

**Reinigung und *in vitro* Charakterisierung  
des eukaryotischen Chaperonins TRiC  
aus *S. cerevisiae***

**Dissertation**

zur

**Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**

**– Dr. rer. nat. –**

**des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften**

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologin**

**Ulrike Böttcher**

**Gießen, 2006**



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen noch die Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

Giessen, den



Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2000 und April 2005 unter Leitung von Prof. F.U. Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Dekan Prof. Dr. Jürgen Mayer  
Institut für Biologiedidaktik, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Karl-Glöckner-Str. 21, 35392 Gießen

Erstgutachter Prof. Dr. Alfred Pingoud  
Institut für Biochemie, FB08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachter Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl  
Abteilung für Zelluläre Biochemie  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried

Tag der Promotion: 23.Mai 2006



---

## ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche neu-synthetisierte Proteine benötigen für ihre korrekte Faltung die Beteiligung spezieller Helferproteine, die als molekulare Chaperone bezeichnet werden und sowohl ko- als auch posttranslational wirken. Mitglieder der Hsp70 Klasse sowie andere Chaperone, die während der Translation direkt an die naszente Polypeptidkette binden, stabilisieren die wachsende Polypeptidkette und verhindern dadurch Fehlfaltungen und Aggregation. Daneben sind viele Proteine für ihre vollständige Faltung auf die Interaktion mit weiteren Chaperonen, wie z.B. Vertretern der Chaperonin-Klasse, angewiesen. Hierbei handelt es sich um große, zylindrische Komplexe mit zwei zentralen Faltungshöhlen, in deren Innern die Faltung von Substraten abgeschirmt von äußeren Einflüssen erfolgt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Chaperonin TRiC des eukaryotischen Zytosols. Dieser hetero-oligomere Komplex setzt sich aus zwei übereinander gelagerten Ringen zusammen, die jeweils eine Faltungshöhle umschließen und aus 8 verschiedenen Untereinheiten gebildet werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei TRiC um ein hoch spezialisiertes Chaperonin handelt, das ausschließlich für die Faltung der Zytoskelettproteine Aktin und Tubuline benötigt wird. Mittlerweile konnte aber auch eine Beteiligung von TRiC an der Faltung anderer Substrate nachgewiesen werden; so ist das Chaperonin z.B. an der Faltung verschiedener Proteine mit *WD-repeat* Propeller-Motiven involviert. Für die effiziente Faltung von Substraten benötigt TRiC das Zusammenspiel mit anderen Chaperonen. Während bei der Faltung von Aktin und Tubulinen TRiC eng mit dem Ko-Chaperon GimC/Prefoldin kooperiert, ist das Hsp70 Chaperon Ssb1/2p an der TRiC-vermittelten Faltung von Substraten mit *WD-repeats* beteiligt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Protokolls zur Reinigung von TRiC im Großmaßstab aus *S. cerevisiae* sowie die Verwendung des gereinigten Komplexes für funktionelle *in vitro* Studien, anhand derer die TRiC-vermittelte Faltung verschiedener Substrate näher untersucht wurde. Da TRiC in Hefezellen nur in geringen Mengen vorhanden ist, wurden anfangs unterschiedliche Strategien zur Reinigung ausreichender Mengen funktioneller Chaperonin-Komplexe verfolgt. Hierbei erwies sich die Epitop-Markierung einer Untereinheit mit einem Histidin-*tag* bei gleichzeitiger Überproduktion aller Untereinheiten als erfolgreich. Die Epitop-Markierung interferierte weder mit der Komplexassemblierung noch beeinflusste sie die Funktionalität des Chaperonins. Durch Verwendung einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsmatrix sowie drei weiterer chromatographischer Reinigungsschritte wurde der funktionelle Komplex zu einem hohen Reinheitsgrad aus Hefelysat isoliert.

