **Intrazelluläre Lokalisation der S9-EGFP-Fusionsproteine in COS-Zellen.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1x2+S9Ec und (b) pEGFP-C1x2+S9Tt; für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Auch hier finden sich die exprimierten Proteine nur im Nukleoplasma und akkumulieren deutlich in den Nukleoli, so dass kein Unterschied hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine zwischen den transfizierten HeLa- bzw. COS-Zellen besteht.

6.1.1.3 Klonierung der Plasmide für β -Galaktosidase-Fusionsproteine

Die mit den EGFP-Fusionsproteinen erhaltenen Ergebnisse sollten durch β -Galaktosidase-Fusionsproteine bestätigt werden, da die Größenangabe der Proteine, die frei durch den Kernporenkomplex (NPC) diffundieren können, in der Literatur zwischen 30 kDa und 60 kDa schwankt. Das Enzym β -Galaktosidase (β -Gal) bildet ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 464 kDa, das nur durch aktiven Import durch den NPC in das Nukleoplasma gelangen kann.

Für die Konstruktion dieser Fusionsproteine wurde auf den Vektor pASH zurückgegriffen, der bereits im Rahmen anderer Studien in diesem Arbeitskreis entwickelt wurde (Lipsius et al., 2005).

Dieser enthält einen RSV-Promoter, der für die Kontrolle des eingebrachten Inserts verantwortlich ist, und am C-Terminus der MCS (*Multiple cloning site*) befindet sich das lacZ-Gen, das bei Expression in eukaryontischen Zellen für die C-terminale Derivatisierung des Inserts mit β -Gal sorgt.

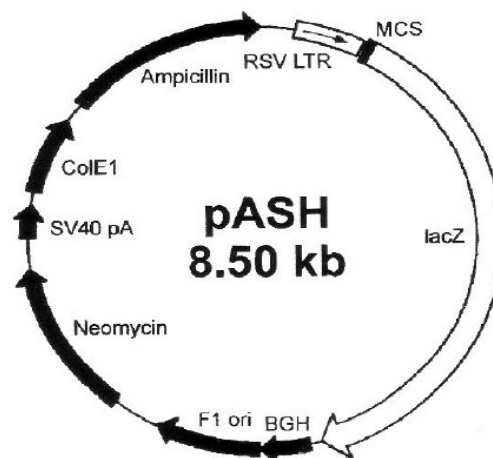


Abbildung 6.7: Vektorkarte des pASH-Vektors.

(Lipsius et al., 2005)

Die für die Klonierung verwendeten Primer finden sich im Anhang unter 11.2.2. Die Gensequenzen der RPS9 von *E. coli* und *T. thermophilus* wurden über PCR amplifiziert, wobei wiederum die jeweilige genomische DNA der Bakterien als Templat fungierte. Die Restriktion erfolgte mit den Enzymen *Afl II* und *Hind III*, so dass die DNA aus der PCR in den pASH-Vektor kloniert werden konnte.

6.1.1.4 Lokalisation der β -Galaktosidase-Fusionsproteine

Die Plasmide für die β -Gal-Fusionsproteine wurden in kompetente *E. coli-InvF'* α -Zellen transformiert und deren Plasmid-DNA isoliert. Nach der Überprüfung ihrer Sequenz wurden sämtliche β -Gal-Fusionsproteine in COS-Zellen exprimiert und im Fluoreszenzmikroskop deren Lokalisation analysiert.

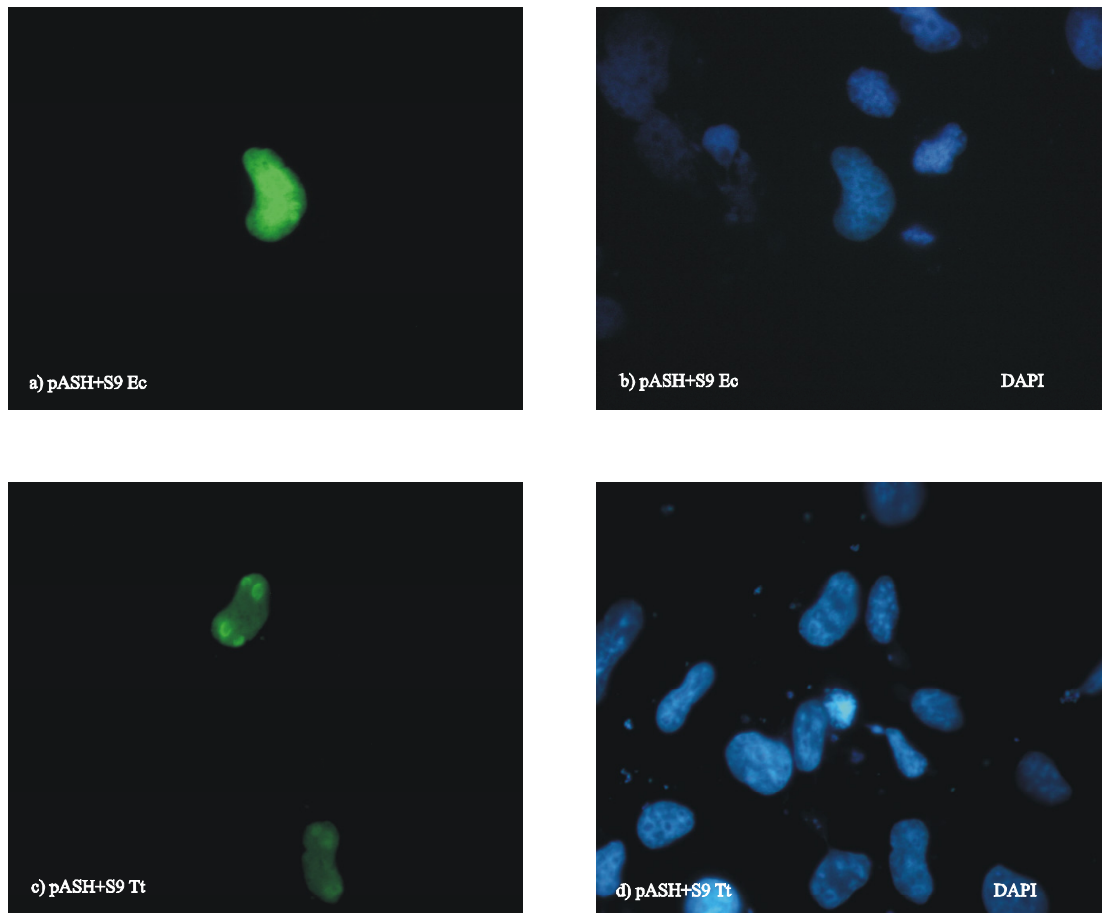


Abbildung 6.8: Intrazelluläre Lokalisation der S9- β -Gal-Fusionsproteine in COS-Zellen.

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S9Ec und (c) pASH+S9Tt; (b) und (d) zeigen die jeweilige DAPI-Färbung zu (a) und (c); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Die mit β -Gal am C-Terminus derivatisierten RPS9 von Ec und Tt sind beide im Nukleoplasma lokalisiert, sie werden also aktiv ausschließlich in den Zellkern der COS-Zellen importiert, da keine zytoplasmatische Fluoreszenz beobachtet werden kann. Zudem akkumulieren sie an den Nukleoli, was besonders im Falle des RPS9Tt in Abbildung 6.8 (c) eindeutig zu sehen ist.

Interessanterweise fällt diese Akkumulation im Vergleich mit den ein- bzw. zweifach derivatisierten EGFP-Fusionsproteinen deutlich geringer aus, die im Gegensatz zu den β -Gal-

Fusionsproteinen die kompletten Nukleoli ausfüllen. Diese ringförmige Akkumulation um die Nukleoli konnte schon bei den dreifach derivatisierten EGFP-Fusionsproteinen beobachtet werden und wird in der Diskussion ausführlich behandelt.

6.1.1.5 Klonierung der Plasmide der RPS9 ohne Reportermolekül

Die S9-Proteine von Ec und Tt wurden in den Vektor pcDNA5/FRT/TO kloniert, um ihre Expression in eukaryontischen Zellen ohne Reportermolekül zu ermöglichen. Nach der Transfektion konnten die exprimierten Proteine dann entweder über geeignete Antikörper wiederum fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert werden, oder aus den Zellen verschiedene Zellfraktionen extrahiert und deren Proteinzusammensetzung analysiert werden. Dabei sollten in erster Linie extrahierte Ribosomen nach Dissoziation in 40S und 60S Untereinheiten auf einen evtl. Einbau der S9-Proteine in die kleine ribosomale Untereinheit hin untersucht werden.

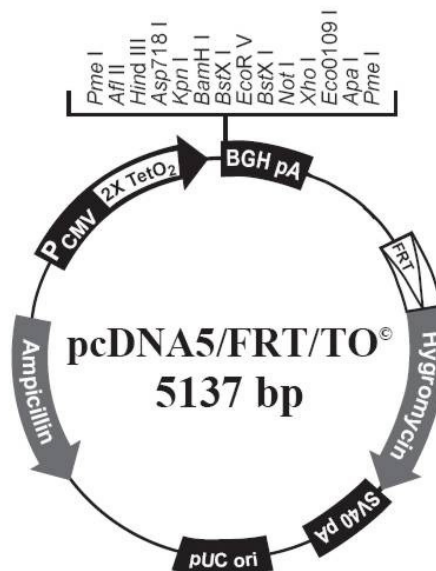


Abbildung 6.9: Vektorkarte des pcDNA5-Vektors mit MCS.

(Die Vektorkarte wurde übernommen von www.invitrogen.com)

Durch PCR wurden die RPS9 aus der genomischen DNA der Bakterien herauskloniert. Die verwendeten Primer sind im Anhang unter 11.2.3 zu finden. Dabei entstanden Amplifikate, in die zusätzlich eine Kozak-Sequenz eingebracht wurde, die die Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen steigert (Kozak, 1984). Nach Restriktion der Amplifikate mit den Enzymen *Hind III* und *EcoR V* wurden sie in den Vektor pcDNA5/FRT/TO kloniert, der eine hohe Expressionsrate der Proteine nach Transfektion in eukaryontische Zellen bewirkt.

6.1.1.6 Lokalisation der RPS9 von Ec und Tt

Die RPS9-Plasmide wurden in kompetente *E. coli*-DH5 α -Zellen transformiert, aufgearbeitet und sequenziert.

Beide S9-Proteine wurden in HeLa-Zellen exprimiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen das RPS9 von *T. thermophilus* detektiert. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper auch das RPS9 von *E. coli* erkennt. Zusätzlich wurde ein weiterer Antikörper (Ak Ki-67) eingesetzt, der die Nukleoli der HeLa-Zellen rot anfärbte, wie folgender Abbildung entnommen werden kann:

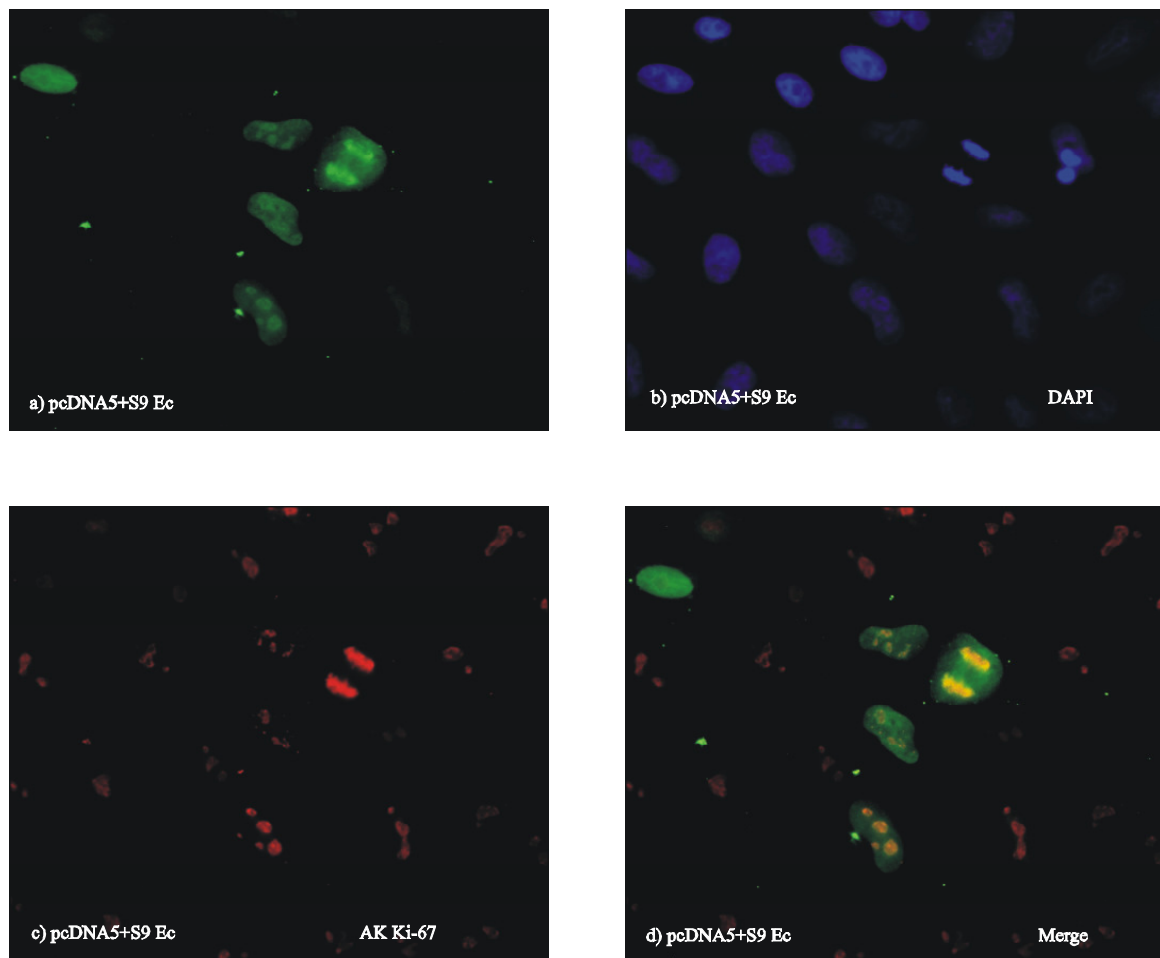


Abbildung 6.10: **Intrazelluläre Lokalisation des RPS9Ec.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit pcDNA5+S9Ec; Detektion mit (a) polyklonalem Antikörper gegen RPS9, (b) DAPI, (c) Ki-67-Antikörper und (d) Übereinanderprojektion von (a) und (c); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec bezeichnet.

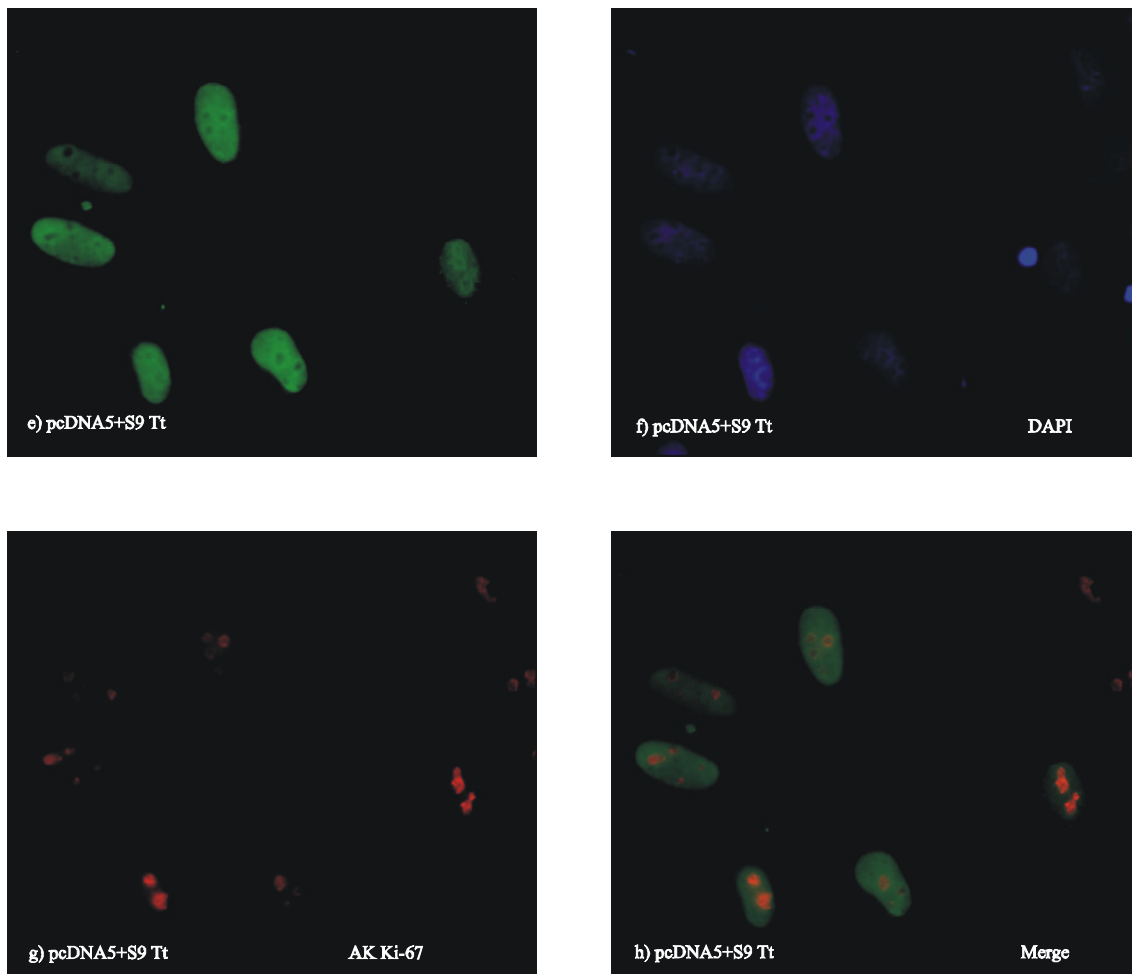


Abbildung 6.11: **Intrazelluläre Lokalisation des RPS9Tt.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit pcDNA5+S9Tt; Detektion mit (e) polyklonalem Antikörper gegen RPS9, (f) DAPI, (g) Ki-67-Antikörper und (h) Übereinanderprojektion von (e) und (g); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Sowohl das RPS9 von Ec als auch das von Tt ist im Nukleoplasma der HeLa-Zellen zu finden. Da im Zytoplasma keinerlei Fluoreszenz festzustellen ist, werden beide Proteine in den Zellkern transportiert, wobei ein geringer Anteil zu den Nukleoli diffundiert und dort bindet, was in den Originalaufnahmen besser zu erkennen ist als in der gedruckten Version.

Auffällig ist, dass bei der Detektion der Proteine ohne Reportermolekül dasselbe Phänomen auftritt wie bei den β -Gal-Fusionsproteinen und den mit drei EGFP derivatisierten Proteinen, nämlich dass die Proteine zwar am Nukleolus akkumulieren, aber nicht in den Nukleoli detektiert werden können.

6.2 Eingrenzung des NLS der RPS9 von *E. coli* und *T. thermophilus*

Nachdem der aktive Kernimport der prokaryontischen ribosomalen Proteine in eukaryontische Zellen nachgewiesen werden konnte, sollten die dafür verantwortlichen Kernlokalisierungssignale (NLS) eingegrenzt werden.

Hierfür wurden zunächst analog verschiedene Proteinfragmente der RPS9 von Ec und Tt konstruiert. Die Klonierung und Detektion der Fragmente erfolgte wie bereits für die kompletten Proteine unter 6.1 beschrieben, wobei auch die gleichen Vektoren und Restriktionschnittstellen verwendet wurden.

6.2.1 Lokalisation von EGFP-Fusionspeptiden

Für die Untersuchung des Kernlokalisierungssignals wurden diverse EGFP-Fusionspeptide konstruiert und deren Lokalisation analysiert. Die für die Klonierung eingesetzten Primer sind im Anhang unter 11.2.4 aufgelistet.

Nach Transfektion der HeLa-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden, wurden Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Im folgenden werden nur die Bilder der mit zwei EGFP derivatisierten Konstrukte gezeigt, da die Derivate mit einem EGFP die gleiche Tendenz der Lokalisation aufweisen, aber die Unterscheidung zwischen zytoplasmatischer und nukleolarer Akkumulation aufgrund ihrer geringeren Größe wesentlich weniger ausgeprägt ist. Dies ist auf eine höhere passive Diffusionsrate der deutlich kleineren mit einem EGFP derivatisierten Fusionsproteine zurückzuführen.

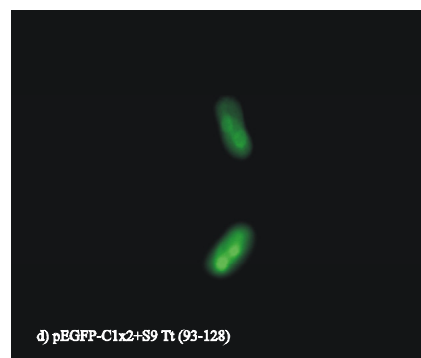
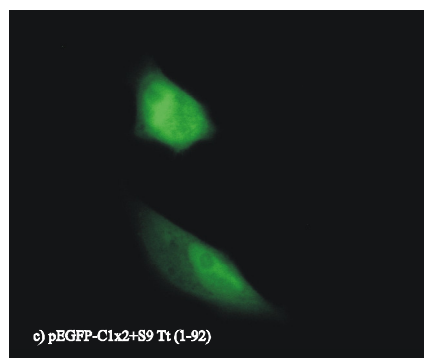
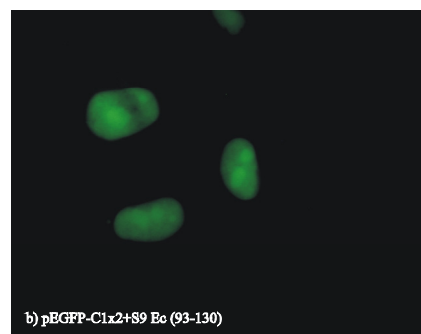
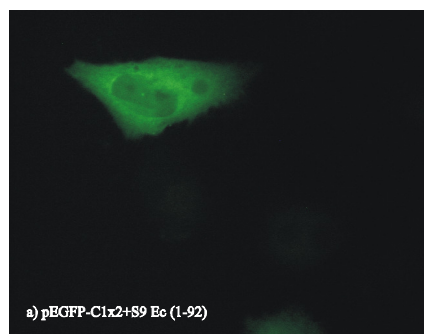


Abbildung 6.12: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener EGFP-S9-Fusionspeptide.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1x2+S9Ec (1-92), (b) pEGFP-C1x2+S9Ec (93-130), (c) pEGFP-C1x2+S9Tt (1-92) und (d) pEGFP-C1x2+S9Tt (93-128); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Die Unterteilung der RPS9 von *E. coli* und *T. thermophilus* in einen amino- und einen carboxyterminalen Teil zeigt, dass nur letzterer aktiv in den Nukleus importiert wird und dort an den Nukleoli akkumuliert. Der Aminoterminus von Ec in Abbildung 6.12 (a) führt zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des Fusionspeptids, während das entsprechende Fusionspeptid von Tt sowohl in Zytoplasma als auch Nukleoplasma erkennbar ist. Dies dürfte auf passive Diffusion zurückzuführen sein, v. a. wenn man in Betracht zieht, dass auch bei RP(1-92)Ec Zellen zu beobachten waren, die eine ähnliche Verteilung wie in (c) aufwiesen.

Da der carboxyterminale Bereich der Proteine verantwortlich für den aktiven Import und die Nukleoliakkumulation ist, wurde dieser weiter unterteilt, was zu folgenden Ergebnissen führte:

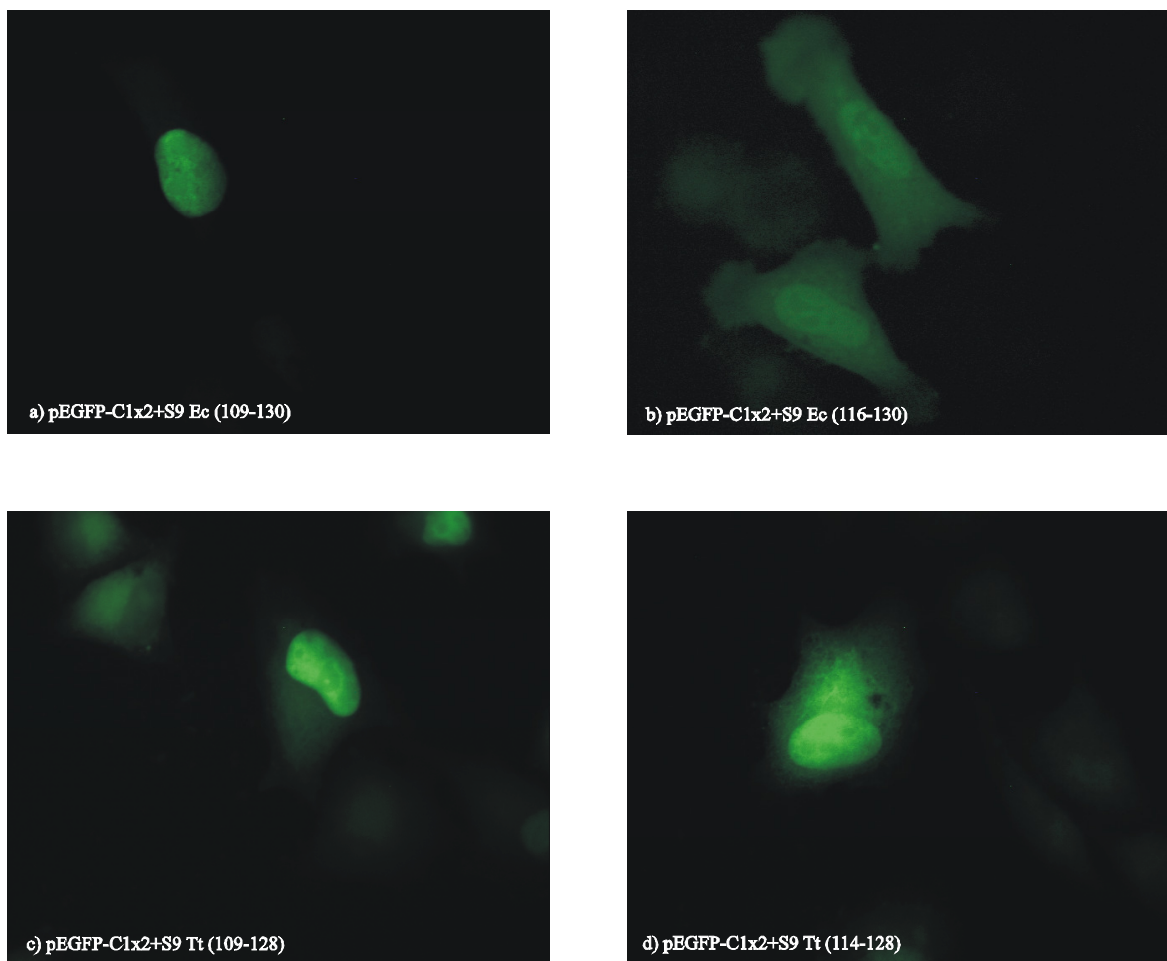


Abbildung 6.13: **Intrazelluläre Lokalisation diverser carboxyterminaler EGFP-S9-Fusionspeptide.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1x2+S9Ec (109-130), (b) pEGFP-C1x2+S9Ec (116-130), (c) pEGFP-C1x2+S9Tt (109-128) und (d) pEGFP-C1x2+S9Tt (114-128); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

In Abbildung 6.13 zeigt sich, dass jeweils das Fusionspeptid des längeren RPS9-Fragments fast ausschließlich im Nukleus akkumuliert, das kürzere hingegen zwar im Nukleus zu detektieren ist, aber gleichzeitig auch eine deutliche zytoplasmatische Färbung aufweist. Vergleicht man aber die Fluoreszenz der kürzeren Fragmente mit denen der aminoterminalen Regionen der RPS9(1-92) lässt sich festhalten, dass bei letzteren die zytoplasmatische Färbung zumindest deutlich stärker ausfällt. Daher kann man vermuten, dass die Peptide RPS9(116-130)Ec bzw. RP(114-128)Tt einen aktiven, aber stark eingeschränkten Import katalysieren.

Auf einen weiteren sehr interessanten Aspekt soll an dieser Stelle nur kurz verwiesen werden. Während die carboxyterminalen Bereiche der S9-Proteine – RPS9(93-130)Ec und RPS9(93-128)Tt – deutlich die Akkumulation in den Nukleoli katalysierten, kann dies im Falle der S9(109-130)Ec bzw. S9(109-128)Tt nur noch in ganz schwacher Ausprägung festgestellt werden, obwohl diese weiterhin einem aktiven Transportmechanismus unterliegen. Die S9(116-130)Ec und S9(114-128)Tt zeigen dagegen keinerlei Nukleoliakkumulation mehr.

6.2.2 Lokalisation von β -Galaktosidase-Fusionspeptiden

Um die Ergebnisse der EGFP-Fusionspeptide definitiv zu bestätigen, wurden auch hier Fusionspeptide mit β -Galaktosidase als Reportermolekül konstruiert. Die Klonierung erfolgte wie oben für die kompletten ribosomalen Proteine S9 beschrieben, wobei die Primer der Anlage 11.2.5 entnommen werden können. Die fertigen Plasmide wurden wiederum in COS-Zellen exprimiert und die Expressionsprodukte fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert.

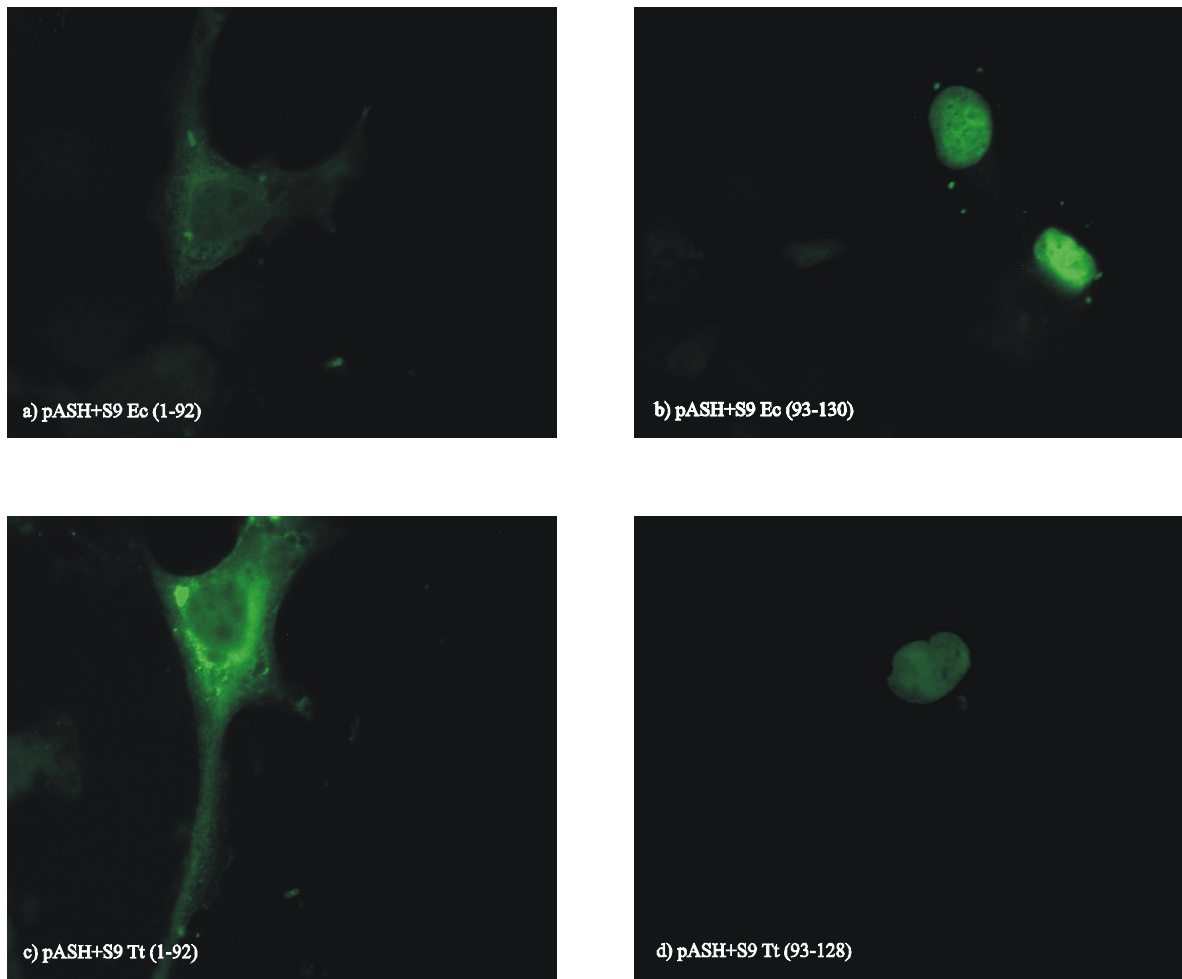


Abbildung 6.14: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener β -Gal-S9-Fusionspeptide.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S9Ec (1-92), (b) pASH+S9Ec (93-130), (c) pASH+S9Tt (1-92) und (d) pASH+S9Tt (93-128); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Die Bilder bestätigen die Beobachtungen und Schlussfolgerungen, die bereits bei den EGFP-Fusionspeptiden gemacht wurden, im Falle des RPS9(1-92)Tt wird die Behauptung, dass die nukleoplasmatische Färbung der mit EGFP derivatisierten Konstrukte auf passive Diffusion zurückzuführen ist, belegt.

Einziger Unterschied ist, dass der Carboxyterminus der β -Gal-Fusionspeptide nur ringförmig an den Nukleoli akkumuliert und nicht in sie hineintransportiert wird. Da dies aber bereits bei den kompletten RPS9 zu sehen war, besteht kein Widerspruch zu den bisherigen Daten.

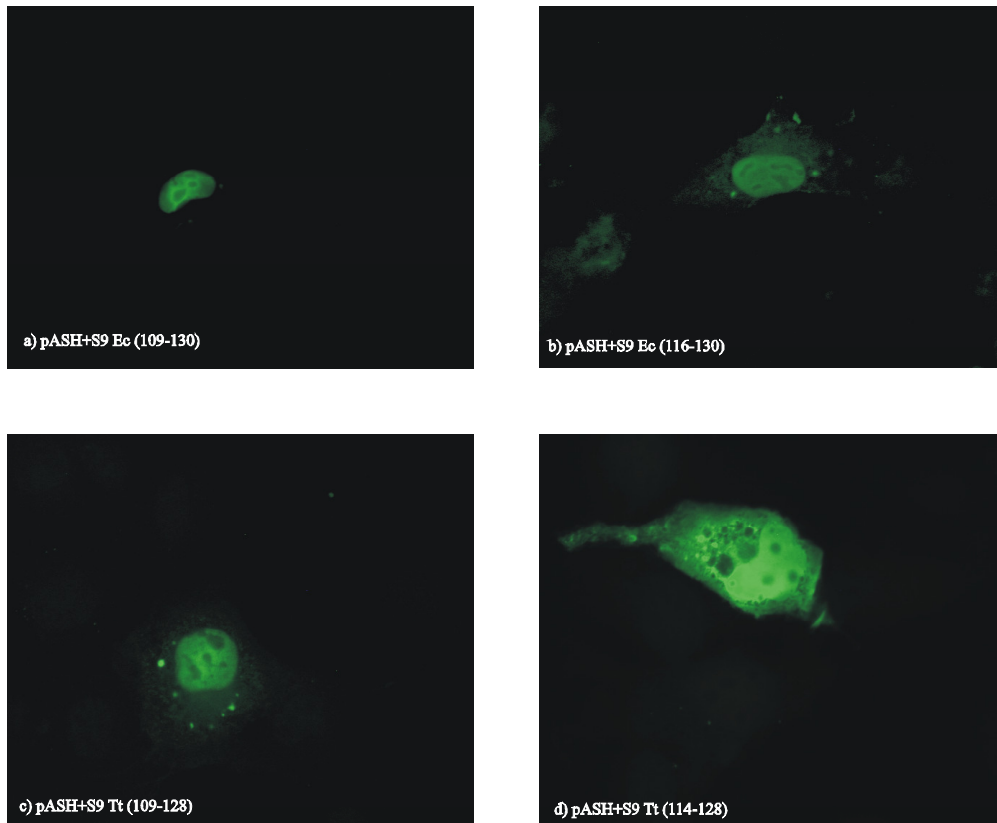


Abbildung 6.15: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener carboxyterminaler β -Gal-S9-Fusionspeptide.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S9Ec (109-130), (b) pASH+S9Ec (116-130), (c) pASH+S9Tt (109-128) und (d) pASH+S9Tt (114-128); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet.

Auch diese Bilder bestätigen die Daten der EGFP-Fusionspeptide. Das größere Fragment wird eindeutig aktiv in den Nukleus importiert, das kleinere zwar auch, aber mit deutlich reduzierter Effizienz, da das Zytoplasma eine klare Färbung aufweist. Eine Nukleoliakkumulation der exprimierten Proteine kann nur bei den längeren Konstrukten beobachtet werden.

Aufgrund dieser Daten konnte der Bereich der RPS9 von Ec und Tt, der den aktiven Kernimport ermöglicht, stark eingeschränkt werden. Das Kernlokalisierungssignal muss somit in der Region RPS9(109-130)Ec bzw. RPS9(109-128)Tt zu finden sein, wobei schon in den Bereichen S9(116-130)Ec und S9(114-128)Tt ein Sequenzabschnitt zu vermuten ist, der die Interaktion mit Importinen eingeschränkt zulässt, was zu einem aktiven Kernimport führen kann, aber nicht zwingend erfolgen muss.

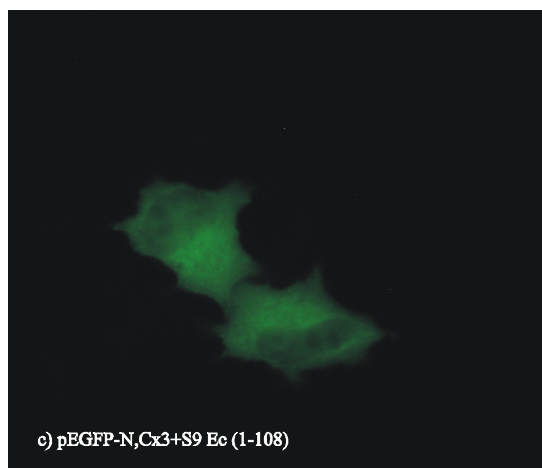
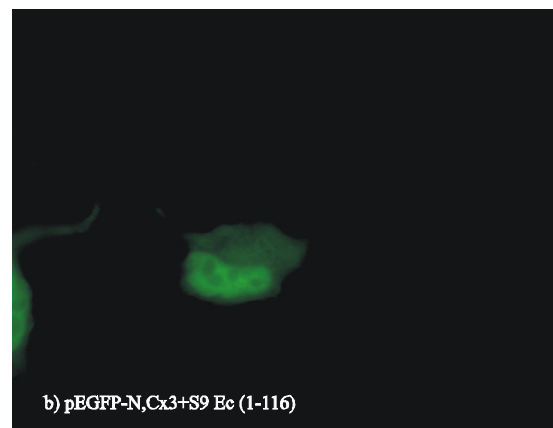
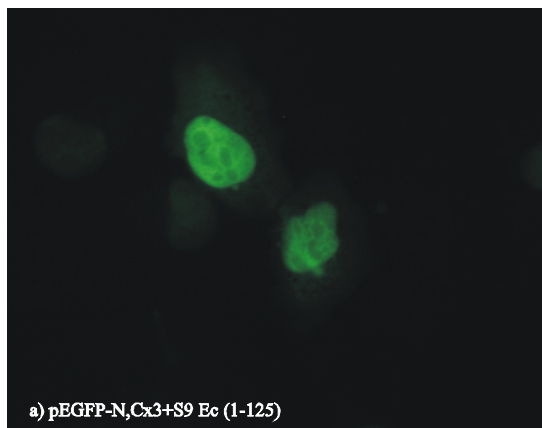
Die folgende Ermittlung der minimalen Kernlokalisationssequenz wurde nur für das RPS9 von *E. coli* durchgeführt, da die bisherigen Versuche für das RPS9 von *T. thermophilus* immer die gleichen Ergebnisse lieferten.

6.3 Bestimmung einer minimalen Kernlokalisationssequenz des RPS9Ec

6.3.1. Weitere Eingrenzung des NLS des RPS9Ec durch EGFP-Fusionspeptide

Um das NLS des RPS9Ec zu identifizieren, wurden zunächst weitere EGFP-Fusionspeptide kloniert. Bisher wurde die Eingrenzung der NLS vorgenommen, indem Abschnitte vom N-Terminus des Proteins entfernt wurden. Daher wurde nun vom C-Terminus her gekürzt, um auch neue Hinweise auf die Nukleoluslokalisationsdomäne (NuLD) erhalten zu können. Die Fragmente wurden in den bereits beschriebenen pEGFP-N,Cx3-Vektor kloniert, so dass Fusionsproteine mit jeweils drei EGFP-Reportern exprimiert wurden. Dazu dienten die im Anhang unter 11.2.6 aufgelisteten Primer.

Die Expression der sequenzierten Fusionspeptide erfolgte sowohl in HeLa- als auch in COS-Zellen. Da sich keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation ergaben, werden hier nur Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen dargestellt:



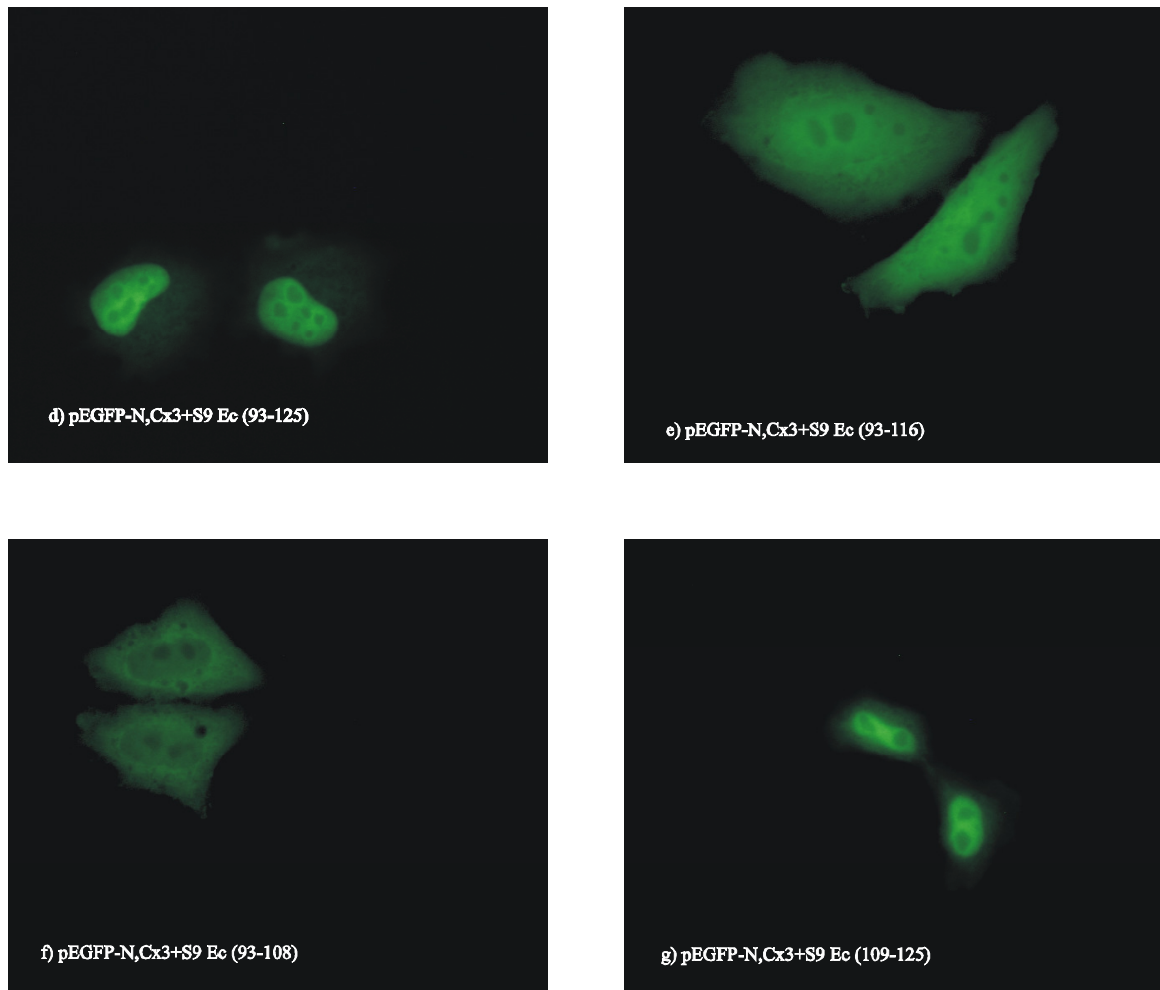


Abbildung 6.16: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener EGFP-S9Ec-Fusionspeptide.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (1-125), (b) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (1-116), (c) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (1-108), (d) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (93-125), (e) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (93-116), (f) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (93-108) und (g) pEGFP-N,Cx3+S9Ec (109-125); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec bezeichnet.

Das Konstrukt S9(1-125)Ec lokalisiert genau wie das komplette mit drei EGFP derivatisierte RPS9Ec im Nukleoplasma und akkumuliert an den Nukleoli, im Gegensatz zu den mit zwei EGFP derivatisierten RPS9, die deutlich in den Nukleoli zu finden sind. Dies dürfte auf die veränderte Größe bzw. Konformation der größeren Fusionsproteine und –peptide zurückzuführen sein, was auch die Interpretation hinsichtlich der Nukleoliakkumulation bei den folgenden Konstrukten erschwerte.

Das um weitere 9 AS verkürzte Konstrukt S9(1-116)Ec findet sich zwar hauptsächlich im Nukleoplasma, aber auch im Zytoplasma können Fusionspeptide nachgewiesen werden. Interessanterweise ist bei S9(1-116)Ec keine Nukleoliakkumulation mehr zu beobachten.

Betrachtet man das Fragment S9(1-108)Ec sieht man, dass hier neben der Information für die Nukleoliakkumulation auch die für den Kernimport verloren gegangen ist, da ausschließlich eine zytoplasmatische Färbung auftritt.

Um zu überprüfen, ob der N-Terminus des RPS9Ec Einfluss auf die Effizienz des Kernimports bzw. die Nukleoliakkumulation hat, wurden die Konstrukte S9(93-125)Ec und S9(93-116)Ec hergestellt.

Vergleicht man S9(93-125)Ec mit S9(1-125)Ec zeigt sich nur ein kleiner Unterschied, indem S9(93-125)Ec eine extrem leichte zytoplasmatische Färbung aufweist, was darauf hin deutet, dass der Kernimport nicht mehr ganz so effizient verläuft wie bei S9(1-125)Ec. Die Information für die Nukleoliakkumulation bleibt aber erhalten.

Gleiches gilt beim Vergleich von S9(93-116)Ec und S9(1-116)Ec. Zwar werden beide eingeschränkt in den Nukleus importiert, allerdings ist das Zytoplasma beim kürzeren Fragment deutlich stärker gefärbt. Dennoch findet eindeutig ein aktiver Kerntransport statt.

Das Fragment S9(93-108)Ec wird dagegen – genau wie S9(1-108)Ec – nicht in den Zellkern importiert.

Aufgrund dieser Beobachtungen konnten die Bereiche, in denen das NLS bzw. die NuLD liegen müssen, sehr stark eingegrenzt werden auf die Regionen S9(109-125)Ec bzw. S9(93-125)Ec. Wie bei den EGFP- bzw. β -Gal-Fusionspeptiden bereits gezeigt, akkumulieren S9(109-130)Ec bzw. S9(109-128)Tt schwach an den Nukleoli.

6.3.2 Ermittlung einer minimalen Kernlokalisationssequenz des RPS9Ec

Mit Hilfe von Oligonukleotiden wurde nun versucht, eine minimale Kernlokalisationssequenz zu ermitteln. Dazu wurden diese hybridisiert, phosphoryliert und anschließend in den restringierten β -Gal-Expressionsvektor pASH einkloniert. Als Restriktionsenzyme dienten dazu *Afl* II und *Hind* III. In Anhang 11.2.7 sind die DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide abgebildet.

Von mehreren Transfektionen von COS-Zellen konnten diese Aufnahmen gewonnen werden:

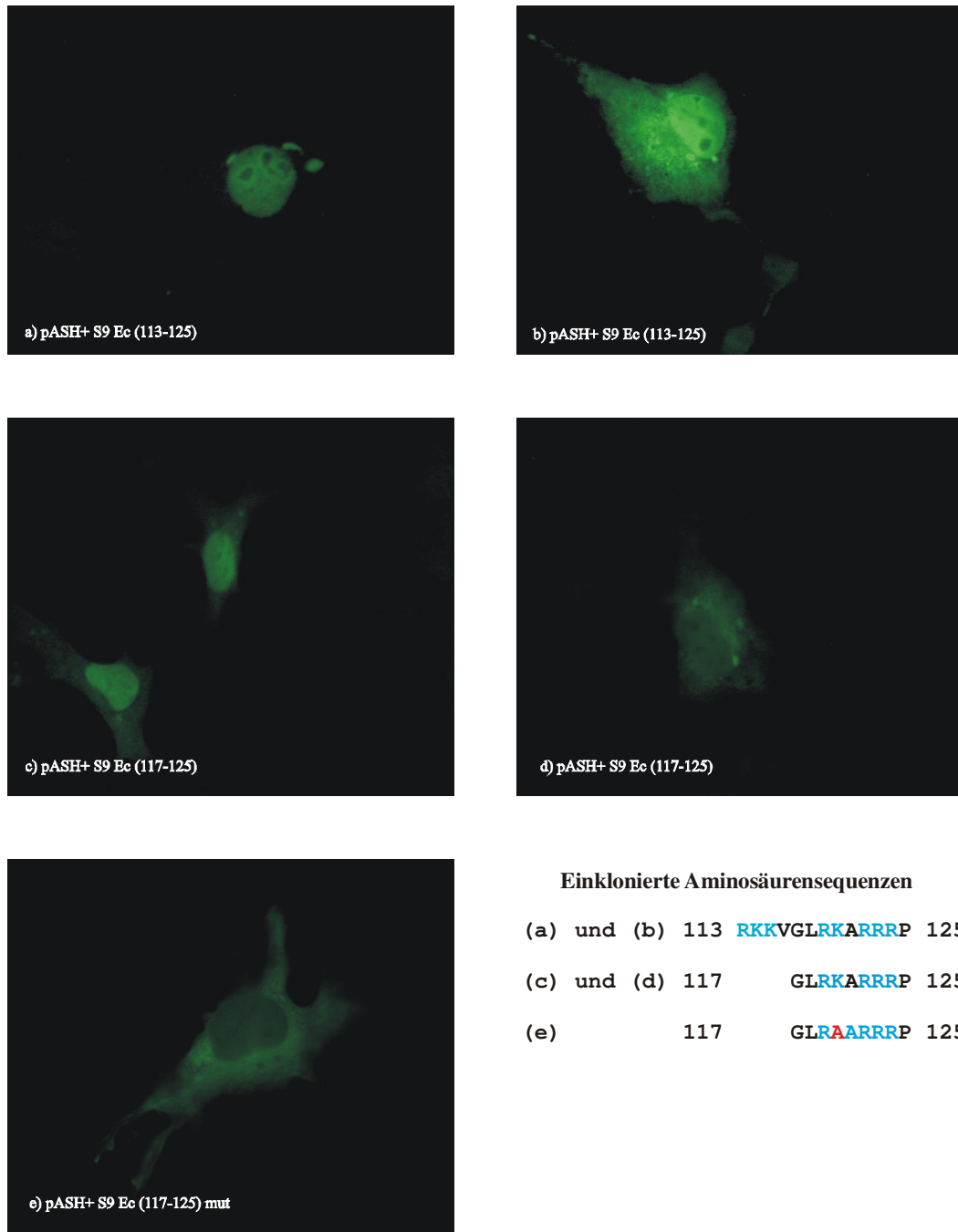


Abbildung 6.17: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener β -Gal-S9-Fusionspeptide.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) und (b) pASH+S9Ec (113-125), (c) und (d) pASH+S9Ec (117-125) sowie (e) pASH+S9Ec (117-125)mut(120 K->A); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec bezeichnet. Bei den Aminosäuresequenzen der einklonierten Bereiche im Einbuchstabencode sind die basischen Aminosäuren blau gefärbt, die mutierte Aminosäure an Position 120 ist rot.