Für funktionelle Studien wurde der gereinigte Komplex in einem isolierten System untersucht. Hierzu wurden mittels eines prokaryotischen *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems TRiC-Substrate (Aktin, Tubuline) *in vitro* synthetisiert und deren *de novo* Faltung in An- oder Abwesenheit von gereinigtem TRiC und weiterer gereinigter, eukaryotischer Chaperone (GimC, bzw. Ssb1p) analysiert. Zusätzlich wurde die Faltung

---

bislang kaum charakterisierter Substrate, die zur Strukturklasse der *WD-repeat* Proteine gehören, näher untersucht. Die Faltung *in vitro* synthetisierter Substrate wurde über Zunahme der Löslichkeit verfolgt, da fehlgefaltete Proteine zur Aggregation neigen. Zusätzlich wurden Substrat-spezifische Faltungstests entwickelt, die auf der Interaktion des neu-synthetisierten Polypeptids mit einem Partnerprotein basieren und direkt Aufschluss über den Faltungszustand geben. Für Aktin und Tubuline konnte gezeigt werden, dass *in vitro* Zugabe von gereinigtem TRiC oder GimC die Aggregation neu-synthetisierter Polypeptidketten verhindert. Die Substrat-Proteine erlangten aber nur ihren nativen Faltungszustand, wenn TRiC anwesend war, wie am Beispiel von Aktin veranschaulicht werden konnte; die Funktion von GimC war hierfür nicht ausreichend. Diese Ergebnisse bestätigen die Interpretation früherer *in vivo* Studien, nach denen GimC maßgeblich eine Funktion in der Zulieferung zu TRiC bzw. in der Qualitätskontrolle partiell gefalteter Substrate zukommt. Neben Aktin und Tubulinen wurden auch Mitglieder der neuen Substratklasse der *WD-repeat* Proteine mittels des hier entwickelten rekonstituierten *de novo* Faltungssystems untersucht. Hierbei konnte eine Beteiligung von TRiC an der Faltung des *WD-repeat* Proteins Cdc20p direkt nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Hsp70-Chaperon Ssb1p die Löslichkeit von *in vitro* synthetisiertem Cdc20p beeinflusst, im Gegensatz zu TRiC aber nicht dessen korrekte Faltung vermittelt. Damit nimmt dieses Hsp70-Chaperon hier eine ähnliche Funktion bei der Faltung der *WD-repeat* Substrate ein wie für GimC bezüglich der TRiC-vermittelten Faltung von Aktin- und Tubulinen beobachtet worden ist.

Zusätzlich zu den *in vitro* Faltungsstudien wurden *in vivo* Experimente entwickelt, mittels derer sich die Faltungskinetik von beta-Tubulin bestimmen lässt und die temporäre Assoziation mit Komponenten des Chaperon-Netzwerks näher untersucht werden kann.

Die hier entwickelten Methoden zur effizienten Reinigung von TRiC aus Hefe und zur *in vitro* Faltungsanalyse verschiedener TRiC-Substrate erlaubten es, in einem isolierten System die direkte Beteiligung einzelner Chaperone an der Proteinfaltung zu untersuchen. Diese Methoden lassen sich zukünftig auch auf die Analyse gereinigter Mutanten von TRiC sowie anderer Chaperone ausweiten und damit gezielt für die Untersuchung bestimmter Prozesse, wie z.B. der Substraterkennung von TRiC, verwenden.

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
Ω	Ohm, Maßeinheit für den Widerstand
λ	Wellenlänge
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest
ATP	Adenosinriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
CCT	<i>Chaperonin containing TCP1</i>
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase ( <i>calf intestine phosphatase</i> )
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dATP	Deoxyadenosinriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethyl Formamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNaseI	Desoxyribonuklease I
DNS	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad, Maßeinheit für die elektrische Kapazität
5'FOA	5'-Fluor-Orotsäure
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
g x	Erdbeschleunigung
GimC	<i>Genes involved in microtubule biogenesis complex</i>
GroEL	Prokaryotisches Hsp60 Chaperonin
GroES	Prokaryotisches Hsp10
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethan-sulfonsäure]
His	Histidin
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LiAc	Lithiumazetat