In Abbildung 6.17 sind die β -Gal-Fusionspeptide des RPS9 von Ec mit den AS (113-125) und (117-125) dargestellt, wobei in (e) die Aminosäure Lysin (K) an der Position 120 in Alanin (A) mutiert wurde [(117-125)mut].

Um die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Minimalsequenz aufzuzeigen, wurden für beide Konstrukte jeweils zwei exemplarische Zellen ausgewählt. Man sieht eindeutig, dass die Lokalisation der Konstrukte S9(113-125)Ec in (a) und (b) bzw. S9(117-125)Ec in (c) und (d) variiert. Dies war sowohl in unterschiedlichen Transfektionsansätzen als auch innerhalb desselben Transfektionsansatzes zu beobachten. Die Abbildungen geben das gesamte Spektrum der Variation in der Lokalisation des jeweiligen Konstrukts wieder.

Mit absoluter Sicherheit lässt sich festhalten, dass S9(113-125)Ec aktiv in den Zellkern importiert wird. Zwar variiert die Effizienz - in (a) erfolgt der Import komplett, in (b) wird nur der Hauptanteil importiert – aber zieht man alle exprimierenden Zellen in Betracht, lässt sich immer eine sehr starke nukleoplasmatische, meist in Verbindung mit einer schwachen zytoplasmatischen, Färbung nachweisen. Eine Nukleoliakkumulation findet zwar noch statt, allerdings in sehr schwachem Umfang.

Beim kürzeren Konstrukt S9(117-125)Ec beobachtet man eine größere Variabilität. Der Hauptanteil der transfizierten Proteine lokalisiert im Nukleus, aber eine zytoplasmatische Färbung war immer zu beobachten. Diese war in der Regel deutlich stärker als in (c) dargestellt und oft konnten auch Zellen beobachtet werden, die keinen Kernimport mehr aufwiesen (d).

Die mutierte Form von S9(117-125)Ec wurde konstruiert, um eine AS des vermeintlichen NLS auszutauschen und so die Funktion des NLS zu zerstören und einen aktiven Kernimport zu verhindern. Man erkennt deutlich, dass S9(117-125)mut nicht mehr in den Zellkern importiert wird.

Eine detaillierte Analyse erfolgt in der Diskussion, doch lässt sich zusammenfassend festhalten, dass im Bereich S9(113-125)Ec die Information für die Minimalsequenz des NLS von RPS9Ec enthalten sein muss, aber fraglich bleibt, ob die AS (113-116) wirklich essentiell sind. Zieht man die Erkenntnisse der mit drei EGFP derivatisierten Konstrukte S9(1-116)Ec und S9(116-130)Ec hinzu, die beide im Nukleoplasma akkumulierten, aber auch eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen, lässt sich folgern, dass beide Fragmente Teile eines NLS enthalten, die für sich eine eingeschränkte Interaktion mit Importfaktoren zulassen, und somit aktiv importiert werden, allerdings für einen effektiven Import beide Teile zusammen vorhanden sein müssen. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass das an AS 120 mutierte Konstrukt nicht mehr, der entsprechende Wildtyp aber zumindest sehr eingeschränkt in den Zellkern importiert wird.

6.4 Verteilung der ribosomalen Proteine S9 von *E. coli* und *T. thermophilus* in zellularen Fraktionen eukaryontischer Zellen

Sämtliche Fluoreszenzaufnahmen der S9-Proteine von *E. coli* und *T. thermophilus* zeigen - je nach verwendetem Reporterprotein - eine eindeutige Akkumulation an oder in den Nukleoli eukaryontischer Zellen. Das deutet darauf hin, dass die RPS9 mit der nukleolaren rRNA interagieren. Daher stellte sich die Frage, ob die transfizierten prokaryontischen Proteine evtl. sogar in eukaryontische Ribosomen eingebaut werden und in translationsaktiven Polysomen nachgewiesen werden können.

6.4.1 Immunologische Detektion der RPS9 von Ec und Tt in HeLa-Zellfraktionen

Für die Untersuchung der S9-Lokalisation in HeLa-Zellen wurden diese mit den Konstrukten pcDNA5+S9Ec bzw. pcDNA5+S9Tt transfiziert, so dass die vollständigen S9-Proteine exprimiert wurden. Transfizierte HeLa-Zellen wurden fraktioniert und die Verteilung der RPS9 mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung des polyklonalen Anti-S9-Ak analysiert. Als Positivkontrolle wurde bei den meisten der im folgenden dargestellten Blots ein Aliquot des gesamten Zellextrakts von *E. coli*-DH5 α -Zellen aufgetragen.

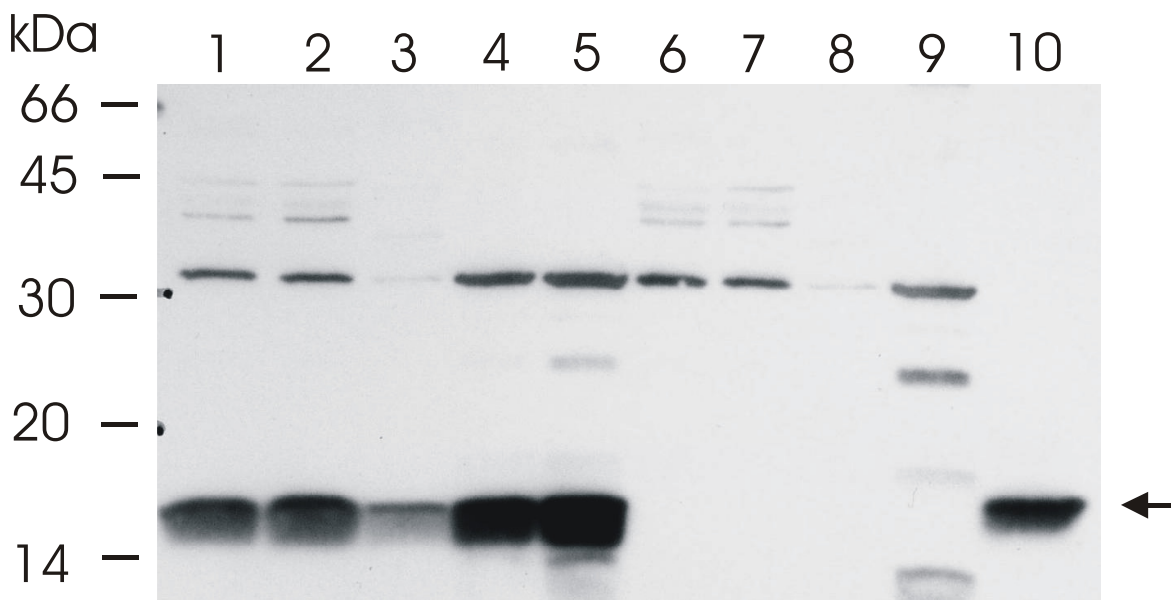


Abbildung 6.18: **Nachweis des RPS9Tt in transfizierten HeLa-Zellfraktionen durch Western-Blotting.**

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden ein Zellysate (Spur 1), das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine zytoplasmatische Fraktion (Spur 2), eine Kernfraktion (Spur 3) und eine Ribosomenfraktion (Spuren 4 und 5) isoliert. Entsprechende Fraktionen wurden von nicht-transfizierten HeLa-Zellen als Negativkontrollen (Spuren 6 bis 9) isoliert.

In den Spuren 1 bis 3 und 6 bis 8 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen, während Spur 4 den Ribosomenextrakt aus 200.000 Zellen und die Spuren 5 und 9 den Ribosomenextrakt aus 400.000 Zellen enthalten. In Spur 0 wurde der Molekulargewichtsmarker LMW von Amersham und in Spur 10 der Zellextrakt aus *E. coli* DH5 α -Zellen als Positivkontrolle geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17.5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil gibt die Höhe des RPS9Tt an.

In den Spuren 6 bis 9 sind die Zellfraktionen nicht-transfizierter HeLa-Zellen geladen, die als Negativkontrolle dienen. Der in Spur 1 abgebildete Gesamtzellextrakt belegt eine transiente Expression von RPS9Tt, das mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa wandert.

In den Spuren 1 bis 5 sind die verschiedenen Zellfraktionen der transfizierten Zellen aufgetragen. Das S9-Protein von Tt findet sich definitiv im Zellkern (Spur 3), allerdings in deutlich schwächerer Ausprägung als im Zytoplasma (Spur 2). Interessanterweise ist es in der Ribosomenfraktion nachzuweisen (Spuren 4 und 5). Diese Fraktion umfasst 80S Ribosomen, Polysomen sowie die freien 40S und 60S Untereinheiten. Beachtet werden muss, dass von der Ribosomenfraktion die vier- bzw. achtfache Menge geladen wurde, und somit die Signalstärke nicht direkt in Relation zu den anderen Zellfraktionen gesetzt werden kann. Dennoch scheint das RPS9Tt mit den Ribosomen zu interagieren.

Die Abbildung 6.19 zeigt den entsprechenden Blot für das RPS9 von Ec, dessen SDS-PAGE analog beladen wurde:

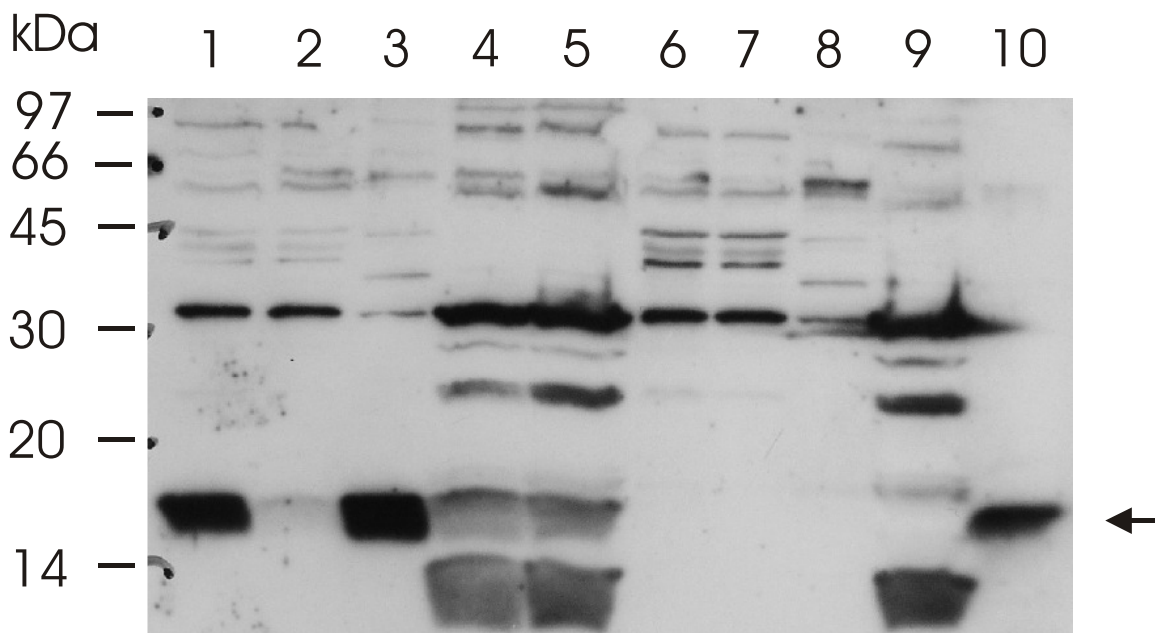


Abbildung 6.19: Nachweis des RPS9Ec in transfizierten HeLa-Zellfraktionen durch Western-Blotting.

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden ein Zelllysats (Spur 1), das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine zytoplasmatische Fraktion (Spur 2), eine Kernfraktion (Spur 3) und eine Ribosomenfraktion (Spuren 4 und 5) isoliert. Entsprechende Fraktionen wurden von nicht-transfizierten HeLa-Zellen als Negativkontrollen (Spuren 6 bis 9) isoliert.

In den Spuren 1 bis 3 und 6 bis 8 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen, während Spur 4 den Ribosomenextrakt aus 200.000 Zellen und die Spuren 5 und 9 den Ribosomenextrakt aus 400.000 Zellen enthalten. In Spur 0 wurde der Molekulargewichtsmarker LMW von Amersham und in Spur 10 der Zellextrakt aus *E. coli* DH5 α -Zellen als Positivkontrolle geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17.5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil gibt die Höhe des RPS9Ec an.

Die Zellfraktionen der Negativkontrolle (Spuren 6 bis 9) zeigen kein S9-Signal, die Positivkontrolle zeigt eine Bande bei ca. 16 kDa (Spur 10), was dem S9-Protein entspricht.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass beide RPS9 in jeder der aufgetragenen Zellfraktionen nachzuweisen sind. Interessanterweise ist die S9-Verteilung in den einzelnen Zellfraktionen aber sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zum RPS9Tt findet sich das S9-Protein von Ec fast ausschließlich im Zellkern (Spur 3), nur ein sehr geringer Anteil kann im Zytoplasma (Spur 2) und an den Ribosomen (Spur 4 und 5) detektiert werden. Diese Beobachtung wurde durch weitere Blots bestätigt.

Offensichtlich finden sich beide S9-Proteine in den Ribosomenfraktionen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Es bleibt die Frage zu beantworten, ob sie auch in den translationsaktiven Polysomen eingebaut sind.

6.4.2 Analyse des Polysomenprofils transfizierter HeLa-Zellen

Die Frage, ob das RPS9 von Tt an Polysomen bindet, wurde an transient transfizierten HeLa-Zellen untersucht. Auf das analoge Experiment von Ec wurde verzichtet. Dazu wurde die zytoplasmatische Fraktion über einen 10%- bis 40%-igen Sucrosegradienten getrennt. Nach der Fällung der Gradienten wurde die Proteinverteilung mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

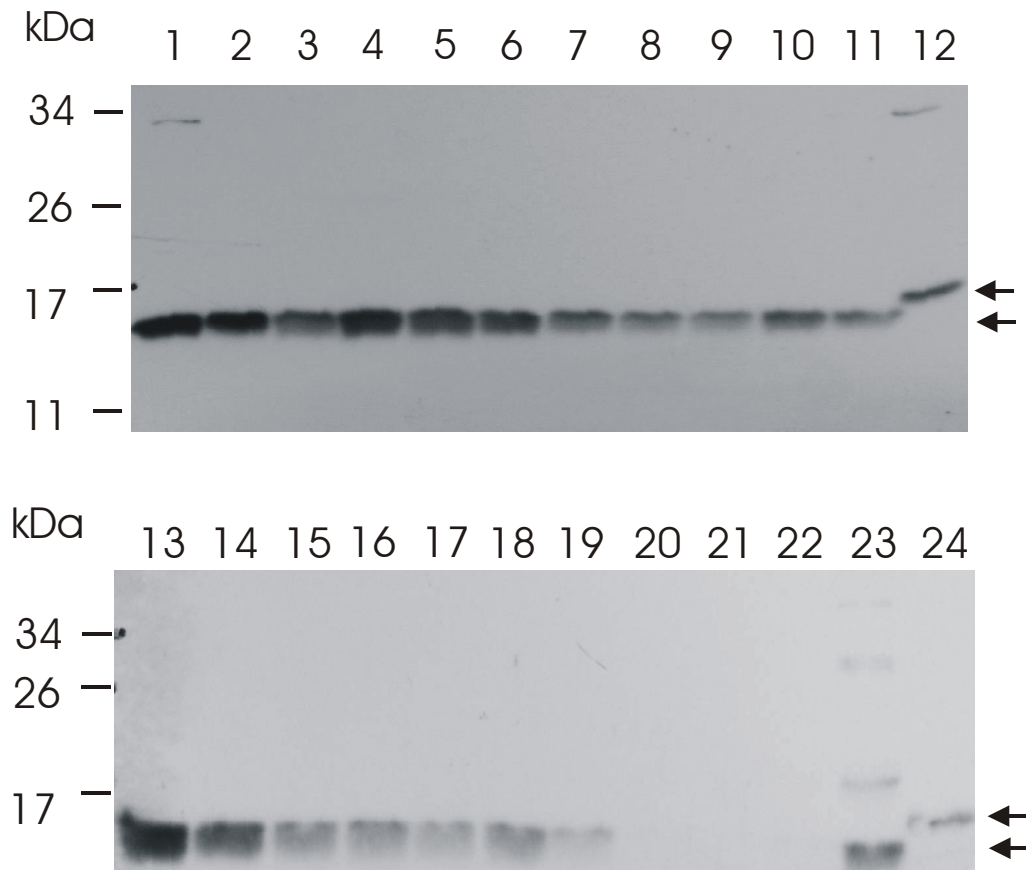


Abbildung 6.20: **Polysomenprofil des RPS9Tt in transfizierten HeLa-Zellen.**

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden ein Zelllysats (Spur 1), das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine Kernfraktion (Spur 2) und eine zytoplasmatische Fraktion isoliert. Die zytoplasmatische Fraktion wurde über einen 10%- bis 40%-igen Sucrosegradienten getrennt und nach der Fällung wurden die 23 erhaltenen Gradientenfraktionen geladen. In den Spuren 19 bis 22 wurden jeweils zwei der getrennten Gradientenfraktionen vereinigt.

In den Spuren 1 bis 11 und 13 bis 23 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen. In den Spuren 0 wurde als Molekulargewichtsmarker eine gefärbte Proteinleiter und in den Spuren 12 und 24 der Zellextrakt aus *E. coli* DH5 α -Zellen als Positivkontrolle geladen. Die Fraktionen wurden auf einem 17,5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile geben die Höhe des RPS9Tt bzw. der Positivkontrolle an.

Es fällt auf, dass die Bande der Positivkontrolle, des RPS9 aus *E. coli*-DH5 α -Zellen (oberer Pfeil), oberhalb der positiven Signale des RPS9Tt (unterer Pfeil) liegt. Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Ladung der beiden S9-Proteine zurückzuführen, wodurch sich ihre Laufeigenschaften im SDS-PAGE unterscheiden. In den Spuren 19 bis 22 wurden jeweils zwei Fraktionen vereinigt.

Anhand des Polysomenprofils, das parallel während des Einsammelns der Proben mittels Fraktionssammler aufgezeichnet wurde, können die Fraktionen ribosomalen Partikeln zugeordnet werden:

40S	Spur 6 + 7	Fraktion 4 + 5
60S	Spur 8 + 9	Fraktion 6 + 7
80S	Spur 10, 11, 13 + 14	Fraktion 8, 9, 11 + 12
Polysomen	ab Spur 15	ab Fraktion 13

Der Gesamtzellextrakt in Spur 1 belegt eine erfolgreiche Transfektion, die Kernfraktion in Spur 2 unterstreicht die bereits beschriebene dortige Akkumulation von S9Tt. Ein großer Teil des S9-Proteins ist in den Spuren 3 bis 5 zu erkennen, d. h. dieses S9Tt ist nicht an ribosomale Partikel gebunden.

Das RPS9 lässt sich sowohl in der kleinen 40S als auch der großen 60S Untereinheit nachweisen, allerdings bei letzterer mit deutlich geringerer Intensität. Dies verwundert nicht, da es Bestandteil der kleinen ribosomalen 30S Untereinheit der Prokaryonten ist. Am stärksten ist das Signal in den 80S Ribosomen, bei den Polysomen hingegen nimmt die S9Tt-Menge stark ab.

Die Detektion der Signale der hier gezeigten Blots erfolgte mit dem Anti-S9-Ak. Um einen Vergleich ziehen zu können zwischen der Lokalisation des transient exprimierten RPS9 von Tt und einem nativ in den HeLa-Zellen vorkommenden Protein der ribosomalen 40S Untereinheit, wurden analoge SDS-PAGE produziert, die im Western Blot mit einem Erstantikörper gegen das humane S6-Protein analysiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Hier werden kurz die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Profile beschrieben, genauer wird darauf in der Diskussion eingegangen. Das RPS6Hs findet sich wie erwartet in der 40S Untereinheit, aber fast gar nicht in der 60S Untereinheit. Die S6-Signale von den 80S Ribosomen und den Polysomenfraktionen sind nicht wesentlich stärker ausgeprägt als beim RPS9Tt. Sehr bemerkenswert ist, dass das RPS6Hs überhaupt nicht im Zellkern detektiert werden kann, wohingegen das RPS9Tt dort eine deutliche Akkumulation aufweist.

6.4.3 Hochsalzbehandlung der Ribosomen transfizierter HeLa-Zellen

Nachdem eine Interaktion des S9-Proteins von Tt für sämtliche Ribosomenfraktionen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob tatsächlich ein Einbau des prokaryontischen Proteins in die eukaryontischen Ribosomen stattfindet, oder ob das Protein nur

an die Ribosomen assoziiert. Per definitionem müssen ribosomale Proteine noch nach einer Hochsalzbehandlung mit 500 mM KCl in den Ribosomen nachweisbar sein. Die Ribosomenfraktionen transfizierter HeLa-Zellen wurden daher einer Hochsalzbehandlung unterzogen.

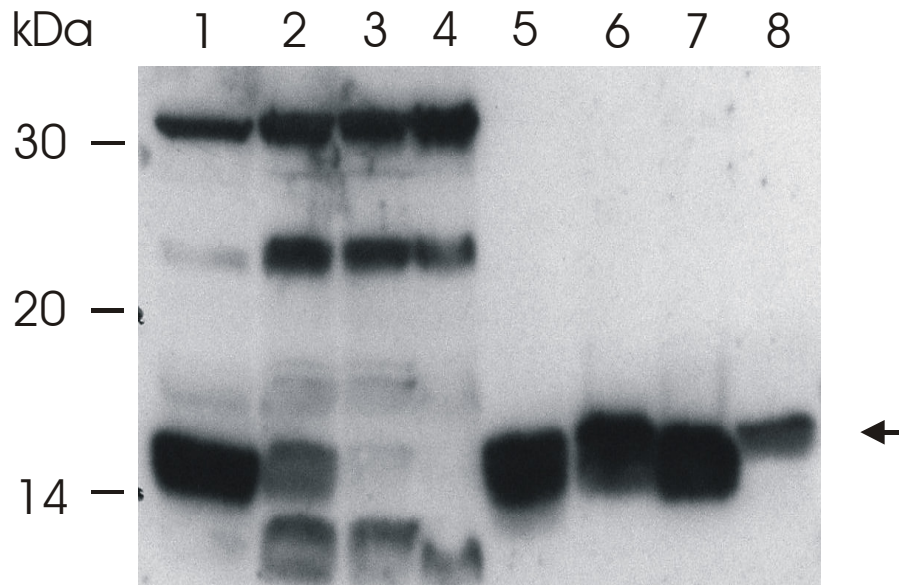


Abbildung 6.21: **Detektion des RPS9Tt nach einer Hochsalzbehandlung der Ribosomenfraktion transfizierter HeLa-Zellen.**

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden Ribosomenfraktionen nach einer Hochsalzbehandlung mit 150 mM, 300 mM und 500 mM KCl geladen. In Spur 1 ist die unbehandelte Ribosomenfraktion geladen, in den Spuren 2 bis 4 finden sich die Fraktionen nach der Hochsalzbehandlung mit 150 mM, 300 mM bzw. 500 mM KCl. In den Spuren 5 bis 7 sind die entsprechenden Zentrifugationsüberstände der hochsalzbehandelten Fraktionen geladen.

In den Spuren 1 bis 7 wurde der Proteinextrakt von ca. 100.000 Zellen geladen. In Spur 0 wurde der Molekulargewichtsmarker LMW von Amersham und in Spur 8 der Zellextrakt aus *E. coli* DH5α-Zellen als Positivkontrolle geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17.5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil gibt die Höhe des RPS9Tt an.

In Spur 1 sind die unbehandelten sedimentierten Ribosomen aufgetragen. Diese wurden mit 150 mM, 300 mM bzw. 500 mM KCl inkubiert. Man sieht, dass bereits nach der Behandlung mit 150 mM KCl der größte Teil des RPS9Tt von den Ribosomen abdissoziiert. Nach der Behandlung mit 300 mM KCl ist das S9-Protein praktisch vollständig von den Ribosomen entfernt.

Die Spuren 5 bis 7 zeigen die zugehörigen Zentrifugationsüberstände, in denen sich das freigesetzte RPS9 von Tt befindet. Schon nach der Behandlung mit 150 mM findet sich hier der größte Teil des S9-Proteins.

Daraus lässt sich schließen, dass das RPS9Tt zwar an die Ribosomen assoziiert, jedoch nicht funktionell in sie eingebaut wird.

6.4.4 Lokalisation des eukaryontischen RPS16 in COS-Zellfraktionen

Um die Lokalisation der prokaryontischen ribosomalen Proteine besser diskutieren zu können, erfolgt die Abbildung eines Blots, bei dem COS-Zellen mit dem Konstrukt pEGFP-C1+S16Hs transfiziert, aufgearbeitet und im Western Blot mit Hilfe des Anti-S16-Ak analysiert wurden.

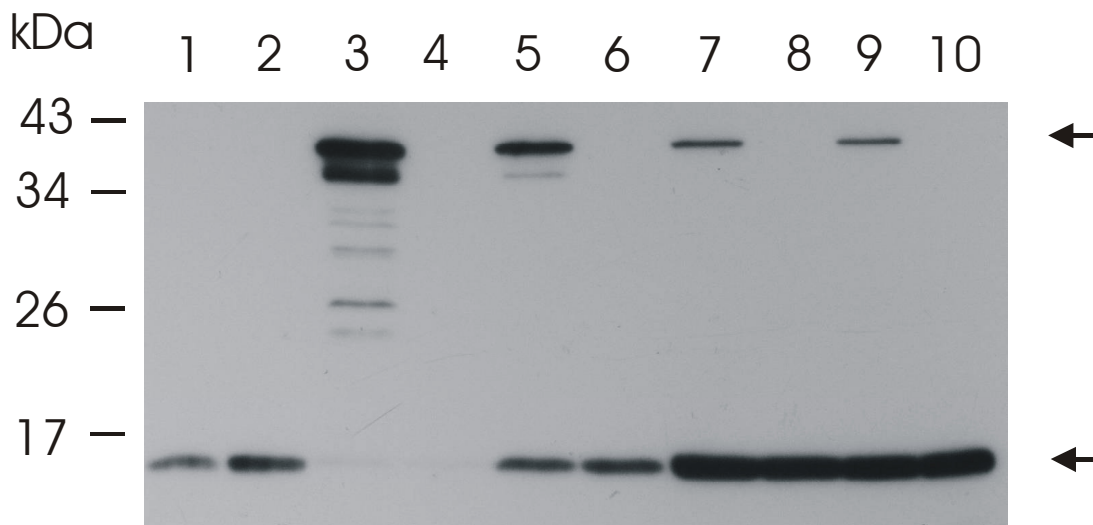


Abbildung 6.22: **Nachweis des mit einem EGFP derivatisierten humanen RPS16 in transfizierten COS-Zellfraktionen durch Western-Blotting.**

Von transfizierten COS-Zellen wurden ein Zelllysate, das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine zytoplasmatische Fraktion, eine Kernfraktion und eine Ribosomenfraktion isoliert. Die Ribosomenfraktion wurde anschließend einer Hochsalzbehandlung mit 500 mM KCl unterzogen. Entsprechende Fraktionen wurden von nicht-transfizierten COS-Zellen als Negativkontrollen isoliert und hochsalzbehandelt. Die Spuren 1 und 2 enthalten die zytoplasmatischen Fraktionen transfizierter bzw. nicht-transfizierter COS-Zellen, die Spuren 3 und 4 die Kernfraktionen, die Spuren 5 und 6 die Zelllysate, die Spuren 7 und 8 die unbehandelten Ribosomenfraktionen und die Spuren 9 und 10 die Ribosomenfraktionen nach der Hochsalzbehandlung mit 500 mM KCl.

In den Spuren 1 bis 6 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen, während die Spuren 7 bis 10 den Extrakt aus 800.000 Zellen enthalten. In Spur 0 wurde als Molekulargewichtsmarker eine gefärbte Proteinleiter geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17,5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile geben die Höhe des RPS16Hs bzw. des mit einem EGFP derivatisierten RPS16Hs an.

Da für die spätere Diskussion in dieser Arbeit nur die Banden bei ca. 16 kDa (unterer Pfeil) von Belang sind, sei nur kurz darauf hingewiesen, dass das transient exprimierte Protein EGFP-RPS16Hs sowohl eine starke Akkumulation im Zellkern aufweist, als auch nach der Hochsalzbehandlung mit 500 mM KCl noch in den Ribosomen nachgewiesen werden kann.

In den geradzahligen Spuren sind als Negativkontrolle die Zellfraktionen nicht-transfizierter COS-Zellen aufgetragen. Es zeigt sich, dass das humane RPS16 im Zytoplasma und in den Ribosomen detektiert werden kann und eine Hochsalzbehandlung mit 500 mM KCl kein Abdissoziieren von der ribosomalen 40S Untereinheit bewirkt.

Dagegen ist das RPS16Hs im Zellkern nicht nachweisbar. Dies stimmt mit den Daten des humanen RPS6 überein, die im Zusammenhang mit den Polysomenprofilen erörtert wurden.

6.5 Lokalisation weiterer prokaryontischer RPs in eukaryontischen Zellen

Es wurden vier weitere ribosomale Proteine von *T. thermophilus* ausgewählt und untersucht, um festzustellen, ob das beobachtete Phänomen eines aktiven Kernimports des prokaryontischen ribosomalen Proteins S9 von *E. coli* und *T. thermophilus* vielleicht nur zufällig auftritt. Es handelte sich um die RPs S12 und S17, die jeweils ein Homolog unter den eukaryontischen ribosomalen Proteinen besitzen und die RPs S6 und S18, die keine eukaryontischen Homologen haben. Diese Proteine wurden als β -Gal-Fusionsproteine in COS-Zellen exprimiert und deren Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Daten zu S12 und S17 wurden in einer während dieser Dissertation betreuten Diplomarbeit erhoben und die Abbildungen und ihre Aminosäuresequenzen werden kurz in der Zusammenfassung dargestellt. Es sei hier nur darauf hingewiesen, dass beide eindeutig aktiv in den Zellkern von eukaryontischen COS-Zellen importiert werden und S12 sehr stark in den Nukleoli akkumuliert, wohingegen S17 keine Akkumulation an oder in den Nukleoli aufweist.

6.5.1 Lokalisation der heterologen RPs S6 und S18 von *T. thermophilus*

Da die ausgewählten RPs keinen homologen eukaryontischen RPs entsprechen, wurde zunächst davon ausgegangen, dass sie nicht aktiv in den Zellkern importiert werden. Bei genauerem Betrachten der Sequenzen zeigte sich allerdings, dass das RPS18Tt einen Bereich enthält, der für ein klassisches NLS kodiert (Chelsky et al., 1989). Das RPS6Tt hingegen besitzt keinerlei Region, in der gehäuft basische Aminosäuren vorzufinden sind.

Für die Klonierung von S6 und S18 wurden die Primer verwendet, die im Anhang unter 11.2.8 dargestellt sind.

Mittels dieser Primer wurden die Gensequenzen der beiden RPs über PCR amplifiziert, wobei die genomische DNA von Tt als Templat fungierte. Die Restriktion erfolgte mit den Enzymen *Afl II* und *Hind III*, so dass die DNA aus der PCR in den pASH-Vektor kloniert werden konnte.

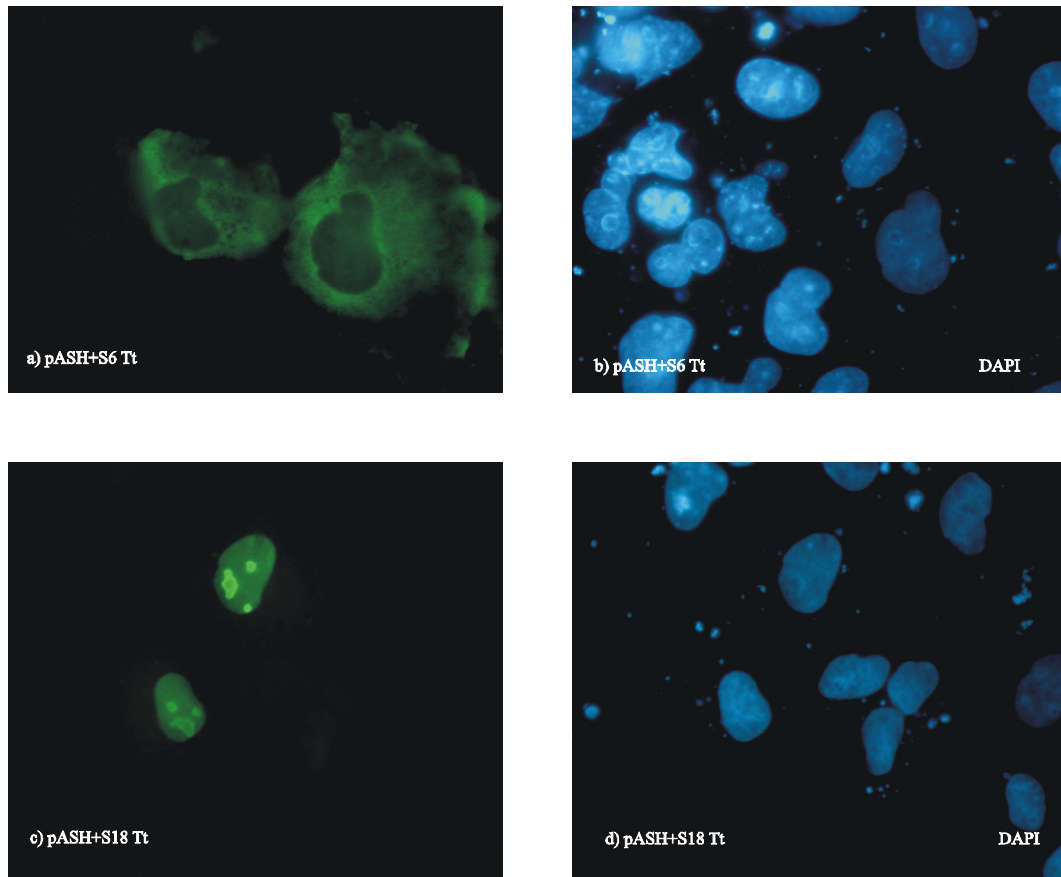


Abbildung 6.23: **Intrazelluläre Lokalisation der S6- bzw. S18-β-Gal-Fusionsproteine in COS-Zellen.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S6Tt und (c) pASH+S18Tt; (b) und (d) zeigen die jeweilige DAPI-Färbung zu (a) und (c); für eine bessere Übersichtlichkeit wurden das RPS6 bzw. das RPS18 von *T. thermophilus* als S6Tt bzw. S18Tt bezeichnet.

In Abbildung 6.23 (a) sieht man, dass das RPS6 von Tt ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist und somit kein aktiver Transport in den Zellkern stattfindet, d. h. das RPS6Tt besitzt kein NLS.

Dagegen wird das RPS18Tt ins Nukleoplasma importiert und reichert sich sehr stark an den Nukleoli an.

6.5.2 Eingrenzung des NLS des ribosomalen Proteins S18 von *T. thermophilus*

Aufgrund der sehr interessanten Tatsache, dass das heterologe prokaryontische RPS18 nicht nur aktiv in den Zellkern eukaryontischer Zellen importiert wird, sondern auch extrem stark an deren Nukleoli akkumuliert, wurden S18-Fragmente hergestellt, um das NLS bzw. die NuLD näher bestimmen zu können. Hierbei kamen die in Anhang 11.2.9 aufgelisteten Primer zum Einsatz.

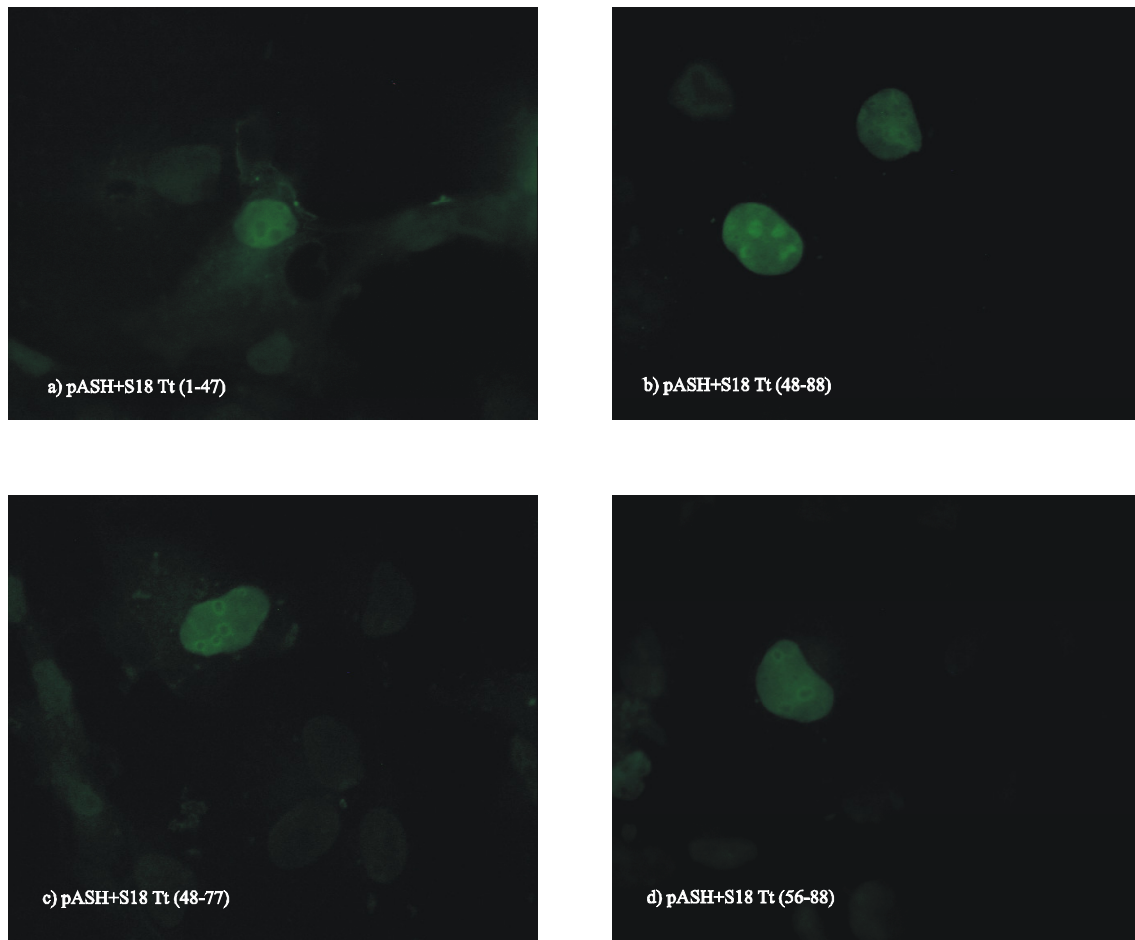


Abbildung 6.24: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener S18-β-Gal-Fusionspeptide in COS-Zellen.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S18Tt (1-47), (b) pASH+S18Tt (48-88), (c) pASH+S18Tt (48-77) und (d) pASH+S18Tt (56-88); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS18 von *T. thermophilus* als S18Tt bezeichnet.

Die Abbildung 6.24 zeigt, dass alle vier S18-Fragmente im Nukleoplasma lokalisieren, allerdings ist die Akkumulation des N-terminalen Konstrukts in (a) deutlich schwächer als bei dem C-terminalen Konstrukt in (b), von RPS18(1-47)Tt bleibt auch ein Teil der Proteine im Zytoplasma und sie akkumulieren nicht an den Nukleoli. RPS18(48-88)Tt dagegen wird nicht nur sehr effektiv ins Nukleoplasma importiert, sondern akkumuliert sehr stark an den Nukleoli. Dabei ist kein Unterschied in der Intensität im Vergleich zum RPS18Tt festzustellen. Daher wurde der C-terminale Teil weiter fragmentiert und sowohl das Konstrukt RPS18(48-77)Tt als auch RPS18(56-88)Tt werden sehr effektiv ins Nukleoplasma importiert und akkumulieren ringförmig an den Nukleoli. Um bestätigen zu können, dass sich im Bereich der Aminosäuren (48-77) bzw. (56-77) ein NLS befindet, wurden diese als β-Gal-Fusionspeptide exprimiert, wobei beide an Position 72 eine Mutation aufwiesen, da vermutet wurde, dass das Arginin (R) an dieser Stelle essentieller Bestandteil des NLS ist.

Daher wurde es in ein Alanin (A) mutiert. Die dabei verwendeten Primer finden sich im Anhang unter 11.2.10.

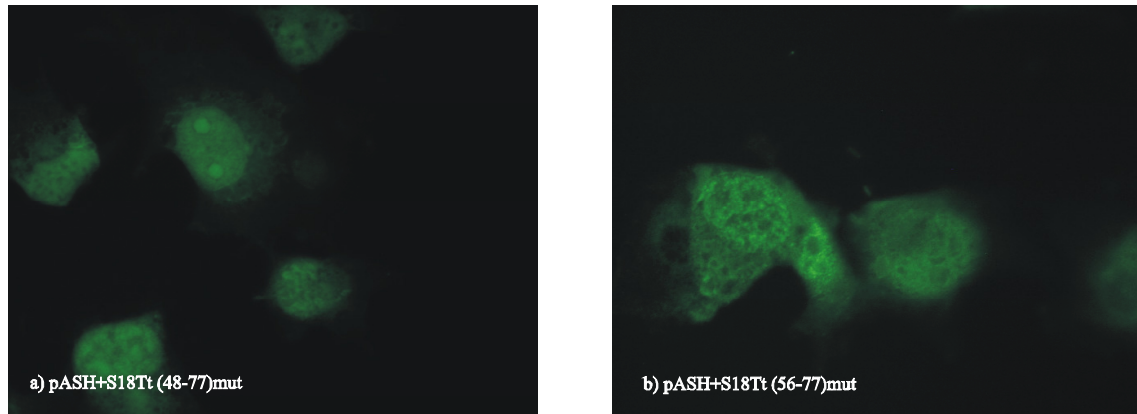


Abbildung 6.25: **Intrazelluläre Lokalisation verschiedener S18-β-Gal-Fusionspeptide in COS-Zellen.**

COS-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pASH+S18Tt (48-77)mut(72 R->A) und (b) pASH+S18Tt (56-77)mut(72 R->A); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS18 von *T. thermophilus* als S18Tt bezeichnet.

In Abbildung 6.25 sieht man, dass durch die Mutation innerhalb des postulierten Kernsignals der Import in den Zellkern zwar nicht komplett unterbunden wird, aber doch deutlich eingeschränkt ist verglichen mit den Konstrukten ohne Mutation. Bei S18(56-77)mutTt in Abbildung (b) ist eine starke zytoplasmatische Färbung und keinerlei Akkumulation an den Nukleoli auszumachen, weitere Zellen zeigten in einigen Fällen eine rein zytoplasmatische Lokalisation. Dagegen erkennt man bei Konstrukt S18(48-77)mutTt in Abbildung (a), dass nur die Effizienz des Kernimports reduziert ist, aber alle Zellen eine klare nukleoplasmatische Lokalisation zeigen. Bei einigen Zellen findet, wie in Abbildung 6.25 (a) zu sehen, auch noch eine Nukleoliakkumulation statt, so dass das NuLD wohl noch vorhanden sein muss, die Effizienz der Interaktion mit der rRNA an den Nukleoli aber stark eingeschränkt ist. Auf den kompensatorischen Effekt, der die Unterschiede von (a) und (b) bedingt, wird ausführlich im Zusammenhang mit der Aminosäuresequenz in der Diskussion eingegangen.

6.6 Austausch von Domänen zwischen dem bakteriellen RPS9 von *E. coli* und dem humanen RPS16

Da in einer früheren Diplomarbeit in diesem Arbeitskreis die Hypothese aufgestellt wurde, dass der C-Terminus des humanen RPS16 für seinen Einbau bzw. seine Interaktion mit der rRNA essentiell ist, wurden Konstrukte mit vertauschten C-Termini konstruiert, in der Hoffnung, so einen Einbau in die Ribosomen bewirken zu können.

Im ersten Fall wurde der N-Terminus, RPS16(1-102)Hs, des humanen Proteins mit dem C-Terminus des bakteriellen Proteins, RPS9(93-130)Ec, gekoppelt, im zweiten Fall erfolgte dies genau umgekehrt: RPS9(1-92)Ec wurde mit RPS16(103-146)Hs verknüpft.

6.6.1 Klonierung der Plasmide zur Expression spezifischer Domänen

Für die Analyse der Konstrukte wurden diese in die Vektoren pEGFP-C1x2 und pcDNA5/FRT/TO kloniert. Mit Hilfe des ersten Vektors wurden die Konstrukte mit zwei EGFP am N-Terminus derivatisiert, so dass der C-Terminus nicht beeinträchtigt war, und nach Transfektion in HeLa-Zellen deren Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop ermittelt.

Der zweite Vektor diente zur Expression der Konstrukte ohne Kopplung an ein Reporter-molekül in HeLa-Zellen. Diese wurden anschließend fraktioniert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die für die Klonierung verwendeten Primer sind im Anhang unter 11.2.11 abgebildet.

Zuerst wurden per PCR die Konstrukte S9(1-92)Ec, S9(93-130)Ec, S16(1-102)Hs und S16(103-146)Hs synthetisiert. Als Templat diente beim RPS9 von Ec die genomische DNA, beim RPS16 wurde das Plasmid pASH+S16Hs verwendet.

Im Anschluss daran wurden die Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert (*Hind III* und *EcoR I* sowie *EcoR I* und *BamH I*). Die Vektoren pEGFP-C1x2 und pcDNA5/FRT/TO wurden mit *Hind III* und *BamH I* restringiert.

Im Ligationsansatz wurden im ersten Fall die restringierten Fragmente S9(1-92)Ec und S16(103-146)Hs, im zweiten Fall S16(1-102)Hs und S9(93-130)Ec zusammen mit dem restringierten Vektor pEGFP-C1x2 eingesetzt.

Durch Sequenzierung wurden die Konstrukte überprüft und mittels einfacher Restriktion unter Verwendung von *Hind III* und *BamH I* in den Vektor pcDNA5/FRT/TO umkloniert.

6.6.2 Lokalisation der mit EGFP derivatisierten Domänen austausch-Konstrukte

Die beiden mit zwei EGFP derivatisierten Konstrukte wurden in eukaryontischen HeLa-Zellen transient exprimiert und im Fluoreszenzmikroskop deren Lokalisation analysiert.

Auch die Konstrukte ohne Reportermolekül wurden auf diese Weise untersucht, allerdings erfolgte die Detektion in diesem Fall indirekt über den bereits beschriebenen polyklonalen Anti-S9-Ak. Einerseits diente dies zur Überprüfung der Daten, die in der direkten Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden konnten, andererseits konnte so sicher gestellt werden, dass der Antikörper beide Domänen austausch-Konstrukte detektiert, was für die spätere Analyse der Zellkompartimente von HeLa-Zellen von Bedeutung war.

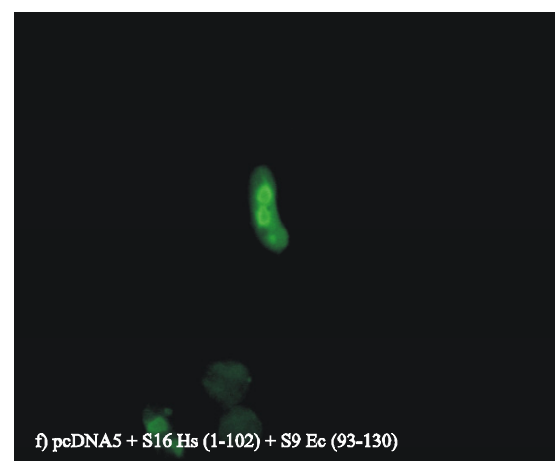
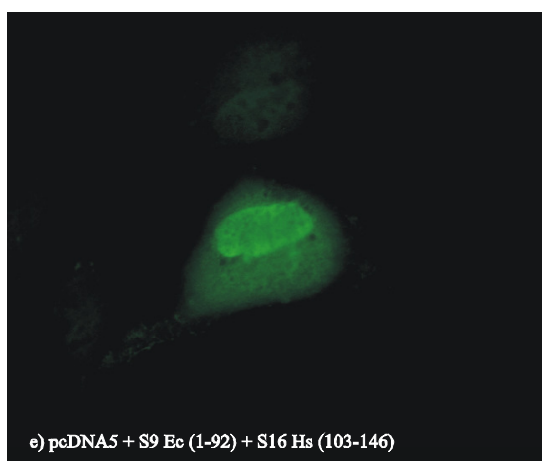
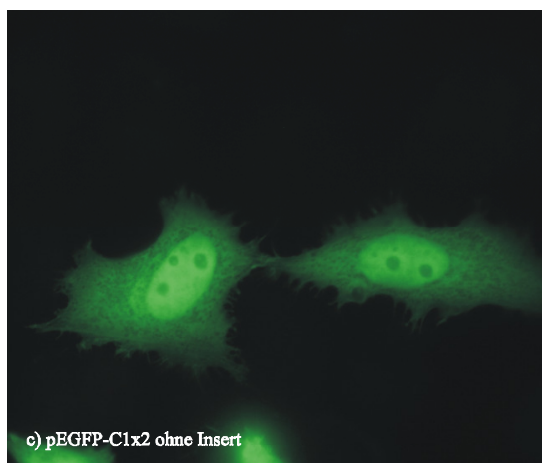
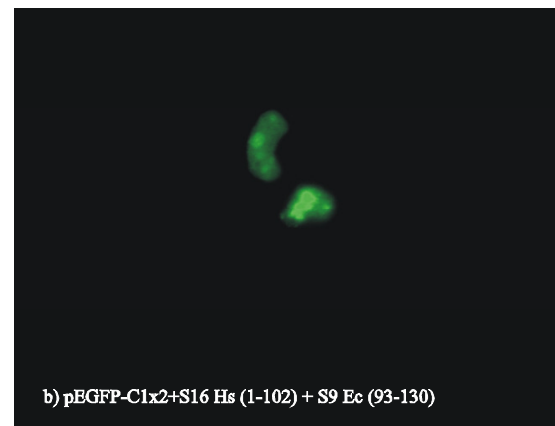
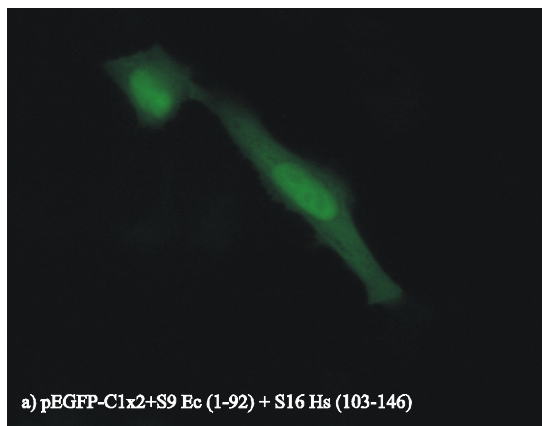


Abbildung 6.26: **Intrazelluläre Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte in HeLa-Zellen.**

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit den Plasmiden (a) pEGFP-C1x2+S9(1-92)+S16Hs(103-146), (b) pEGFP-C1x2+S16Hs(1-102)+S9Ec(93-130), (c) pEGFP-C1x2 ohne Insert, (d) pEGFP-C1x2+S16Hs, (e) pcDNA5+S9Ec(1-92)+S16Hs(103-146) und (f) pcDNA5+S16Hs(1-102)+S9Ec(93-130); für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das RPS16 von *H. sapiens* als S16Hs bezeichnet.

Abbildung 6.26 (b) kann man entnehmen, dass das Konstrukt EGFP-EGFP-S16Hs(1-102)-S9Ec(93-130) – im folgenden als 2xEGFP S16/S9 bezeichnet – nur im Nukleoplasma der transfizierten HeLa-Zellen zu finden ist und in den Nukleoli akkumuliert. Zum Vergleich ist unter (d) das mit zwei EGFP derivatisierte RPS16Hs abgebildet, von dem ein aktiver Import belegt ist und welches die gleiche Lokalisation aufweist.

EGFP-EGFP-S9Ec(1-92)-S16Hs(103-146) – im folgenden als 2xEGFP S9/S16 bezeichnet – ist hauptsächlich im Nukleoplasma zu finden, weist aber auch eindeutig eine zytoplasmatische Färbung auf. In (c) ist nochmals die Lokalisation des EGFP-EGFP-Proteins ohne Insert dargestellt, das nur aufgrund passiver Diffusion im Zellkern akkumuliert, da das Protein EGFP kein NLS besitzt. Man sieht, dass die Verteilung der Signale in (a) und (c) beinahe identisch ist, was darauf hindeutet, dass auch die nukleoplasmatische Akkumulation von 2xEGFP S9/S16 auf passive Diffusion zurückzuführen ist.

Die Aufnahmen (e) und (f) – diese Konstrukte werden im weiteren als S9/S16 bzw. S16/S9 bezeichnet – bestätigen zum einen, dass der polyklonale Anti-S9-Ak sowohl S16/S9 als auch S9/S16 detektiert, zum anderen belegen sie die gerade beschriebene Lokalisation von 2xEGFP S9/S16 bzw. 2xEGFP S16/S9. Der einzige Unterschied besteht wiederum darin, dass das Konstrukt S16/S9 im Gegensatz zum 2xEGFP S16/S9 ringförmig an und nicht in den Nukleoli akkumuliert.

6.6.3 Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte in HeLa-Zellfraktionen

HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten S16/S9 und S9/S16 transfiziert, aufgearbeitet und die Ribosomen wurden pelletiert. Die anschließende Detektion mit dem Anti-S9-Ak im Western Blot lieferte das in der folgenden Abbildung gezeigte Bandenmuster, wobei zunächst nur die Ergebnisse des S16/S9 im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt sind.

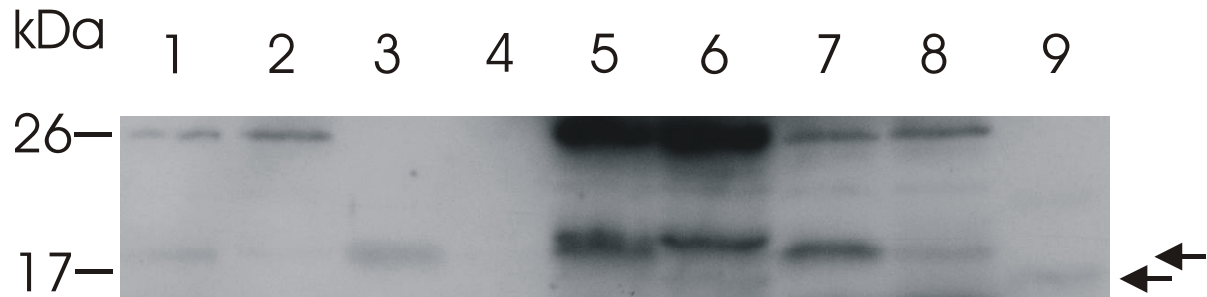


Abbildung 6.27: **Nachweis des Domänen austausch-Konstrukts S16/S9 in transfizierten HeLa-Zellfraktionen durch Western-Blotting.**

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden ein Zelllysate, das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine zytoplasmatische Fraktion, eine Kernfraktion und eine Ribosomenfraktion isoliert. Entsprechende Fraktionen wurden von nicht-transfizierten HeLa-Zellen als Negativkontrollen isoliert. Die Spuren 1 und 2 enthalten die zytoplasmatische Fraktion transfizierter bzw. nicht-transfizierter HeLa-Zellen, die Spuren 3 und 4 die Kernfraktionen, die Spuren 5 und 6 die Ribosomenextrakte und die Spuren 7 und 8 die Zelllysate.

In den Spuren 1 bis 4 und 7 und 8 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen, während die Spuren 5 und 6 den Extrakt aus 1.000.000 Zellen enthalten. In Spur 0 wurde als Molekulargewichtsmarker eine gefärbte Proteinleiter und in Spur 9 der Zellextrakt aus *E. coli* DH5α-Zellen als Positivkontrolle geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17.5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile geben die Höhe des Konstrukts S16/S9 bzw. der Positivkontrolle an.

Die in Spur 9 aufgetragene Positivkontrolle bei ca. 16 kDa (unterer Pfeil) ist nur sehr schwach zu erkennen und befindet sich unterhalb der detektierten Banden des S16/S9 (oberer Pfeil). Dies liegt daran, dass dieses Konstrukt statt der 130 AS des RPS9 von *Ec* 140 AS und damit ein höheres Molekulargewicht sowie eine andere Ladungsverteilung aufweist.

Im Zytoplasma lässt sich fast kein S16/S9 nachweisen (Spur 1), auch das Signal der Zellkerne ist schwach (Spur 3), aber dennoch deutlich stärker als das zytoplasmatische.

Bei der Analyse der Ribosomen muss beachtet werden, dass einerseits die 20-fache Menge aufgetragen wurde, andererseits ganz knapp über der zu detektierenden Bande eine starke Hintergrundbande erscheint. Betrachtet man die Spuren 5 bis 7 und die exakt gleiche Höhe sämtlicher Hintergrundbanden, so kann man die Doppelbande in Spur 5 ausmachen, was belegt, dass S16/S9 mit den Ribosomen interagiert.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass das S16/S9 in sämtlichen analysierten Zellfraktionen, v. a. aber im Zellkern zu detektieren ist.

Im nächsten Blot sind die Fraktionen von HeLa-Zellen dargestellt, die die Konstrukte S9/S16 bzw. S16/S9 exprimieren, sowie nicht transfizierte Kontrollen.



Abbildung 6.28: **Nachweis der Domänen austausch-Konstrukte in transfizierten HeLa-Zellfraktionen durch Western-Blotting.**

Von transfizierten HeLa-Zellen wurden ein Zelllysate, das sowohl zytoplasmatische als auch nukleare Proteine enthält, eine Kernfraktion und eine Ribosomenfraktion isoliert. Entsprechende Fraktionen wurden von nicht-transfizierten HeLa-Zellen als Negativkontrollen isoliert. Die Spuren 1, 2 und 3 enthalten die Kernfraktionen transfizierter bzw. nicht-transfizierter HeLa-Zellen, in der Reihenfolge S9/S16, S16/S9, nicht-transfiziert, die Spuren 4 bis 6 entsprechend die Ribosomenextrakte; die Spuren 7 und 8 enthalten die Zelllysate von S9/S16 bzw. S16/S9.

In den Spuren 1 bis 3 und 7 und 8 wurde der Proteinextrakt von ca. 50.000 Zellen geladen, während die Spuren 4 bis 6 den Extrakt aus 1.000.000 Zellen enthalten. In Spur 0 wurde als Molekulargewichtsmarker eine gefärbte Proteinleiter geladen.

Die Fraktionen wurden auf einem 17,5%-igen SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Anti-S9-Antikörper nachgewiesen. Die Pfeile geben die Höhe der Konstrukte S9/S16 bzw. S16/S9 an.

Die Banden des S16/S9 (oberer Pfeil) liegen höher als die des S9/S16 (unterer Pfeil), wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Ladungsverteilungen.

Die Gesamtzellextrakte in den Spuren 7 und 8 dokumentieren eine erfolgreiche Transfektion, im Falle des S9/S16 ist die Effizienz aber sehr gering. Dennoch lässt es sich sowohl im Zellkern (Spur 1) als auch in den Ribosomen (Spur 4) schwach nachweisen. Deutlich stärker sind die Signale des S16/S9, das v. a. im Zellkern (Spur 2), aber auch in den Ribosomen (Spur 5) vorzufinden ist, wobei bei der Analyse der Ribosomen die bereits beim vorherigen Blot dargestellten Schwierigkeiten zu berücksichtigen sind.

6.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In 6.7.1 ist die Lokalisation aller untersuchten prokaryontischen ribosomalen Proteine dargestellt, wobei nur die β -Galaktosidase-Fusionsproteine und die zugehörigen Aminosäuresequenzen abgebildet sind.

Unter 6.7.2 finden sich nur die wichtigsten β -Galaktosidase-Fusionspeptide des S9-Proteins von *E. coli* mit den jeweiligen Aminosäuresequenzen, die ein Eingrenzen des Kernlokalisationssignals ermöglichten.

Gleiches gilt für die unter 6.7.3 gezeigten β -Galaktosidase-Fusionspeptide des RPS18 von *T. thermophilus*.

In 6.7.4 sind die β -Galaktosidase-Fusionspeptide des humanen RPS16 dargestellt, auf deren ausführliche Darstellung verzichtet wurde.

Die Balken aller zusammengefassten Ergebnisse sind je nach der Lokalisation der Proteine gefärbt. Grüne Balken zeigen eine nukleoplasmatische Lokalisation, rote eine zytoplasmatische an. Gelbe Balken stehen für Konstrukte, die sowohl im Nukleoplasma als auch im Zytoplasma zu finden sind, was auf eine eingeschränkte Effizienz des Imports zurückzuführen ist.

Die Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstabencode abgebildet, wobei die basischen Aminosäuren Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R) blau hervorgehoben sind, da es sich um wesentliche Bestandteile von klassischen Kernlokalisationssignalen handelt. Mutierte Aminosäuren sind rot markiert.

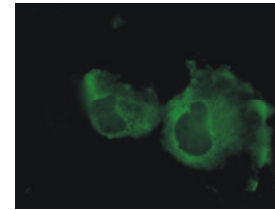
6.7.1 Lokalisation der prokaryontischen ribosomalen Proteine S6, S9, S12, S17 und S18 von *T. thermophilus* sowie des S9 von *E. coli*

S6 Tt - β -Gal

```

1  MRRYEYVNIVL NPNLDQSOLA LEKEIIQAL ENYGARVEKV EELGLRLAY
51  PIAKDPQGYF LWYQVEMPED RVNDLARELR IDNVRRVMV VKSQEPFLAN
101 A

```

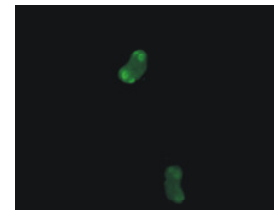


S9 Tt - β -Gal

```

1  MEQYYGTGRR KEAVARVFLR PGNGKVTVNG QDFNEYFQGL VRAVAALEPL
51  RAVDALGHFD AYITVRGGGK SGQIDAIKLG IARALVQYNP DYRAKLKPLG
101 FLTRDARVVE RKKYGKHKAR RAPQYSKR 128

```

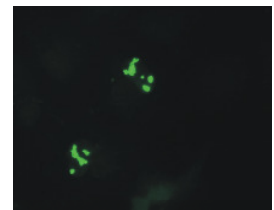


S12 Tt - β -Gal

```

1  VVALPTINQL VRKGREKVRK KSKVPALKGA PFRRGVCTVV RTVTPKKPNS
51  ALRKVAKVRL TSGYEVTAYI PGECHNLQEH SVVLIRGGRV KDLPGVRYHI
101 VRGVYDAAGV KDRKKSRSKY GTKKPKAAK TAAKK 135

```

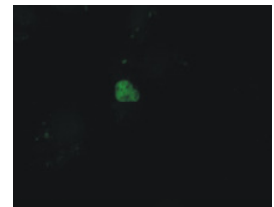


S17 Tt - β -Gal

```

1  MPKKVLTGVV VSDKMQKTVT VLVERQFPHF LYGKVIKRSK KYLAHDPEEK
51  YKLGDVVEII ESPISKRRK FRVLRLVESG RMDLVEKYLI RRQNYESLSK
101 RGGKA 105

```

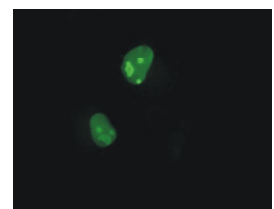


S18 Tt - β -Gal

```

1  LSTKNAKPKK EAQRRPSRKA KVKATLGEFD LRDYRNVEVL KRFLSETGKI
51  LPRRRRTGLSA KEQRILAKTI KRARILGLLP FTEKLVRK 88

```



S9 Ec - β -Gal

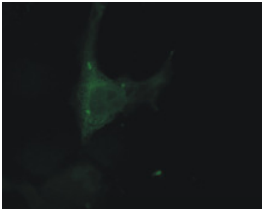
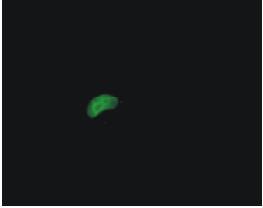
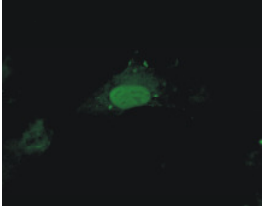
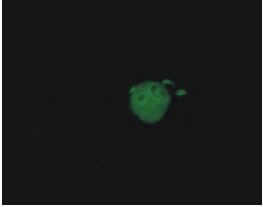
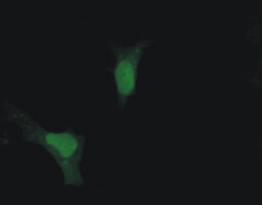
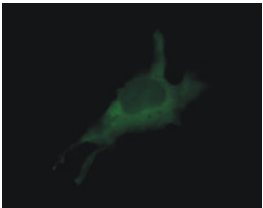
```

1  MAENQYYGTG RRKSSAAVVF IKPGNGKIVI NQRSLEQYFG RETARMVVRQ
51  PLELVDMVEK LDLYITVKGG GISGQAGAIR HGITRALMEY DESLRSELRK
101 AGFVTRDARQ VERKKVGLRK ARRRPQFSKR 130

```



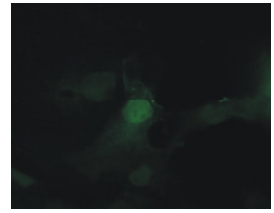
6.7.2 Eingrenzung des NLS des prokaryontischen RPS9 von *E. coli*

1-92		
1	MAENQYYGTG RRKSSAARVF IKPGNGKIVI NQRSLEQYFG RETARMVVRQ	
51	PLELVDMVE K LDLYITV KGG GISGQAGAIR HGITRALMEY DE 92	
109-130		
109	FQ VERKKVGLRK ARRRPQFSKR 130	
116-130		
116	VGLRK ARRRPQFSKR 130	
113-125		
113	RKKVGLRK ARRRP 125	
117-125		
117	GLRK ARRRP 125	
117-125 mut		
117	GLRA ARRRP 125	

6.7.3 Eingrenzung des NLS des prokaryontischen RPS18 von *T. thermophilus*

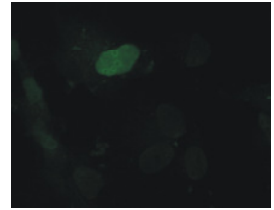
S18 Tt (1-47) - β -gal

1 LSTKNAKPKK EAQRRPSRKA KVKATLGEFD LRDYRNVEVL KRFLSET 47



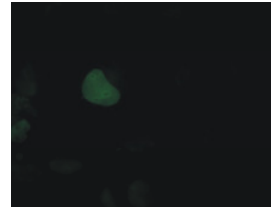
S18 Tt (48-77)-
 β -gal

48 GKI LPRRRTGLSA KEQRILAKTI KRARILG 77



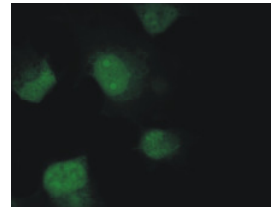
S18 Tt (56-88)-
 β -gal

56 TGLSA KEQRILAKTI KRARILGLLP FTEKIVRK 88



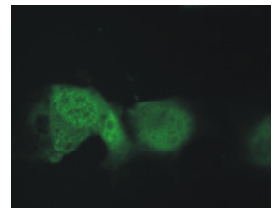
S18 Tt(48-77)-
 β -gal mut

48 GKI LPRRRTGLSA KEQRILAKTI KRARILG 77



S18 Tt(56-77)-
 β -gal mut

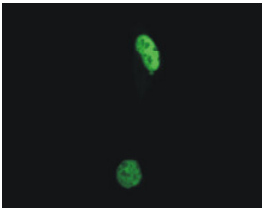
56 TGLSA KEQRILAKTI KRARILG 77



6.7.4 Lokalisation der β -Galaktosidase-Fusionspeptide des humanen RPS16

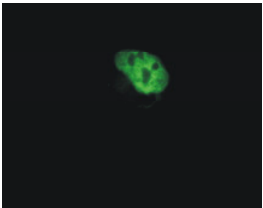
S16Hs - β -Gal (1-146)

1 MPSKGPLQSV QVFG**R**KK**T**AT AVA**H**C**K**R**G**NG LI**K**V**N**G**R**PLE MIEP**R**TLQ**Y****K**
51 LLEPVLL**L**G**K** E**R**FAGVDI**R**V **R**V**K**GGG**H**VAQ IYAI**R**Q**S**IS**K** ALVAYYQ**K**YV
101 DEAS**K**KEI**K**D ILIQYD**R**TLL VADP**R**R**C**ES**K** **K**FGGPGAR**A**R YQ**K**SY**R** 146



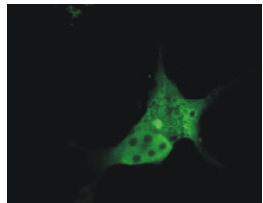
S16Hs - β -Gal (1-120) Fragment 6

1 MPSKGPLQSV QVFG**R**KK**T**AT AVA**H**C**K**R**G**NG LI**K**V**N**G**R**PLE MIEP**R**TLQ**Y****K**
51 LLEPVLL**L**G**K** E**R**FAGVDI**R**V **R**V**K**GGG**H**VAQ IYAI**R**Q**S**IS**K** ALVAYYQ**K**YV
101 DEAS**K**KEI**K**D ILIQYD**R**TLL 120



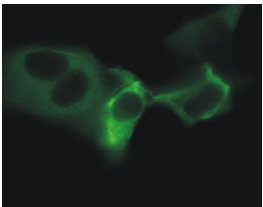
S16Hs - β -Gal (1-80) Fragment 5

1 MPS**K**GPLQSV QVFG**R**KK**T**AT AVA**H**C**K**R**G**NG LI**K**V**N**G**R**PLE MIEP**R**TLQ**Y****K**
51 LLEPVLL**L**G**K** E**R**FAGVDI**R**V **R**V**K**GGG**H**VAQ 80



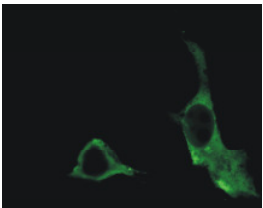
S16Hs - β -Gal (1-55) Fragment 2

1 MPS**K**GPLQSV QVFG**R**KK**T**AT AVA**H**C**K**R**G**NG LI**K**V**N**G**R**PLE MIEP**R**TLQ**Y****K**
51 LLEPV 55



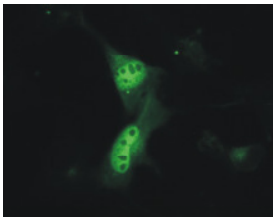
S16Hs - β -Gal (55-80)
Fragment 4

55 VLL**L**G**K** E**R**FAGVDI**R**V **R**V**K**GGG**H**VAQ 80



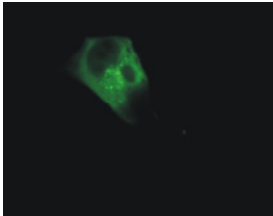
S16Hs - β -Gal (55-146) Fragment 8

55 VLLLGK ERFAGVDIRV RVKGGGHVAQ IYAIRQSISK ALVAYYQKYV
101 DEASKKEIKD ILIQYDRTLL VADPRRCESK KFGGPGARAR YQKSYR 146



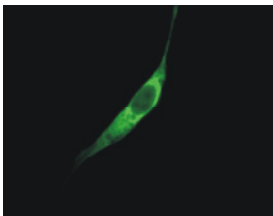
S16Hs - β -Gal (80-146) Fragment 9

80 IYAIRQSISK ALVAYYQKYV
101 DEASKKEIKD ILIQYDRTLL VADPRRCESK KFGGPGARAR YQKSYR 146



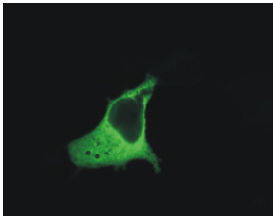
S16Hs - β -Gal (120-146)
Fragment 10

120 VADPRRCESK KFGGPGARAR YQKSYR 146



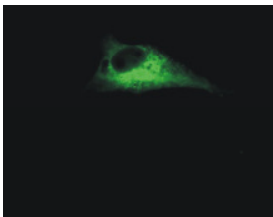
S16Hs - β -Gal (55-120)
Fragment 7

55 VLLLGK ERFAGVDIRV RVKGGGHVAQ IYAIRQSISK ALVAYYQKYV
101 DEASKKEIKD ILIQYDRTLL 120



S16Hs - β -Gal (80-120)
Fragment 3

80 IYAIRQSISK ALVAYYQKYV
101 DEASKKEIKD ILIQYDRTLL 120



7. Diskussion

7.1 Passiver Kernimport von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 60 kDa

Es wurde in dieser Arbeit schon darauf hingewiesen, dass sich in der Fachliteratur keine eindeutigen Angaben über das Molekulargewicht von Makromolekülen finden lassen, die noch passiv durch den Kernporenkomplex ins Nukleoplasma eukaryontischer Zellen diffundieren können. So sprechen einige Autoren davon, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht (MW) über 50 kDa (Poon und Jans, 2005) nur noch aktiv durch Interaktion mit Transportfaktoren importiert werden, andere geben 60 kDa als obere Grenze an (Wang und Clapham, 1999). Keminer und Peters zeigten 1999, dass Dextrane mit einem MW über 40 kDa nicht mehr passiv diffundierten.

Die in Abbildung 6.3 dargestellte intrazelluläre Lokalisation der Proteine EGFP bzw. EGFP-EGFP in HeLa-Zellen belegt, dass beide passiv in den Zellkern diffundieren, obwohl sie kein NLS besitzen. Die Diffusionsrate des EGFP-EGFP ist verglichen mit EGFP aufgrund seines doppelten MW von ca. 54 kDa geringer.

In einer Studie zum nuklearen Import wurden HeLa-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das ein trimeres EGFP-Protein exprimiert. Dieses lokalisierte zu 98% im Zytoplasma, was darauf schließen lässt, dass es mit einem MW von ca. 81 kDa nicht mehr passiv diffundiert (Sakakida et al., 2005). Unterstützt wird dies durch die in dieser Arbeit ermittelte Lokalisation der mit dem trimeren EGFP derivatisierten Konstrukte S9(1-108)Ec bzw. S9(93-108)Ec in Abbildung 6.16. Beide weisen keine nukleoplasmatische Lokalisation mehr auf, ihre theoretisch berechneten Molekulargewichte liegen bei 94 kDa bzw. 83 kDa. Betrachtet man jedoch die Konstrukte S9(1-92)Tt und S9(1-92)Ec in den Abbildungen 6.12 und 6.14 zeigt sich, dass die mit β -Galaktosidase derivatisierten Konstrukte ausschließlich zytoplasmatisch lokalisieren, da das Enzym β -Gal ein Tetramer mit einem MW von 464 kDa ausbildet und keine passive Diffusion von Fusionsproteinen ohne NLS mehr zulässt.

Dagegen konnten die mit zwei EGFP derivatisierten Konstrukte auch im Nukleoplasma detektiert werden (Abbildung 6.12). Zwar ist im Falle des S9(1-92)Ec eine zytoplasmatische Lokalisation dargestellt, doch es fanden sich auch viele transfizierte Zellen, die die gleiche Verteilung wie bei S9(1-92)Tt zeigten, für welches keine Abbildung ohne nukleoplasmatische Färbung gewonnen werden konnte. Da das MW der EGFP-Fusionspeptide bei ca. 65 kDa liegt, zeigen die Daten für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine, dass

die Ausschlussgröße für passive Diffusion im Bereich zwischen 65 kDa und 83 kDa liegt. Die gleichen Beobachtungen wurden auch in der während dieser Dissertation betreuten Diplomarbeit zum Kernimport der ribosomalen Proteine S12 und S17 von *Thermus thermophilus* gemacht. Auch hier lokalisierten die mit zwei EGFP derivatisierten Fusionspeptide nicht ausschließlich im Zytoplasma, auch wenn mit den entsprechenden β -Gal-Fusionspeptiden eine rein zytoplasmatische Lokalisation bestätigt werden konnte, die Konstrukte also kein NLS aufwiesen.

Bezieht man die Daten der Dextran-Lokalisation mit ein (Keminer und Peters, 1999) lässt sich festhalten, dass die passive Diffusion in den Zellkern sowie deren Effizienz in erster Linie vom Molekulargewicht, aber auch stark von der Zusammensetzung und Struktur der diffundierenden Makromoleküle abhängt.

7.2 Aktiver Kernimport prokaryontischer ribosomaler Proteine

Eukaryontische ribosomale Proteine werden im Zytoplasma produziert und müssen ins Nukleoplasma importiert und zu den Nukleoli dirigiert werden, um dort in die ribosomalen Untereinheiten eingebaut zu werden. Daher besitzen sie mindestens ein NLS.

Da Prokaryonten keinen Zellkern besitzen, benötigen ihre RPs kein NLS für ihre funktionelle Aktivität. Zwar erwähnten Wool et al. bereits 1995, dass bei Aminosäuresequenzanalysen hinsichtlich bipartiter NLS die ribosomalen Proteine von *E. coli* zu ca. 20% ähnliche NLS-Strukturmotive aufwiesen wie die untersuchten RPs der Hefe. Sie spekulierten, dass es sich entweder um ein zufälliges Vorhandensein handeln könnte, oder dass bei der Evolution der Kernmembran und der Transportmaschinerie zu Beginn auf den bereits vorhandenen basischen Charakter der prokaryontischen RPs zurückgegriffen wurde, der diesen die Interaktion mit der rRNA ermöglicht. Doch es finden sich keine Publikationen über die Lokalisation prokaryontischer RPs in eukaryontischen Zellen.

Wie in der Zusammenfassung unter 6.7.1 dargestellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, dass das ribosomale Protein S9 von *E. coli* sowie die RPs S9, S12, S17 und S18 von *T. thermophilus* aktiv ins Nukleoplasma eukaryontischer HeLa-Zellen importiert werden. Sie müssen also mindestens ein NLS besitzen, das die Interaktion mit der eukaryontischen Transportmaschinerie ermöglicht.

Abgesehen vom RPS17Tt akkumulieren die Proteine an den Nukleoli, so dass sie auch eine Nukleoluslokalisationsdomäne (NuLD) aufweisen. Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass nukleolare Proteine nicht aufgrund eines nukleolaren Lokalisationssignals, sondern wegen funktioneller Interaktion mit bereits in Nukleoli vorhandenen Ma-

kromolekülen in den Nukleoli akkumulieren (Tsai und McKay, 2005), und dass für ribosomale Proteine nachgewiesen werden konnte, dass die Aminosäurenbereiche von NuLD und NLS manchmal überlappen (Rosorius et al., 2000).

Abgesehen von den RPs S12 und S18 lässt sich für alle Fusionsproteine bzw. -peptide, die eine NuLD besitzen, das Phänomen beobachten, dass die mit einem bzw. zwei EGFP derivatisierten Konstrukte in den Nukleoli lokalisieren, während die trimeren EGFP-Konstrukte und die mit β -Gal gekoppelten Fusionsproteine sowie die ohne Reportermolekül exprimierten und mit dem S9-Antikörper detektierten RPS9 ringförmig um die Nukleoli akkumulieren, nicht aber innerhalb der Nukleoli detektiert werden können.

Da die RPs S12 und S18 eine besonders starke Nukleoliakkumulation zeigten, wird die Detektion der entsprechenden β -Gal-Fusionsproteine in den Nukleoli auf die Signalstärke zurückgeführt, zumal die S18- β -Gal-Fusionspeptide mit NuLD nur die ringförmige Akkumulation bewirkten.

Die unterschiedliche Lokalisation ist von der Größe der Fusionsproteine abhängig. Offensichtlich können die mit zwei EGFP derivatisierten Konstrukte noch in den Nukleoli mit der rRNA interagieren, wohingegen die trimeren EGFP-Konstrukte aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen Konformationsänderung nur noch an der Peripherie der Nukleoli interagieren können. Gleiches gilt für die β -Gal-Fusionsproteine, wobei die durch den Reporter bewirkte Tetramerisierung Komplexe mit einem MW von über 425 kDa entstehen lässt.

Im Falle der ohne Reportermolekül exprimierten RPS9 wird die ringförmige Akkumulation um die Nukleoli auf den für ihre Detektion verwendeten S9-Antikörper zurückgeführt. Dieser kann nur die an der Peripherie lokalisierten RPs binden, während die Bindungsstellen innerhalb der Nukleoli durch die Interaktion mit der rRNA maskiert sind.

7.3 Kernlokalisierungssignal und Nukleoluslokalisationsdomäne des RPS18Tt

Die prokaryontischen RPs S6 und S18 von Tt wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation in eukaryontischen COS-Zellen analysiert, da sie keine Homologen bei den Eukaryonten haben, also im Laufe der Evolution nicht weitergegeben wurden oder verloren gegangen sind. RPS6Tt zeigte eine rein zytoplasmatische Akkumulation, seine Aminosäuresequenz ist hier kurz dargestellt, um zu zeigen, dass es keine Regionen mit einem gehäuftem Auftreten basischer Aminosäuren besitzt.

```

1   MRRYEVNIVL NPNLDQSQLA LEKEIIQRAL ENYGARVEKV
41  EELGLRLLAY PIAKDPQGYF LWYQVEMPED RVNDLARELR
81  IRDNVRRVMV VKSQEPFLAN A

```

Abbildung 7.1: **Aminosäuresequenz des RPS6 von *T. thermophilus*.**

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; basische AS sind blau markiert.

Dagegen wird das RPS18Tt nicht nur aktiv in den Zellkern importiert, sondern weist eine stark ausgeprägte nukleolare Akkumulation auf. Anhand der Aminosäuresequenz wird die Lokalisation der S18- β -Gal-Fusionspeptide in Zusammenfassung 6.7.3 diskutiert und das für den Import verantwortliche Kernlokalisierungssignal charakterisiert.

```

1   LSTKNAKPKK EAQRRPSRKA KVKATLGEFD LRDYRNVEVL
41  KRFLSETGKI LPRRRTGLSA KEQRILAKTI KRARILGLLP
81  FTEKLVRK

```

Abbildung 7.2: **Aminosäuresequenz des RPS18 von *T. thermophilus*.**

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; basische AS sind mit Ausnahme der AS Arginin (R) an Position 72 blau markiert; AS 72 ist rot gefärbt, da R (Arginin) bei den beiden Konstrukten mit Mutation in ein A (Alanin) umgewandelt wurde. Die für NLS bzw. NuLD essentiellen Bereiche sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Bereits der N-Terminus S18(1-47)Tt wird, wenn auch eingeschränkt, aktiv in den Zellkern importiert, obwohl dort kein klassisches NLS vorhanden ist. Offensichtlich reichen die basischen Aminosäurebereiche - z. B. AS (7-10) oder AS (18-23) - aus, um eine Interaktion mit mindestens einem Transportfaktor zu ermöglichen. Ein funktionelles NuLD ist am N-Terminus aber nicht vorhanden, da er nicht an den Nukleoli nachzuweisen ist.

Der C-terminale Teil S18(48-88)Tt wird ebenso effektiv wie das komplette S18-Protein importiert und akkumuliert stark an den Nukleoli. Die Konstrukte S18(48-77)Tt und S18(56-88)Tt belegen, dass weder der C-Terminus noch der Bereich 53 RRR 55 diese Lokalisation beeinflusst.

Wird AS 72 in ein Alanin mutiert, geht die Information für den Kernimport des Konstrukts S18(56-77)mutTt zwar nicht komplett verloren, doch ist er stark eingeschränkt, und es findet keine Nukleoliakkumulation mehr statt.

Interessanterweise spielt es ohne Mutation keine Rolle, ob der Bereich 53 RRR 55 im Fusionspeptid enthalten ist oder nicht. Sobald aber die Mutation eingeführt wird, haben die basischen Arginine einen kompensatorischen Effekt, so dass das längere der mutierten Konstrukte S18Tt(48-77)mutTt nicht nur einen wesentlich effektiveren Import aufweist, sondern in einigen Zellen wieder an den Nukleoli akkumuliert. Ähnliche Beobachtungen wurden beim bipartiten NLS III des RPS6a aus der Hefe gemacht (Lipsius et al., 2005).

Die Sequenz KRAR wurde bereits in einigen Publikationen als Teil eines bipartiten NLS beschrieben (Hong und Engler, 1991; Hodel et al., 2006; Sakakida et al., 2005; Shurvinton et al., 1992). Dabei ermittelten Shurvinton et al. die Sequenz als essentiellen Bestandteil des NLS des Fiberproteins vom Adenovirus mit Serotyp 2. Bei weiteren Analysen mit β -Gal-Fusionsproteinen zeigten sie, dass die Sequenz KRARP allein nicht ausreicht, um das Enzym β -Galaktosidase effektiv in den Zellkern zu transportieren, da sie nur eine schwache nukleoplasmatische im Vergleich zu einer starken zytoplasmatischen Akkumulation beobachten konnten. Allerdings zeigte ein um 5 AS verlängertes Konstrukt eine sehr starke Lokalisation im Zellkern, woraus sich schließen lässt, dass die flankierenden Aminosäuren des NLS einen Einfluss auf die Transporteffizienz haben (Chelsky et al., 1989).

Bereits 1987 wurde gezeigt, dass Minimalsequenzen von NLS an verschiedenen Positionen innerhalb eines Proteins funktionell aktiv sein können, in bestimmten Bereichen aber ihre Aktivität reduziert oder blockiert ist, was durch eine Maskierung der Andockstellen für die Transportfaktoren erklärt wird (Roberts et al., 1987).

Sakakida et al. ermittelten 2005, dass das humane Protein mCRY2 an seinem C-Terminus ein bipartites NLS mit der Sequenz KRAR als essentiellen Bestandteil aufweist. Es ist durch einen Abstand von 13 AS unterbrochen und liegt hinter der ebenfalls essentiellen Sequenz PKRK lokalisiert. In der AS-Sequenz des RPS18Tt sind 53 RRR 55 und 71 KRAR 74 durch einen Abstand von 15 AS getrennt, was sich in guter Übereinstimmung mit dem bipartiten NLS des mCRY2 befindet. Bereits 1991 beschrieben Dingwall und Laskey, dass in einem bipartiten NLS die basischen Peptidsequenzen mindestens 10 Aminosäuren voneinander getrennt sein müssen.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass das RPS18Tt ein klassisches bipartites NLS aufweist, wobei schon die Sequenz KRAR zusammen mit ihren flankierenden AS einen starken Kernimport und eine Nukleoliakkumulation bewirkt.

Unter dem evolutionären Aspekt ist es sehr interessant, dass prokaryontische RPs, die nicht von den Eukaryonten übernommen wurden oder im Laufe der Evolution verloren gegangen sind, sowohl ein NLS als auch eine NuLD besitzen. Daher kann man davon ausgehen,

dass bei der Entwicklung des Kerntransportsystems auf bereits bestehende prokaryontische Strukturen zurückgegriffen wurde. Dass dabei basische AS eine zentrale Rolle spielen verwundert nicht, wenn man berücksichtigt, dass diese auch bei den Prokaryonten essenziell für die Interaktion mit der rRNA während der Ribosomenbiogenese sind (Brodersen et al., 2002).

7.4 Vergleich der prokaryontischen RPS9 von Ec und Tt sowie des RPS16Hs

Das eukaryontische ribosomale Protein S16 und das prokaryontische RPS9 sind Homologe, d. h. sie gehören der gleichen Proteinfamilie an.

7.4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Sekundärstrukturen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen macht deutlich, dass die RPS9 einerseits stark konservierte Bereiche mit dem RPS16 gemeinsam haben, andererseits aber auch Regionen ohne entsprechende Konservierung aufweisen.

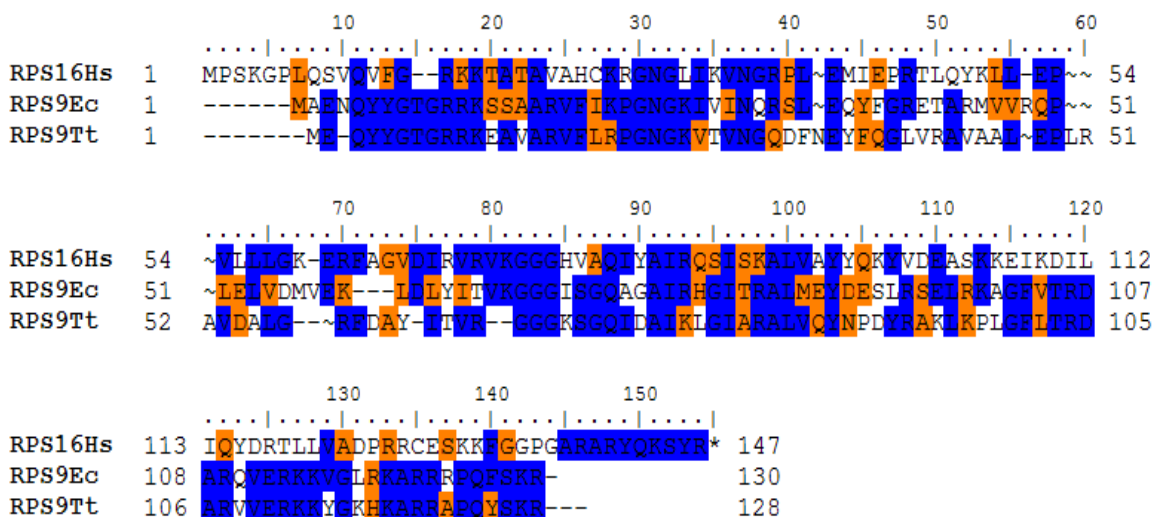


Abbildung 7.3: Aminosäuresequenzvergleich der prokaryontischen RPS9 von Ec und Tt mit dem humanen RPS16.

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; identische AS sind blau markiert, ähnliche orange.

So kann man Abbildung 7.3 entnehmen, dass der N-Terminus der Proteine einen sehr hohen Grad der Konservierung zeigt, der C-Terminus des RPS16 im Vergleich zu den prokaryontischen Proteinen aber stark abweicht. Dagegen ist die Konservierung der beiden Prokaryonten untereinander wie erwartet hoch.

Die prozentuale Verteilung identischer bzw. ähnlicher Aminosäuren wurde mit der Similarity Matrix PAM80 ermittelt.

Tabelle 7.1: Identische bzw. ähnliche Aminosäuren der prokaryontischen RPS9 von Ec und Tt sowie des humanen RPS16.

	S16 Hs	S9 Ec
S16 Hs	-	siehe Spalte 2
S9 Ec	31% bzw. 53%	-
S9 Tt	32% bzw. 43%	54% bzw. 73%

Dabei zeigt sich erneut, dass die RPS9 untereinander einen hohen Grad an Konservierung besitzen, da 54% ihrer AS identisch und 73% ähnlich sind. Dagegen ist die Homologie der prokaryontischen Proteine verglichen mit dem humanen RPS16 weniger stark ausgeprägt. So weisen beide zu ca. 30% identische AS mit dem RPS16 auf, bei den ähnlichen sind es im Falle des RPS9Ec 53%, beim RPS9Tt nur 43%.

Parakhnevitch et al. verglichen 2005 die bekannte Sekundärstruktur des RPS9Tt (Brodersen et al., 2002) mit einer Strukturvorhersage des humanen RPS16.



Abbildung 7.4: Vergleich der Sekundärstrukturen des RPS9Tt und des RPS16Hs.

(Parakhnevitch et al., 2005)

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; die grauen Balken zeigen die durch Röntgenstrukturanalysen ermittelten Positionen von α-Helices (Zylinder) und β-Faltblattstrukturen (Rechtecke) des RPS9Tt; die weißen Balken entsprechen den mit den Programmen GOR, PSIpred und SSpro berechneten Sekundärstrukturelementen des RPS16Hs.

Die Positionen der α-Helices und der β-Faltblattstrukturen zeigen zwar eine gute Übereinstimmung, woraus die Autoren schließen, dass auch die dreidimensionalen Strukturen der

Homologen ähnliche Eigenschaften besitzen dürften, allerdings weist der C-Terminus, in dem das NLS der RPS9 lokalisiert ist, bei beiden fast keine sekundären Strukturmodule auf, und seine Aminosäuresequenz ist kaum konserviert, sieht man von den letzten 5 AS ab, deren Bedeutung später erläutert wird.

7.4.2 Vergleich der Tertiärstrukturen

Für die weitere Diskussion wird die Röntgenstrukturanalyse des RPS9 von *Tt* sowie eine Strukturvorhersage (Swiss-Modell) des humanen RPS16 dargestellt:

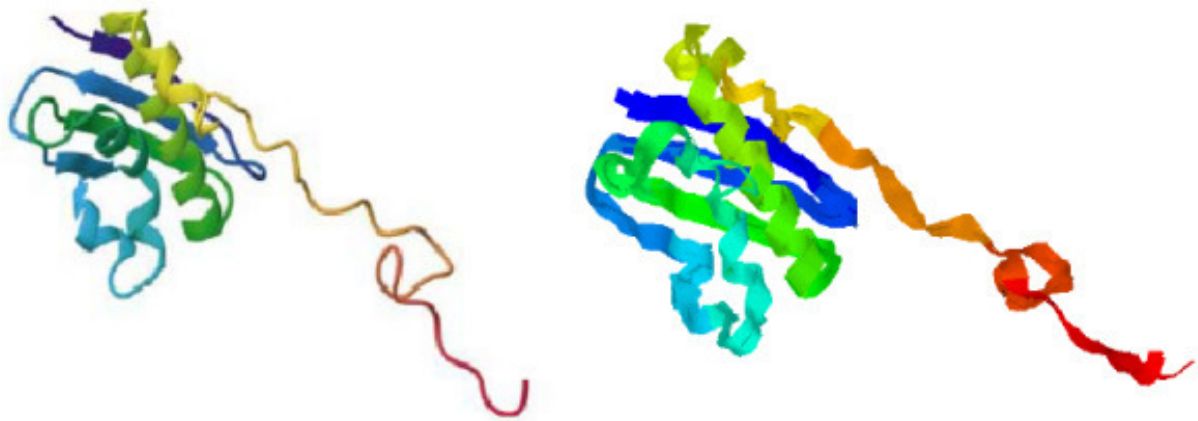


Abbildung 7.5: **Röntgenstrukturanalyse des RPS9 von *T. thermophilus* und Strukturvorhersage des humanen RPS16.**

(links: Brodersen et al., 2002; rechts: Bisotti, 2002)

Abbildung 7.5 zeigt die hohe strukturelle Konservierung der beiden homologen Proteine. Das eukaryontische S16-Protein weist demnach eine höhere Komplexität als das prokaryontische RPS9 auf, allerdings stimmt die Tertiärstruktur der beiden sehr gut überein. Die Unterschiede in der Ladungsverteilung der C-Termini, bedingt durch das gehäufte Auftreten basischer AS im Prokaryonten, scheinen sich nicht auf die Tertiärstruktur auszuwirken.

7.4.3 Funktion und Bedeutung der Mitglieder der S9-Proteinfamilie

Die Lokalisation des RPS9Tt innerhalb der 16S rRNA wurde ausführlich beschrieben (Brodersen et al., 2002).

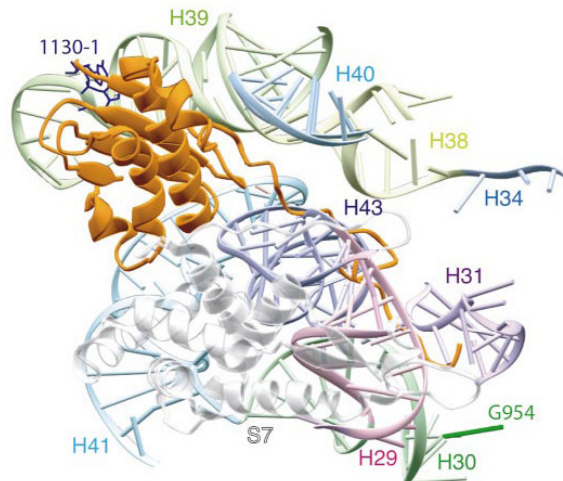


Abbildung 7.6: **Interaktion des RPS9 von *T. thermophilus* mit der 16S rRNA.**

(Brodersen et al., 2002)

Schematische Darstellung eines Ausschnitts der 16S rRNA und der Interaktion mit den RPs S9 und S7. Das RPS9 ist orange gefärbt. H steht für Helix.

Das Protein lokalisiert in der kleinen 30S Untereinheit am oberen Ende, wo während der Translation die Translokation von mRNA und tRNA durch die assoziierten Untereinheiten erfolgt. Über seinen langen C-terminalen Polypeptidschwanz ohne Sekundärstruktur, der in den Kopfbereich der Untereinheit hineinragt und in etwa bei AS 107 beginnt, kann RPS9 an der P-Stelle Kontakt mit der tRNA aufnehmen, aber auch intensive Kontakte mit der 16S rRNA ausbilden. Neben Interaktionen mit den RPs S7, S10 und S13 ist v. a. die Interaktion mit der tRNA von Bedeutung, die 2006 von Selmer et al. durch eine Auflösung der Struktur des kompletten 70S Ribosoms von Tt im Komplex mit mRNA und tRNA bei 2.8 Å geklärt werden konnte.

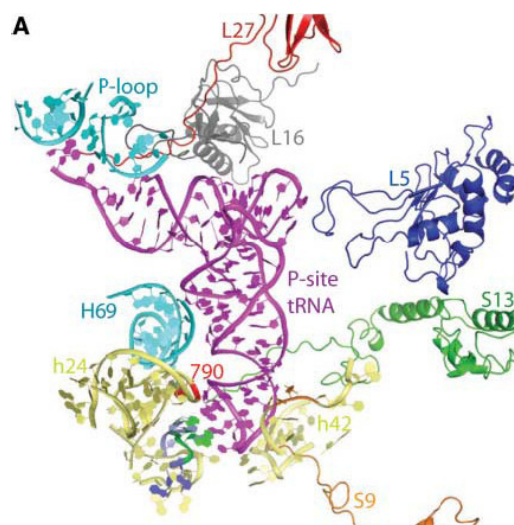


Abbildung 7.7: **Interaktion von tRNA und ribosomalen Proteinen mit der P-Stelle.**

(Selmer et al., 2006)

Die Abbildung 7.7 zeigt einen Ausschnitt des 70S Ribosoms von *T. thermophilus*, in dem die tRNA mit der P-Stelle interagiert. Die tRNA in der P-Stelle, die sowohl auf der großen als auch der kleinen ribosomalen Untereinheit erhebliche Kontakte ausbildet, sorgt zunächst dafür, dass die mRNA während der Codon-Anticodon-Interaktion ihre Position beibehält und so der offene Leserahmen eingehalten wird. Des weiteren erfolgt dort der Peptidyltransfer von der tRNA auf die naszierende Polypeptidkette. Daher ist sie essentiell für die Translation, und die Interaktion des RPS9Tt mit der P-Stelle lässt auf eine wichtige Stabilisierungsfunktion während der Translokation der tRNA im prokaryontischen Ribosom schließen.

Dabei interagiert der C-terminale Polypeptidschwanz über das Lysin an AS-Position 127 mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen an Position 33 und 34 in der P-Stelle der tRNA.

Sehr bemerkenswert ist die Tatsache, dass die letzten 5 Aminosäuren des C-Terminus in der S9-Proteinfamilie hoch konserviert sind, obwohl der C-terminale Bereich ansonsten fast keine konservierten Strukturen besitzt. So ergibt sich für Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryonten die Konsensussequenz Q-X-S-(K/Y)-R, wobei X durch die Aminosäuren Tyrosin, Lysin oder Phenylalanin besetzt sein kann. Auch wenn das beim RPS9Tt mit der tRNA interagierende Lysin durch ein Tyrosin ersetzt werden kann, spricht vieles dafür, dass auch das eukaryontische S16-Protein über seine 5 letzten AS einen Kontakt mit der P-Stelle knüpft.

7.4.4 Intrazelluläre Lokalisation des humanen RPS16

Betrachtet man die Fluoreszenzaufnahmen der S16- β -Gal-Fusionsproteine in Zusammenfassung 6.7.4, so kann man über den Bereich, der für dessen aktiven Kernimport verantwortlich ist, spekulieren.

7.4.4.1 Nukleolare Lokalisation des humanen RPS16

Zunächst aber fällt auf, dass das vollständige mit β -Galaktosidase derivatisierte RPS16 stark im Nukleoplasma der COS-Zellen akkumuliert, aber keine besondere Affinität zu den Nukleoli zeigt. Dagegen belegt Abbildung 6.26 (d) eine sehr starke nukleolare Akkumulation des mit zwei EGFP derivatisierten RPS16. Dies ist evtl. darauf zurückzuführen, dass das Reportermolekül im Falle von β -Gal C-terminal, beim EGFP-Fusionsprotein N-terminal exprimiert wird. Allerdings reicht diese Begründung nicht aus, da das β -Gal-Fusionsprotein des RPS9 ringförmig an den Nukleoli akkumuliert. Daher wird vermutet,

dass beim S16- β -Gal-Fusionsprotein die Nukleoluslokalisationsdomäne aufgrund der tetrameren Struktur maskiert ist.

Interessanter ist die in Abbildung 6.22 gezeigte Tatsache, dass das native RPS16Hs fast überhaupt nicht im Nukleoplasma, sondern v. a. in den Ribosomenfraktionen und im Zytoplasma akkumuliert, wobei letzteres auf den Einbau des Proteins in die 40S Untereinheit zurückzuführen ist. Dadurch kann es im Zytoplasma in der 40S Untereinheit bzw. in den translationsaktiven Polysomen nachgewiesen werden. Die gleichen Ergebnisse wurden für das native RPS6Hs ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Dagegen bewirkt schon die Derivatisierung des Proteins mit einem EGFP eine komplett andere Lokalisation, so dass das Fusionsprotein nur noch im Zellkern und in den Ribosomenfraktionen, aber nicht mehr im Zytoplasma nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Lokalisation der mit einem Reportermolekül derivatisierten Konstrukte und des nativen Konstrukts dramatisch voneinander abweicht, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Fusionsproteine nicht mehr in die Ribosomen eingebaut werden.

Es wurde beschrieben, dass native RPs im Überschuss synthetisiert und direkt in den Zellkern importiert werden, wo sie entweder mit der rRNA an den Nukleoli interagieren und in die ribosomale 40S Untereinheit eingebaut werden oder ubiquitinyliert und im Nukleoplasma durch Proteasomen degradiert werden (Andersen et al., 2005). Die ganz schwache Bande des RPS16Hs im Zellkern (Abbildung 6.22) könnte von Vorläufern der 40S Untereinheit während ihrer Passage durch das Nukleoplasma zum Kernporenkomplex herrühren. Daher kann mit den Fluoreszenzaufnahmen der β -Gal-Fusionspeptide des RPS16Hs keine Aussage hinsichtlich seiner Nukleoluslokalisationsdomäne getroffen, sondern nur eine ungefähre Analyse seines Kernlokalisierungssignals gemacht werden.

7.4.4.2 Hypothese für das NLS des RPS16Hs

Die Abbildungen in Zusammenfassung 6.7.4 zeigen, dass der C-Terminus des RPS16 definitiv kein Kernlokalisierungssignal besitzt, da das Fusionspeptid S16(80-146)Hs keinen Kernimport bewirkt.

```

1   MPSKGPLQSV QVFGRRKKTAT AVAHCKRGNG LIKVNGRPLE
41  MIEPRTLQYK LLEPVLLLKG ERFAGVDIRV RVKGGGHVAQ
81  IYAIRQSISK ALVAYYQKYV DEASKKEIKD ILIQYDRTLL
121 VADPRRCESK KFGGPGARAR YQKSYR

```

Abbildung 7.8: **Aminosäuresequenz des humanen RPS16.**

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; basische AS sind blau markiert; der für das NLS in Frage kommende Bereiche ist fett und unterstrichen hervorgehoben.

Außer dem Konstrukt S16(1-120)Hs, das einen sehr effizienten Import bewirkt, und den Konstrukten S16(1-80)Hs und S16(55-146)Hs, bei denen der Import in den Zellkern zwar eingeschränkt, aber deutlich nachzuweisen ist, lokalisieren alle sechs weiteren Fusionspeptide ausschließlich im Zytoplasma.

Leider gilt dies auch für S16(55-80)Hs, das den überlappenden Bereich der beiden eingeschränkt importierten Konstrukte wiedergibt. Da aber in den Randbereichen um AS 55 bzw. AS 80 kein gehäuftes Auftreten basischer Aminosäuren zu sehen ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass bei S16(55-80)Hs ein klassisches NLS zerstört wurde.

Daher erfolgt der Import des RPS16Hs vermutlich nicht über die Interaktion eines klassischen NLS, sondern entweder über Dimerisierung mit einem anderen Importsubstrat oder über ein komplexes NLS.

Der AS-Bereich 69 RVRVK 73 kommt einem klassischen Importsignal am nächsten (Chelsky et al., 1989) und ist daher hervorgehoben. Möglicherweise ist er Bestandteil eines komplexen NLS, kann aber für sich allein keinen Kernimport vermitteln. Wäre er Bestandteil eines klassischen bipartiten NLS, käme der kompensatorische Effekt der Fragmente S16(1-80)Hs bzw. S16(55-146)Hs sowohl durch C-terminale als auch N-terminale Aminosäuren zustande, was schon im Zusammenhang mit dem RPS18Tt erläutert wurde.

Es lässt sich festhalten, dass das NLS von RPS16Hs nicht näher charakterisiert werden konnte und davon ausgegangen wird, dass es kein klassisches NLS besitzt. Wichtig für die weitere Diskussion ist aber die Feststellung, dass der C-Terminus von RPS16Hs definitiv kein NLS besitzt und in der Aminosäuresequenz von den C-Termini der RPS9 abweicht.

7.4.5 Kernlokalisierungssignale der RPS9

Da die C-Termini der ribosomalen Proteine von Ec und Tt den aktiven Kernimport und die Nukleoliakkumulation vermitteln, werden für beide Proteine nur die Aminosäurenbereiche (90-130) bzw. (90-128) dargestellt.

90 DESLRSELRK AGFVTRDARQ VERKKVGLRKARRRPQFSKR 130

Abbildung 7.9: Aminosäuresequenz des RPS9(90-130)Ec.

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; basische AS sind mit Ausnahme der AS Lysin (K) an Position 120 blau markiert; AS 120 ist rot gefärbt, da Lysin (K) beim Konstrukt mit Mutation in ein A (Alanin) umgewandelt wurde. Die für das NLS bzw. NuLD essentiellen Bereiche sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

90 DYRAKLKPLG FLTRDARVVE RKKYGKHKAR RAPQYSKR 128

Abbildung 7.10: Aminosäuresequenz des RPS9(90-128)Tt.

Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt; basische AS sind blau markiert. Die für das NLS bzw. NuLD essentiellen Bereiche sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Die Ermittlung der Minimalsequenz erfolgte nur für das RPS9 von *E. coli*. Dabei konnte in Abbildung 6.17 gezeigt werden, dass der Bereich S9(117-125)Ec einen sehr eingeschränkten Kernimport vermitteln kann, allerdings erfolgt die Interaktion mit dem entsprechenden Transportfaktoren nicht zwingend, so dass viele der transient transfizierten COS-Zellen keine Akkumulation der Fusionspeptide im Nukleoplasma zeigen.

Deutlich effizienter verläuft der Import des Konstrukts S9(113-125)Ec, was auf die drei zusätzlichen basischen AS (113-115) zurückzuführen ist, weshalb auch das C-terminale Konstrukt S9(109-130)Ec eine nukleoplasmatische Lokalisation aufweist. Dass bei diesem das Zytoplasma keinerlei Färbung zeigt, kann auf die beiden letzten Aminosäuren zurückgeführt werden, was auch die Unterschiede in der Lokalisation der Konstrukte S9(117-125)Ec bzw. S9(116-130)Ec erklärt. Durch den kompensatorischen Effekt der beiden basischen AS (129 und 130) unterliegt der komplette C-Terminus einem deutlich effizienteren Import als das verkürzte Fragment.

Analog verhält es sich mit der Lokalisation des RPS9Tt. Der einzige Unterschied zum RPS9Ec besteht darin, dass die Minimalsequenz 116 KHKARR 121 eine andere Zusam-

mensetzung basischer Aminosäuren aufweist. Dennoch konnte für das Konstrukt S9(114-128)Tt eindeutig ein aktiver Kernimport nachgewiesen werden und auch die flankierenden AS, v. a. die helixunterbrechenden AS Glycin (G) und Prolin (P) an AS-Position 115 bzw. 123 befinden sich in guter Übereinstimmung mit der AS-Sequenz des RPS9Ec.

Es lässt sich daher festhalten, dass beide prokaryontischen S9-Proteine ein NLS besitzen und ihre Strukturen sehr viele Gemeinsamkeiten zeigen. Die Tatsache eines kompensatorischen Effekts von basischen Aminosäuren in der Nähe der Minimalsequenz wurde bereits ausführlich für das RPS18Tt diskutiert. Interessanterweise kann diese Kompensation durch basische Aminosäuren bewirkt werden, die vor oder hinter der Minimalsequenz lokalisiert sind. Dies deutet darauf hin, dass die Spezifität der Interaktion von Transportrezeptor und NLS-Substrat nicht sehr ausgeprägt zu sein scheint, was auch erklären würde, warum gerade der C-terminale Bereich, in welchem die prokaryontischen NLS liegen, fast keine Gemeinsamkeiten mit den Eukaryonten zeigt.

7.4.6 Nukleoluslokalisationsdomänen der RPS9

In der Einleitung wurde bereits dargestellt, dass die Nukleoluslokalisationsdomänen (NuLD) nicht so exakt charakterisiert sind wie die NLS. Auch sie sind in erster Linie durch das gehäufte Auftreten basischer AS gekennzeichnet. Beim RPS18 wurde bereits gezeigt, dass auch NuLD eine Art Minimalsequenz besitzen, die eine sehr eingeschränkte Interaktion mit der rRNA der Nukleoli zulässt, für eine effektive Akkumulation allerdings längere AS-Bereiche notwendig sind.

Ähnliche Beobachtungen konnten für das RPS9Ec gemacht werden, die der Zusammenfassung 6.7.2 entnommen werden können. Während das Konstrukt S9(113-125)Ec bei einigen COS-Zellen eine schwache Nukleoliakkumulation bewirken konnte, ist diese bei S9(109-130)Ec sehr stark ausgeprägt.

Zieht man die Aufnahmen der mit drei EGFP derivatisierten S9Ec-Konstrukte hinzu, zeigt sich, dass die S9(1-116)Ec bzw. S9(93-116)Ec keine Nukleoliakkumulation katalysieren. Somit wird für eine effiziente Nukleoliakkumulation der Bereich AS (109-130) angegeben. Bedenkt man jedoch, dass die trimeren EGFP-Konstrukte S9(1-125)Ec bzw. S9(93-125)Ec auch beide an den Nukleoli akkumulieren, so sind die AS (129 und 130) nicht als essentieller Bestandteil der NuLD anzusehen. Da aber das Konstrukt S9(109-125)Ec nur eine sehr schwache Nukleoliakkumulation zeigt, kommt der schon beim NLS diskutierte kompensatorische Effekt der flankierenden AS, z. B. AS (99 und 100) bzw. AS (129 und 130), zum Tragen.

Gleiches wird auch für das RPS9Tt angenommen, dessen β -Gal-Fusionspeptid S9(109-128)Tt eine schwache Nukleoliakkumulation aufweist.

Insgesamt gesehen konnten die Bereich der NLS bzw. NuLD der RPS9 von Ec bzw. Tt charakterisiert werden, wobei sich bestätigte, dass beide eine Minimalsequenz besitzen, die eine sehr eingeschränkte Interaktion zulässt und durch basische AS in ihrem flankierenden Bereich unterstützt werden kann. Dabei scheint dieser kompensatorische Effekt relativ unspezifisch, da er sowohl von AS vor der Minimalsequenz als auch von AS nach ihr bewirkt werden kann. Die NuLD besteht insgesamt aus mehr Aminosäuren, was sich aus ihrer komplexen Interaktion mit der rRNA erklärt, im Gegensatz zur NLS, die nur mit den Transportfaktoren interagiert.

7.4.7 Interaktion des prokaryontischen RPS9 mit eukaryontischen Ribosomen

Anhand der Abbildungen 6.18 und 6.19 wurde bereits dargelegt, dass die RPS9 von Ec und Tt nach transienter Expression ohne Reportermolekül in allen zellularen Fraktionen von HeLa-Zellen nachgewiesen werden können, so auch im Zellkern und in der Ribosomenfraktion. Dabei fällt aber die sehr unterschiedliche Verteilung in der Lokalisation auf. Während das RPS9Tt v. a. im Zytoplasma und in der Ribosomenfraktion zu finden ist, lokalisierte das RPS9Ec in erster Linie im Zellkern und nur schwach im Zytoplasma und der Ribosomenfraktion.

Zurückgeführt wird dies auf die unterschiedliche Zusammensetzung ihrer NLS-Minimalsequenzen. Die Zusammensetzung der Minimalsequenz des RPS9Ec 119 RKARRR 124 ist der von Chelsky et al. 1989 beschriebenen klassischen Minimalsequenz K-(K/R)-X-(K/R) ähnlicher als die des RPS9Tt 116 KHKARR 121. Daher wird vermutet, dass die durch das NLS vermittelte Bindung von Transportfaktoren beim RPS9Ec deutlich stärker ausgeprägt ist, und somit ein effizienterer Kernimport erfolgt.

Genau anders herum verhält es sich bei den NuLD. Die wesentlich stärker ausgeprägte Lokalisation in der Ribosomenfraktion belegt eine stärkere Interaktion der NuLD des RPS9Tt mit der rRNA der Ribosomen.

Nachdem die Interaktion mit den Ribosomen bestätigt wurde, stellt sich zwangsläufig die Frage, ob die Proteine auch in den translationsaktiven Polysomen bzw. in den verschiedenen ribosomalen Partikeln nachgewiesen werden können. Die Analyse wurde nur mit dem RPS9Tt durchgeführt, da dieses eine deutlich stärkere Affinität zu den Ribosomen aufwies als das RPS9Ec.

Abbildung 6.20 zeigt zunächst, dass sich das Protein in allen ribosomalen Partikeln befindet. Als Bestandteil der kleinen bakteriellen 30S Untereinheit verwundert die Interaktion mit der 40S Untereinheit nicht, auch die Assoziation an 80S Ribosomen und Polysomen lässt sich damit erklären, allerdings kann ein Teil der RPS9Tt auch in der großen 60S Untereinheit nachgewiesen werden.

Da das gleiche Polysomenprofil für das native humane RPS6 fast keine Interaktion mit der 60S Untereinheit belegt und auch bereits die Daten der Verteilung des nativen RPS16 eine sehr differente Verteilung zeigten, wurde eine Hochsalzbehandlung des Ribosomenextrakts durchgeführt, um zu untersuchen, ob das RPS9Tt nur mit den ribosomalen Partikeln assoziiert ist oder tatsächlich ein funktioneller Einbau ins eukaryontische Ribosom stattfindet (Abbildung 6.21).

Bereits eine Behandlung mit 300 mM sorgt dafür, dass beinahe die gesamten RPS9Tt von den Ribosomen abdissoziieren und sich ungebunden im Zentrifugationsüberstand befinden. Daher kann man festhalten, dass die RPS9 aufgrund ihrer basischen Aminosäurebereiche wohl an der Peripherie ribosomaler Partikel assoziieren können, diese Bindung aber nur schwach ausgeprägt ist und somit kein funktioneller Einbau ins eukaryontische Ribosom erfolgt.

7.5 Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte

Die Lokalisation der Domänen austausch-Konstrukte in Abbildung 6.26 zeigt, dass die Konstrukte 2xEGFP S9/S16 bzw. S9/S16 im Zellkern von HeLa-Zellen akkumulieren, aber auch eine zytoplasmatische Fluoreszenz aufweisen. Da die Lokalisation des dimeren EGFP-Proteins die gleiche Verteilung aufweist (Abbildung 6.3) und definitiv auf passiver Diffusion beruht, wird dies auch für 2xEGFP S9/S16 bzw. S9/S16 angenommen.

Belegen lässt sich das anhand der NLS der Proteine RPS9Ec und RPS16Hs. S9/S16 enthält den N-Terminus des prokaryontischen Proteins S9(1-92)Ec und den C-Terminus des humanen S16-Proteins S16(103-146)Hs. Für beide konnte eindeutig gezeigt werden, dass sie kein NLS besitzen. Deshalb kann kein aktiver Importmechanismus zugrunde liegen.

Im Gegensatz zu den Fluoreszenzaufnahmen, bei denen 2xEGFP S9/S16 bzw. S9/S16 nicht an den Nukleoli akkumulieren, kann S9/S16 immunologisch in der Ribosomenfraktion von zellulären Fraktionen nachgewiesen werden, wenn auch in sehr schwacher Ausprägung. Dies wird durch unspezifische Interaktionen der nach wie vor im Domänen austausch-Konstrukt vorhandenen basischen AS-Bereiche mit der rRNA begründet.

Zudem muss berücksichtigt werden, dass für das RPS16Hs keine Aussage hinsichtlich seiner NuLD getroffen werden konnte, und so bei S9/S16 vielleicht eine Minimalsequenz erhalten geblieben ist, die eine Assoziation an ribosomale Partikel bewirkt, aber keine Interaktion ermöglicht, die die passiv diffundierten Proteine effektiv zu den Nukleoli dirigiert.

Anders verhalten sich die Konstrukte 2xEGFP S16/S9 bzw. S16/S9. Wie erwartet, akkumulieren sie im Zellkern und in bzw. an den Nukleoli, da für den C-terminalen Teil der Konstrukte, bestehend aus S9(93-130)Ec, gezeigt werden konnte, dass er sowohl ein NLS als auch eine NuLD besitzt.

Die Lokalisation in den zellularen Fraktionen (Abbildung 6.27 und 6.28) ähnelt sehr der Verteilung des RPS9Ec. Beide sind v. a. im Nukleoplasma zu finden, nur in schwacher Ausprägung im Zytoplasma und in der Ribosomenfraktion.

Verglichen mit dem S9/S16 fällt die Ribosomeninteraktion des S16/S9 deutlich stärker aus. Berücksichtigt man wiederum die Lokalisation der nativen RPS6 bzw. RPS16, die eine ganz andere Verteilung zeigen und fast überhaupt nicht im Nukleoplasma akkumulieren, kann festgehalten werden, dass das S16/S9 aktiv und effektiv ins Nukleoplasma importiert wird, über eine NuLD zu den Nukleoli dirigiert wird und dort akkumuliert, aber nicht funktionell in die Ribosomen eingebaut wird. Daher muss konstatiert werden, dass durch den Austausch der Domänen kein funktioneller Einbau in die Ribosomen bewirkt werden konnte.

7.6 Evolutionäre Aspekte

Der hohe Grad der Konservierung innerhalb der S9-Proteinfamilie wurde bereits dargestellt. Dies spricht für eine wichtige Funktion während der Ribosomenbiogenese bzw. der Translation, was durch die nachgewiesene Interaktion des RPS9Tt mit der tRNA an der P-Stelle dokumentiert wird (Selmer et al., 2006).

Weitere Argumente wurden bereits in der Einleitung dargelegt. So konnte ermittelt werden, dass das RPS16Hs eines von vier RPs repräsentiert, die am stärksten an die 18S rRNA in der kleinen 40S Untereinheit von humanen Ribosomen gebunden sind (Malygin et al., 2000). Des weiteren wurde gezeigt, dass das RPS16 in der Hefe essentiell für die Ribosomenbiogenese ist. Die Inhibierung seiner Expression sorgte dafür, dass die 20S rRNA der Hefe nicht mehr nachgewiesen werden konnte, also die Ribosomenbiogenese unterbrochen wurde (Ferreira-Cerca et al., 2005).

Da die letzten 5 Aminosäuren der C-Termini bei Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryonten hoch konserviert sind und dort zumindest beim RPS9Tt die Interaktion mit der tRNA erfolgt, kann vermutet werden, dass die S9-Proteinfamilie bei allen Organismen eine wichtige Stabilisierungsfunktion innerhalb der Ribosomen ausübt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die eukaryontische Kernimportmaschinerie eine relativ unspezifische Interaktion aufweist und im Zuge der Entstehung des Zellkerns entwickelt wurde, wobei auf bereits im Ursprungsorganismus/den Ursprungsorganismen vorhandene Sequenzmotive zurückgegriffen wurde, und diese Information im Laufe der Evolution bei den Prokaryonten konserviert geblieben ist. Die Unterschiede innerhalb des eukaryontischen RPS16 und der RPS9 sind auf die Koevolution der Proteine mit den entsprechenden rRNAs in den verschiedenen Organismen zurückzuführen.

8. Zusammenfassung

Ribosomen sind als einzige Zellorganelle sowohl in Archaeobakterien und Bakterien als auch in Eukaryonten vorhanden, wo sie als Ribozyme die Bildung der Peptidbindung katalysieren. Man geht davon aus, dass sie nur einmal entstanden sind und im Laufe der Evolution durch Modifikationen ihre heutige Komplexität in Eukaryonten entwickelten. Die drei verschiedenen Organismen besitzen jedoch 34 homologe ribosomale Proteinfamilien.

Mit der Entstehung des Zellkerns kam es bei den Eukaryonten zu einer räumlichen Trennung von Transkription und Translation, was zum einen eine deutlich effizientere Kontrolle der Genexpression ermöglichte, zum anderen aber zu einer komplexeren Ribosomenbiogenese führte, da diese in den Nukleoli gebildet werden. Die ribosomalen Proteine (RPs) müssen bei Eukaryonten nach ihrer Synthese im Zytoplasma erst über ein aktives Kernimportsystem durch den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert werden, um ihre Funktion im Zuge der Ribosomenbiogenese ausüben zu können.

Da Prokaryonten nur ein Zellkompartiment besitzen, in dem Transkription, Translation und Ribosomenbiogenese stattfinden, stellt sich die Frage, ob nach der Entstehung des Zellkerns neue Kernlokalisationssignale und entsprechende Transportfaktoren etabliert werden mussten, oder ob bestehende Signale für den Kerntransport umfunktioniert wurden. Diese fundamentale Frage sollte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse prokaryontischer RPs untersucht werden.

Die RPs der Prokaryonten *E. coli* und *T. thermophilus* wurden nach Derivatisierung mit geeigneten Reportermolekülen in eukaryontischen Zelllinien exprimiert und die Lokalisation ihrer Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Nachdem ein aktiver Kernimport nachgewiesen werden konnte, wurden die dafür verantwortlichen Kernlokalisationssignale charakterisiert und Strukturvergleiche bezüglich des homologen humanen Proteins durchgeführt.

Da die RPs auch an den Nukleoli akkumulierten, was auf ihrer Interaktion mit der ribosomalen RNA beruht, wurde analysiert, ob sie mit den Ribosomen eukaryontischer Zellen interagieren und sogar funktionell aktiv sind. Dafür wurden Zellfraktionen eukaryontischer Zellen gewonnen, in denen die RPs ohne Reportermolekül exprimiert worden waren. Die immunologische Auswertung zeigte, dass die RPs zwar an den Ribosomen assoziierten, aber nicht funktionell integriert wurden.

Durch Austausch von Domänen zwischen dem prokaryontischen und dem eukaryontischen Protein wurde versucht, einen Einbau der modifizierten RPs in die Ribosomen zu errei-

chen. Obwohl dieser Einbau nicht gelang, bestätigte aber die Lokalisation der Domänen-austausch-Konstrukte die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche.

Für die Verifizierung des aktiven Imports wurde die Lokalisation weiterer ribosomaler Proteine mit Reportermolekül fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei wurden prokaryontische RPs verwendet, die keine Homologen bei den Eukaryonten besitzen. Überraschenderweise wurde das ausgewählte RPS18 aktiv in den Zellkern importiert und akkumulierte im Nukleolus. Die Analyse zeigte, dass RPS18 ein klassisches bipartites Kernlokalisationssignal besitzt.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, warum prokaryontische RPs, ohne einen Zellkern zu besitzen, die Information für die Interaktion mit der aktiven Kernimportmaschinerie der Eukaryonten aufweisen. Meine Untersuchungen führen zu folgenden Hypothesen:

1. Bei der Etablierung des Kernimportsystems wurde auf die basischen Peptidsequenzen der prokaryontischen RPs zurückgegriffen.
2. Diese Information blieb im Laufe der Evolution bei den Prokaryonten konserviert, da die basischen Sequenzen für die Interaktion mit der rRNA essentiell waren.

9. Abstract

Ribosomes are the only organelle, which can be found in Archaeobacteria, Bacteria and Eukarya, where they act as ribozymes to catalyse peptide bond formation. It is thought that they were invented just once and developed their complexity in eukaryotes by modifications during evolution. The three different organisms share 34 homologous ribosomal protein (RP) families.

Since Archaeobacteria and Bacteria are prokaryotes lacking a nucleus, transcription and translation as well as ribosome assembly has to be accomplished in the single cytoplasmic compartment. With the advent of the cell nucleus transcription and translation became compartmentalized and the task to assemble 40S and 60S subunits was assigned to the nucleolus. Although the separation of RNA synthesis in the nucleus and protein synthesis in the cytoplasm resulted in a better cellular regulation, this advantage was achieved at the expense of acquiring a complex transport machinery shuttling macromolecules back and forth between both compartments through the nuclear pore complex.

After synthesis in the cytoplasm eukaryotic ribosomal proteins have to be imported into the nucleus to fulfil their task during ribosome biogenesis. Therefore they contain so called nuclear localisation signals (NLS) to interact with transport factors of the transport machinery. Basic amino acid clusters can be found very often in such NLS.

The evolutionary conservation of the RP families prompted us to question whether RPs of prokaryotes, namely of *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*, are recognized by the nuclear import machinery of eukaryotic cells and thereby transported into the nucleoplasm accumulating eventually in the nucleolus.

Therefore we produced fusion proteins tagged with either EGFP or beta-galactosidase that were intracellular localized by their fluorescence or by indirect immune staining. Tagged S9 of *E. coli* and *T. thermophilus* were imported into the nucleus and accumulated in the nucleolus. Expressed S9 without tag migrated into the nucleoplasm, appeared in a ring like fashion around the nucleolus and unspecifically associated with ribosomal particles in a high salt sensitive fashion. By tagging specific S9 fragments or employing defined synthetic oligonucleotides a NLS of S9 from *E. coli* was delineated.

In another attempt we tried to incorporate the S9 of *E. coli* into translationally active ribosomes by exchanging its N-terminal domain with the N-terminal domain of the human S16 protein. The integration into ribosomes was not achieved, but the results of the former experiments were corroborated.

Another NLS was characterized for the RP S18 of *T. thermophilus*. A homologous protein cannot be found in eukaryotes. Nevertheless RPS18Tt was imported into the eukaryotic nucleus and accumulated strongly at the nucleoli.

This results raise the question: Why do prokaryotic ribosomal proteins contain nuclear localisation signals, which can interact with the eukaryotic transport machinery, even though they lack a nucleus?

Two reasons can be envisaged:

1. The basic peptide sequences of prokaryotes which are essential for the subunit structure were used to establish the eukaryotic transport machinery.
2. This information was conserved during evolution in the prokaryotic genome, because the basic residues are essential for the interaction with rRNA.

10. Literaturverzeichnis

- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. and Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 433(7021), 77-83
- Annilo, T., Karis, A., Hoth, S., Rikk, T., Kruppa, J. and Metspalu, A. (1998) Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249(3), 759-766
- Antoine, M., Reimers, K., Wirz, W., Gressner, A. M., Muller, R. and Kiefer, P. (2005) Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335(1), 146-153
- Arts, G. J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. and Mattaj, I. W. (1998) The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* 17(24), 7430-7441
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289(5481), 905-920
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W. and Medalia, O. (2004) Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*. 306(5700), 1387-1390
- Bisotti, M.-A. (2002) Expression von fluoreszenzmarkierten ribosomalen Proteinen und deren Integration in translationsaktive Ribosomen. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Brodersen, D. E., Clemons Jr., W. M., Carter, A. P., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. (2002) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J. Mol. Biol.* 316(3), 725-768
- Brown, J. D. (2001) Ribosome biogenesis: stripping for AAAAction? *Curr. Biol.* 11(17), R710-712
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263(5148), 802-805
- Chelsky, D., Ralph, R. and Jonak, G. (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell Biol.* 9(6), 2487-2492
- Conti, E., Muller, C. W. and Stewart, M. (2006) Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16(2), 237-244
- Darge, W. (2004) The Ribosome. Protein Manufacturer. Ribosomen Verlag, Krefeld. 1. Auflage

- Denning, D. P., Patel, S. S., Uversky, V., Fink, A. L. and Rexach, M. (2003) Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 100(5), 2450-2455
- Dingwall, C., Robbins, J. and Dilworth, S. M. (1989) Characterisation of the nuclear location sequence of *Xenopus* nucleoplasmin. *J. Cell Sci. Suppl.* 11, 243-248
- Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1991) Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16(12), 478-481
- Fahrenkrog, B. (2006) The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84(3-4), 279-286
- Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H. and Milkereit, P. (2005) Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell.* 20(2), 263-275
- Fried, H. and Kutay, U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol. Life Sci.* 60(8), 1659-1688
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature.* 390(6657), 308-311
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J. and Hall, M. N. (1991) Nuclear protein localization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071(1), 83-101
- Gerace, L. and Burke, B. (1988) Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 335-374
- Gonda, K., Wudel, J., Nelson, D., Katoku-Kikyo, N., Reed, P., Tamada, H. and Kikyo, N. (2006) Requirement of the protein B23 for nucleolar disassembly induced by the FRGY2a family proteins. *J. Biol. Chem.* 281(12), 8153-8160
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervy, D., Gavin, A. C. and Hurt, E. (2002) 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell.* 10(1), 105-115
- Hall, M. N., Craik, C. and Hiraoka, Y. (1990) Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 87(18), 6954-6958
- Hamacher, K., Trylska, J. and McCammon, J. A. (2006) Dependency map of proteins in the small ribosomal subunit. *PLoS Comput. Biol.* 2(2), e10
- Handwerger, K. E., Cordero, J. A. and Gall, J. G. (2004) Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Mol. Biol. Cell.* 16(1), 202-211

- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S. and Nomura, M. (1974) Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J. Biol. Chem.* 249(10), 3103-3111
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. and Milligan, R. A. (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell.* 69(7), 1133-1141
- Hodel, A. E., Harreman, M. T., Pulliam, K. F., Harben, M. E., Holmes, J. S., Hodel, M. R., Berland, K. M. and Corbett, A. H. (2006) Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281(33), 23545-23556
- Hong, J. S. and Engler, J. A. (1991) The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal. *Virology.* 185(2), 758-767
- Huang, S., Rothblum, L. I. and Chen, D. (2006) Ribosomal chromatin organization. *Biochem. Cell Biol.* 84(4), 444-449
- Javaux, E. J., Knoll, A. H. and Walter, M. R. (2001) Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature.* 412(6842), 66-69
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* 39(3 Pt 2), 499-509
- Keminer, O. and Peters, R. (1999) Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* 77(1), 217-228
- Knippers, R. (2001) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 8. Auflage
- Kozak, M. (1984) Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature.* 308(5956), 241-246
- Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19(12), 7897-7912
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. and Gorlich, D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.* 90(6), 1061-1071
- Kutay, U., Hartmann, E., Treichel, N., Calado, A., Carmo-Fonseca, M., Prehn, S., Kraft, R., Gorlich, D. and Bischoff, F. R. (2000) Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 275(51), 40163-40168
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259), 680-685
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. and Corbett, A. H. (2006) Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]

- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D. and Poch, O. (2002) Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.* 30(24), 5382-5390
- Liang, W. Q. and Fournier, M. J. (1997) Synthesis of functional eukaryotic ribosomal RNAs in trans: development of a novel in vivo rDNA system for dissecting ribosome biogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 94(7), 2864-2868
- Lim, R. Y., Aebi, U. and Stoffler, D. (2006) From the trap to the basket: getting to the bottom of the nuclear pore complex. *Chromosoma.* 115(1), 15-26
- Lim, R. Y. and Fahrenkrog, B. (2006) The nuclear pore complex up close. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(3), 342-347
- Lipsius, E., Walter, K., Leicher, T., Phlippen, W., Bisotti, M.-A. and Kruppa, J. (2005) Evolutionary conservation of nuclear and nucleolar targeting sequences in yeast ribosomal protein S6A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(4), 1353-1360
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L. and Darnell, J. (2003) *Molecular cell biology.* W. H. Freeman and Company, New York. 5. Auflage
- Lopez-Garcia, P. and Moreira, D. (2006) Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus. *Bioessays.* 28(5), 525-533
- Madrid, A. S. and Weis, K. (2006) Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma.* 115(2), 98-109
- Malygin, A. A., Shaulo, D. D. and Karpova, G. G. (2000) Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt. *Biochim. Biophys. Acta.* 1494(3), 213-216
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. and Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J. Cell Biol.* 165(6), 823-833
- Martin, W. (2005) Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(6), 630-637
- Martin, W. and Russell, M. J. (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358(1429), 59-83
- Mizushima, S. and Nomura, M. (1970) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature.* 226(5252), 1214-1218
- Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2003) The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 813-850

- Moy, T. I. and Silver, P. A. (2002) Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J. Cell Sci.* 115(Pt 14), 2985-2995
- Naim, B., Brumfeld, V., Kapon, R., Kiss, V., Nevo, R. and Reich, Z. (2007) Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *J. Biol. Chem.* 282(6), 3881-3888
- Nathans, D. (1964) Inhibition of protein synthesis by puromycin. *Fed. Proc.* 23, 984-989
- Nigg, E. A. (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature.* 386(6627), 779-787
- Nisbet, E. G. and Sleep, N. H. (2001) The habitat and nature of early life. *Nature.* 409(6823), 1083-1091
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J.* 21(20), 5539-5547
- Nudleman, E., Wall, D. and Kaiser, D. (2005) Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science.* 309(5731), 125-127
- Ogle, J. M. and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 129-177
- Pante, N. and Aeby, U. (1996) Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31(2), 153-199
- Pante, N. and Kann, M. (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell.* 13(2), 425-434
- Parakhnevitch, N. M., Malygin, A. A. and Karpova, G. G. (2005) Recombinant human ribosomal protein S16: expression, purification, refolding, and structural stability. *Biochemistry (Mosc).* 70(7), 777-781
- Pederson, T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 26(17), 3871-3876
- Peters, R. (2005) Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic.* 6(5), 421-427
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell.* 86(6), 985-994
- Poon, I. K. and Jans, D. A. (2005) Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic.* 6(3), 173-186
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F. and Cormier, M. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111(2), 229-233

- Raska, I., Shaw, P. J. and Cmarko, D. (2006) Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(3), 325-334
- Ribbeck, K. and Gorlich, D. (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 20(6), 1320-1330
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. and Gorlich, D. (1999) The translocation of transport-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr. Biol.* 9(1), 47-50
- Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1987) The effect of protein context on nuclear location signal function. *Cell.* 50(3), 465-475
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Stutz, F. (2004) Nuclear export of RNA. *Biol. Cell.* 96(8), 639-655
- Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R. H., Hirschmann, N., Bevec, D. and Hauber, J. (2000) Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J. Biol. Chem.* 275(16), 12061-12068
- Rout, M. P. and Aitchison, J. D. (2000) Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem.* 36, 75-88
- Rout, M., Blobel, G. and Aitchison, J. (1997) A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell.* 89(5), 715-725
- Sakakida, Y., Miyamoto, Y., Nagoshi, E., Akashi, M., Nakamura, T. J., Mamine, T., Kasahara, M., Minami, Y., Yoneda, Y. and Takumi, T. (2005) Importin alpha/beta mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 280(14), 13272-13278
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning – A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2. Auflage
- Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M. V. and Wintermeyer, W. (2003) An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol. Cell.* 11(6), 1517-1523
- Scheer, U. and Hock, R. (1999) Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11(3), 385-390
- Scherer, W., Syverton, J. and Gey, G. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97(5), 695-710
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell.* 102(5), 615-623

- Schmidt, C., Lipsius, E. and Kruppa, J. (1995) Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6. *Mol. Biol. Cell.* 6(12), 1875-1885
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Cate, J. H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310(5749), 827-834
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313(5795), 1935-1942
- Shaw, P. J. and Jordan, E. G. (1995) The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121
- Shurvinton, C. E., Hodges, L. and Ream, W. (1992) A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 89(24), 11837-11841
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P. and Frank, J. (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* 23(5), 1008-1019
- Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B. and Aebi, U. (1999) Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 287(4), 741-752
- Thomas, F. and Kutay, U. (2003) Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J. Cell Sci.* 116(Pt 12), 2409-2419
- Tsai, R. Y. and McKay, R. D. (2005) A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J. Cell Biol.* 168(2), 179-184
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13(5), 255-263
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33, 261-311
- Walter, K. (2000) Signale für den Kernimport und die Nucleolus-Akkumulation im ribosomalen Protein S10 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Walther, T. C., Pickersgill, H. S., Cordes, V. C., Goldberg, M. W., Allen, T. D., Mattaj, I. W. and Fornerod, M. (2002) The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J. Cell Biol.* 158(1), 63-77
- Wang, H. and Clapham, D. E. (1999) Conformational Changes of the in Situ Nuclear Pore Complex. *Biophysical Journal.* 77(1), 241-247

-
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*. 112(4), 441-451
- Wettstein, F. O., Noll, H. and Penman, S. (1964) Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*. 87, 525-528
- Williamson, J. R. (2005) Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Q. Rev. Biophys.* 38(4), 397-403
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr., W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonnrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407(6802), 327-339
- Wool, I. G., Chan, Y. L. and Gluck, A. (1995) Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell Biol.* 73(11-12), 933-947
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. and Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292(5518), 883-896
- Zavialov, A. V., Hauryliuk, V. V. and Ehrenberg, M. (2005) Guanine-nucleotide exchange on ribosome-bound elongation factor G initiates the translocation of tRNAs. *J. Biol.* 4(2), 9

11. Anhang

11.1 Verwendete PCR-Programme

11.1.1 MP-S9gDNA

Alle Klonierungen in dieser Arbeit wurden mit diesem PCR-Programm durchgeführt und bei Bedarf wurden die Temperaturen leicht modifiziert.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	5 min.	
2	96°C	1 min.	
3	44°C	1 min.	
4	72°C	40 s	→ Schritt 2 / 5 Zyklen
5	96°C	1 min.	
6	46°C	1 min.	->-> 2°C Inkrement
7	72°C	40 s	→ Schritt 5 / 5 Zyklen
8	96°C	1 min.	
9	60°C	1 min.	
10	72°C	40 s	→ Schritt 8 / 20 Zyklen
11	4°C	∞	

11.1.2 MP-Seq

Alle Sequenzier-PCRs in dieser Arbeit wurden mit diesem Programm durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	5 min.	
2	96°C	20 s	
3	50°C	5 s	
4	60°C	4 min.	→ Schritt 2 / 25 Zyklen
5	4°C	∞	

11.2 Verwendete Primer und Oligonukleotide

11.2.1 Verwendete Primer für die Klonierung der EGFP-Fusionsproteine

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
EGFP-S9Ec	MP-S9 Ec-GFP-Sense	5' CCCGGGAAGCTTTTATGGCTGAAAATCAATACTA 3'
	S9 Ec-GFP-AS2	5' GGGGAATTCCTTAACGTTTGGAGAACTGCGGAC 3'
EGFP-S9Tt	MP-S9GFP-Sense	5' CCCGGGAAGCTTTTATGGAGCAGTATTACGGCAC 3'
	MP-S9GFP-AntiS	5' CCCGGGGAATTCCTTAACGCTTGGAGTACTGGG 3'
EGFP-EGFP-S9Ec	3xEGFPFor1	5' GGGAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
	3xEGFPRev3	5' GGGAAAGCTTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC 3'
EGFP-EGFP-S9Tt	3xEGFPFor1	s. o.
	3xEGFPRev3	s. o.
S9Ec-EGFP	MP-S9 Ec-GFP-Sense	s. o.
	S9 EcGFP-N1-AS	5' ACCAGGGAATTCGACGTTTGGAGAACTGCGGACG 3'
S9Tt-EGFP	MP-S9GFP-Sense	s. o.
	S9 TtGFP-N1-AS	5' ACCAGGGAATTCGACGCTTGGAGTACTGGGGCG 3'
EGFP-S9Ec-EGFP	-	wurde nicht konstruiert
	-	
EGFP-S9Tt-EGFP	S9GFPx2-Sense	5' TACAAGTCCGGACTCAGATCTATG 3'
	S9 TtGFP-N1-AS	s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec-EGFP	-	Klonierung per Restriktion
EGFP-EGFP-S9Tt-EGFP	-	Klonierung per Restriktion
Sequenzier-primer	GFP 1	5' CGAGAAGCGGATCACATGG 3'
	GFP 2	5' CAAGTTAACAACAACAATTGCATTC 3'
	GFP 3	5' CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGC 3'
	GFP 4	5' CGGACACGCTGAACTTGTGGC 3'
	GFP-N1-Rev	5' GGTGGCGACCGGTGGATCCC 3'

11.2.2 Verwendete Primer für die Klonierung der β -Gal-Fusionsproteine

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S9Ec- β Gal	MP-pASH-S9coli-For	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> ATGGCTGAAAATCAATACTAC 3'
	MP-pASH-S9coli-Rev	5' GAATCCA <u>AAGCTT</u> GCACGTTTGGAGAACTGCG 3'
S9Tt- β Gal	MP-pASH-S9-For	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> ATGGAGCAGTATTACGGCAC 3'
	MP-pASH-S9-Rev	5' GAATCCA <u>AAGCTT</u> GCACGCTTGGAGTACTGGG 3'
Sequenzier- primer	MA-pASH-FSeq	5' GGTCTGACATGGATTGGACG 3'
	MA-pASH-RSeq	5' GGAGTGCTGCAAGGCG 3'

11.2.3 Verwendete Primer für die Klonierung der ribosomalen Proteine S9

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S9Ec	S9 EcExpSense	5' CCC <u>AAGCTT</u> CCACCATGGCTGAAAATCAATACTACG 3'
	S9 EcExpAS	5' GGG <u>GATATC</u> TTAACGTTTGGAGAACTGCGG 3'
S9Tt	S9 TtExpSense	5' CCC <u>AAGCTT</u> CCACCATGGAGCAGTATTACGGCA 3'
	S9 TtExpAS	5' GGGCCC <u>GATATC</u> TTAACGCTTGGAGTACTGG 3'
Sequenzier- primer	CMV_Forward	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
	BGH_Reverse	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

11.2.4 Verwendete Primer für die Klonierung der EGFP-Fusionspeptide

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
EGFP-S9Ec (1-92)	MP-S9 Ec-GFP-Sense S9 Ec-GFP-AS	s. o. 5' GGGGAATTCCTTACTCGTCGTATTCCATCAGAG 3'
EGFP-S9Ec (93-130)	S9 Ec-GFP-Sense2 S9 Ec-GFP-AS2	5' GGGCC <u>AAGCTT</u> TTTCCCTGCGTTCTGAACTG 3' s. o.
EGFP-S9Tt (1-92)	MP-S9GFP-Sense S9 TtGFP-AS2	s. o. 5' GGGGAATTCCTTAGTAGTCGGGGTTGTACTGG 3'
EGFP-S9Tt (93-128)	S9 Tt-GFP-Sense2 MP-S9GFP-AntiS	5' CCCGGG <u>AAGCTT</u> TTTCGGGCGAAGCTCAAGCCT 3' s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (1-92)	MP-S9 Ec-GFP-Sense S9 Ec-GFP-AS	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (93-130)	S9 Ec-GFP-Sense2 S9 Ec-GFP-AS2	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Tt (1-92)	MP-S9GFP-Sense S9 TtGFP-AS2	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Tt (93-128)	S9 Tt-GFP-Sense2 MP-S9GFP-AntiS	s. o. s. o.
EGFP-S9Ec (109-130)	S9 Ec-GFP-Sense3 S9 Ec-GFP-AS2	5' GGGCC <u>AAGCTT</u> TTTCGTCAGGTTGAACGTAAG 3' s. o.
EGFP-S9Ec (116-130)	S9 Ec-GFP-Sense4 S9 Ec-GFP-AS2	5' GGGCC <u>AAGCTT</u> TTTGTCGGTCTGCGTAAAGCA 3' s. o.
EGFP-S9Tt (109-128)	S9 Tt-GFP-Sense3 MP-S9GFP-AntiS	5' CCCGGG <u>AAGCTT</u> TTTGTGGAGCGGAAGAAGTAC 3' s. o.
EGFP-S9Tt (114-128)	S9 Tt-GFP-Sense4 MP-S9GFP-AntiS	5' CCCGGG <u>AAGCTT</u> TTTACGGCAAGCACAAAGGCC 3' s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (109-130)	S9 Ec-GFP-Sense3 S9 Ec-GFP-AS2	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (116-130)	S9 Ec-GFP-Sense4 S9 Ec-GFP-AS2	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Tt (109-128)	S9 Tt-GFP-Sense3 MP-S9GFP-AntiS	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Tt (114-128)	S9 Tt-GFP-Sense4 MP-S9GFP-AntiS	s. o. s. o.

11.2.5 Verwendete Primer für die Klonierung der β -Gal-Fusionspeptide

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das von *T. thermophilus* als S9Tt bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S9Ec (1-92) - β Gal	MP-pASH-S9coli-For pASHEc92AntiS	s. o. 5' AGAGTCC <u>AAGCTT</u> GCCTCGTCGTATTCCATCAGA 3'
S9Ec (93-130) - β Gal	pASHEc93Sense MP-pASH-S9coli-Rev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> TCCCTGCGTTCTGAACTG 3' s. o.
S9Tt (1-92) - β Gal	MP-pASH-S9-For pASHTt1-92AntiS	s. o. 5' AGAGTCC <u>AAGCTT</u> GCGTAGTCGGGGTTGTACTG 3'
S9Tt (93-128) - β Gal	pASHTt93Sense MP-pASH-S9-Rev	5' GAATCCA <u>CTTAAG</u> CGGGCGAAGCTCAAGCC 3' s. o.
S9Ec (109-130) - β Gal	SenseS9 Ec109 MP-pASH-S9coli-Rev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> CGTCAGGTTGAACGTAAG 3' s. o.
S9Ec (116-130) - β Gal	SenseS9 Ec116 MP-pASH-S9coli-Rev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> GTCGGTCTGCGTAAAGCA 3' s. o.
S9Tt (109-128) - β Gal	SenseS9 Tt109 MP-pASH-S9-Rev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> TGGAGCGGAAGAAGTAC 3' s. o.
S9Tt (114-128) - β Gal	SenseS9 Tt114 MP-pASH-S9-Rev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> TACGGCAAGCACAAGGCC 3' s. o.

11.2.6 Verwendete Primer für die Klonierung der S9Ec-EGFP-Fusionspeptide

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
EGFP-EGFP-S9Ec (1-125)-EGFP	MP-S9 Ec-GFP-Sense S9 Ec125-AntiS	s. o. 5' ACCAGG <u>GAATTC</u> GCGGACGACGACGTGCTTTAC 3'
EGFP-EGFP-S9Ec (1-116)-EGFP	MP-S9 Ec-GFP-Sense S9 Ec116-AntiS	s. o. 5' ACCAGG <u>GAATTC</u> GGACTTTCTTACGTTCAACCTG 3'
EGFP-EGFP-S9Ec (1-108)-EGFP	MP-S9 Ec-GFP-Sense S9 Ec108-AntiS	s. o. 5' ACCAGG <u>GAATTC</u> GAGCGTCACGAGTAACGAAGC 3'
EGFP-EGFP-S9Ec (93-125)-EGFP	S9 Ec-GFP-Sense2 S9 Ec125-AntiS	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (93-116)-EGFP	S9 Ec-GFP-Sense2 S9 Ec116-AntiS	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (93-108)-EGFP	S9 Ec-GFP-Sense2 S9 Ec108-AntiS	s. o. s. o.
EGFP-EGFP-S9Ec (109-125)-EGFP	S9 Ec-GFP-Sense3 S9 Ec125-AntiS	s. o. s. o.

11.2.7 Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der S9Ec-Fusionspeptide

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; mutierte Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt; Überhänge für die direkte Ligation in den bereits restringierten Vektor pASH sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Bezeichnung der Oligonukleotide	Oligonukleotidsequenz
S9Ec (113-125) -βGal	SenOligo113-125 AntiSOligo113-125	5' <u>TTAAG</u> CGTAAGAAAGTCGGTCTGCGTAAAGCACGTCGTCGTCC <u>A</u> 3' 5' <u>AGCTT</u> GGACGACGACGTGCTTTACGCAGACCGACTTTCTTACGC <u>C</u> 3'
S9Ec (117-125) -βGal	SenOligo117-125 AntiSOligo117-125	5' <u>TTAAG</u> GGTCTGCGTAAAGCACGTCGTCGTCC <u>A</u> 3' 5' <u>AGCTT</u> GGACGACGACGTGCTTTACGCAGACCC <u>C</u> 3'
S9Ec (117-125) -βGal mut AS 120 K mutiert zu A	SenOligoEc120K-A ASOligoEc120K-A	5' <u>TTAAG</u> GGTCTGCGTGCAGCACGTCGTCGTCC <u>A</u> 3' 5' <u>AGCTT</u> GGACGACGACGTGCTGCACGCAGACCC <u>C</u> 3'

11.2.8 Verwendete Primer für die Klonierung der β-Gal-Fusionsproteine

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die RPs S6 bzw. S18 von *T. thermophilus* als S6Tt bzw. S18Tt bezeichnet; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S6Tt-βGal	pASH-S6TtFor pASH-S6TtRev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> ATGCGCAGGTACGAGGTG 3' 5' AATCCA <u>AAGCTT</u> CCCGCGTTGGCGAGGAAGG 3'
S18Tt-βGal	pASH-S18TtFor pASH-S18TtRev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> TTGAGCACGAAGAACGCGA 3' 5' AATCCA <u>AAGCTT</u> CCCTTCCGCACCAGCTTCTC 3'
Sequenzierprimer	MA-pASH-FSeq MA-pASH-RSeq	s. o. s. o.

11.2.9 Verwendete Primer für die Klonierung der S18Tt-β-Gal-Fusionspeptide

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS18 von *T. thermophilus* als S18Tt bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S18Tt (1-47) -βGal	pASH-S18TtFor pASH-S18-47Rev	s. o. 5' AATCCA <u>AAGCTT</u> CCCGTCTCCGACAGGAACC 3'
S18Tt (48-88) -βGal	pASH-S18-48For pASH-S18TtRev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> GGGAAGATCCTTCCCCG 3' s. o.
S18Tt (48-77) -βGal	pASH-S18-48For pASH-S18-77Rev	s. o. 5' AATCCA <u>AAGCTT</u> CCCCCTAGGATCCTCGCCC 3'
S18Tt (56-88) -βGal	pASH-S18-56For pASH-S18TtRev	5' AGAGTCC <u>CTTAAG</u> ACGGGGCTTCCGCCAAG 3' s. o.
Sequenzier- primer	MA-pASH-FSeq MA-pASH-RSeq	s. o. s. o.

11.2.10 Verwendete Primer für die S18Tt-β-Gal-Fusionspeptide mit Mutation

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS18 von *T. thermophilus* als S18Tt bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
S18Tt (48-77)-βGal mut AS 72 R mutiert zu A	pASH-S18-48For pASH-S18-77mut	s. o. 5' CCA <u>AAGCTT</u> CCCCCTAGGAT CCTCGCCGCCTTGATGGTCTT 3'
S18Tt (56-77)-βGal mut AS 72 R mutiert zu A	pASH-S18-56For pASH-S18-77mut	s. o. s. o.
Sequenzierprimer	MA-pASH-FSeq MA-pASH-RSeq	s. o. s. o.

11.2.11 Verwendete Primer für die Domänen austausch-Konstrukte

Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde das RPS9 von *E. coli* als S9Ec, das RPS16 von *H. sapiens* als S16Hs bezeichnet; die Zahlen in den Klammern geben den einklonierten Aminosäurenbereich der Peptide an; Schnittstellen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Konstrukt	Primerbezeichnung	Primersequenz
EGFP-EGFP-S9Ec(1-92)-S16Hs(103-146)	MP-S9 Ec-GFP-Sense	s. o.
	S9 Ec(1-92)-GFP-AS	5' GGG <u>GAATTC</u> CTCGTCGTATTCCATCAGAGCGC 3'
	S16(103-146)Sense	5' ACCAGG <u>GAATTC</u> GCTTCCAAGAAGGAGATCAA 3'
	S16(103-146)AntiS	5' ACCAGG <u>GGATCC</u> TTATCGGTAGGATTTCTGGTA 3'
EGFP-EGFP-S16Hs(1-102)-S9Ec(93-130)	S16(1-102)Sense	5' CCCGGG <u>AAGCTT</u> TTATGCCGTCCAAGGGCCCG 3'
	S16(1-102)AntiS	5' GGG <u>GAATTC</u> CTCATCCACATATTTCTGGTAATA 3'
	S9 Ec(93-130)EcoS	5' ACCAGG <u>GAATTC</u> TCCCTGCGTTCTGAACTG 3'
	S9 Ec(93-130)BamA	5' ACCAGG <u>GGATCC</u> TTAACGTTTGGAGAACTG 3'
Sequenzier-primer	GFP 2	s. o.
	CMV_Forward	s. o.
	BGH_Reverse	s. o.

11.2.12 Gefahrstoffliste

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen gemäß Paragraph 6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Calciumchlorid Dihydrat	Xi	36	22-24
Cycloheximid	T, N	61-28-68-51/53	53-45-61
Diethylpyrocarbonat	Xn	20/22-36/37/38	26-36
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dithiotreitol	Xi	36/37/38	36/37/39-22
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Xn	22	-
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Kanamycin Sulfat	T	61	26-36/37-39-45
Formaldehyd 37%	F	23/24/25-34-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
NaOH	C	35	26-37/39-45
2- Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Salzsäure, konzentriert	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	Xn	22-36/38	22-24/25
TEMED	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Tetrazyklin Hydrat 99%	F	22	22-36
Tris	Xi	36/38	-
Wasserstoffperoxid 30%	C	34	3-28-36/39-45
Xylencyanol FF	Xi	36/37/38	26-36

12. Curriculum vitae

Akademische Laufbahn

Promotion

05/2003 – 05/2007 Kernimport und nukleolare Akkumulation von bakteriellen ribosomalen Proteinen
am Institut für Molekulare Zellbiologie, Zentrum für Experimentelle Medizin, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
gefördert durch ein Stipendium der Universität Hamburg

Aufbaustudium

10/2003 - 09/2005 Molekularbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Studium

11/1997 - 09/2002 Ökotrophologie an der Technischen Universität München/ Weihenstephan

Abschluss: Diplom-Ökotrophologe mit Gesamtnote gut (1,7)

Schwerpunkte: Ernährungsphysiologie
Lebensmittelmikrobiologie
Hygiene und Technologie der Lebensmittel
Wirtschaftlichkeitsrechnung

Diplomarbeit: Elektrophysiologische Charakterisierung des Peptidtransporters PEPT1 beim Zebrafisch an Oozyten von *Xenopus laevis*

Praktika

11/2000 - 02/2001 Seminar in Medizinischer Mikrobiologie an der Technischen Universität München/Weihenstephan

03/2000 - 05/2000 Praktikum in der Qualitätssicherungsabteilung der Bayernland eG in Nürnberg

04/1997 - 06/1997 Praktikum in einer Großküche der EUREST Deutschland GmbH

02/1997 - 04/1997 Praktikum in der Küche eines gemeinwirtschaftlichen Altenwerks

Zivildienst

1996 - 1997 Fahrdienst bei der Kinderhilfe e.V. in Fürstenfeldbruck

Schulausbildung

06/1995 Allgemeine Hochschulreife

1986 - 1995 Graf-Rasso-Gymnasium, Fürstenfeldbruck

1982 - 1986 Grundschule Mitte, Eichenau

Besondere Kenntnisse**Fremdsprachen**

Englisch: Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift

dreimonatiger Sprachkurs in Vancouver, Kanada (1995)

Spanisch: Grundkenntnisse

einmonatiger Sprachkurs in Las Palmas, Spanien (1997)

EDV MS Office (Word, Excel, Powerpoint)

Mitgliedschaften

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.

Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie e.V.

Sonstige Interessen

Lesen, Ballsport, Squash, Reisen

Hamburg, 21.5.2007

13. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe sowie nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln erstellt zu haben. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen aus anderen Werken wurden als solche kenntlich gemacht. Ergebnisse von Diplom- und Schwerpunktarbeiten, die in diesem Arbeitskreis gewonnen wurden und die teilweise in diese Arbeit eingeflossen sind, wurden unter meiner Anleitung angefertigt.

Darüber hinaus versichere ich, keine früheren Promotionsversuche in einer anderen Einrichtung unternommen zu haben.

Hamburg, den 9.3.2007

Mark Perić