---

In	natürlicher Logarithmus
log	logarithmisch
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
MAT	Mating type
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MPa	Mega Pascal
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RNaseA	Ribonkulease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccaromyces pombe</i>
Ssb	<u>Stress seventy subfamily B</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<u>Tobacco Etch Virus</u>
TCA	Trichloressigsäure
<i>TCP1</i>	<u>Tailness complex polypeptide 1</u>
TRiC	<u>TCP1 ring complex</u>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20 <sup>®</sup>	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TY	Trypton-Hefeextrakt
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
(v/v)	<i>volume per volume</i>
W	Watt
WT	Wildtyp
(w/v)	<i>weight per volume</i>
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Dektrose
z.B.	zum Beispiel

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteinfaltung</b>	<b>1</b>
1.1.1. Proteinfaltung <i>in vitro</i>	1
1.1.2. Proteinfaltung <i>in vivo</i>	2
1.1.2.1. Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen	2
1.1.2.2. Molekulare Chaperone	3
<b>1.2. Netzwerk der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung im Zytosol</b>	<b>4</b>
1.2.1. Hsp70-System	7
1.2.2. Chaperonine	8
<b>1.3. Das eukaryotische Chaperonin TRiC</b>	<b>11</b>
1.3.1. Substrate von TRiC	13
1.3.1.1. GimC und die Faltung von Aktin und Tubulinen	14
1.3.1.2. Ssb und die Faltung von Proteinen mit <i>WD-repeat</i> Motiv	17
1.3.3. Krankheiten assoziiert mit Proteinmissfaltungen von TRiC-Substraten	18
<b>1.4. Ziel der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>20</b>
2.1.1. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme)	20
2.1.2. Geräte	20
2.1.3. Lösungen und Puffer	20
2.1.4. Kultivierungsmedien	21
2.1.5. Stämme	23
2.1.6. Plasmide	24
2.1.7. Oligonukleotide	25
2.1.8. Antikörper	27
2.1.9. Standards	27
2.1.10. Säulenmaterial zur Reinigung von Proteinen	28
2.1.14. Waschen von Glasperlen	31
<b>2.2. Mikrobiologische und genetische Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1. Arbeitstechniken für <i>E. coli</i>	32
2.2.2. Arbeitstechniken für <i>S. cerevisiae</i>	33
<b>2.3. Molekularbiologische Techniken</b>	<b>40</b>
2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	40
2.3.2. Isolierung chromosomaler DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.3.4. Klonierung von Plasmidkonstrukten	42
2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.3.6. Fällern von DNS	45
2.3.7. Insertion eines DNS-Fragments in den pCR-TOPO 2.1 Vektor	46
2.3.8. DNS-Markierung durch Einbau Digoxigenin-gekoppelten Desoxyuridins	46
2.3.9. Kolonie-Hybridisierung	46
2.3.10. Southern-Hybridisierung	47
<b>2.4. Proteinbiochemische Techniken</b>	<b>48</b>
2.4.1. Gel- und Western-Blot Techniken	48
2.4.2. Herstellung von Zellextrakten	53
2.4.3. Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	54
2.4.4. Reinigung von Proteinen aus <i>S. cerevisiae</i>	60
2.4.5. Generierung von Antikörpern	67
2.4.6. Kopplung von Antikörpern an ProteinA-Sepharose	68
2.4.7. Kopplung von DNaseI an CNBr-aktivierte Sepharose	69
2.4.8. Immunpräzipitation	69

2.4.10. <i>In vitro</i> Transkription/Translation im zellfreiem System	70
2.4.11. Bindungsstudien	72
2.4.12. Depletion von GroEL aus dem RTS-Kit mittels Immunpräzipitation	74
2.4.13. Pulse-Chase Faltungskinetiken von Aktin und Tubulin	74
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
<b>3.1. Reinigung von TRiC aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>77</b>
3.1.1. Herstellung von Antikörpern und Hefestämmen zum Nachweis von TRiC in <i>S. cerevisiae</i>	77
3.1.1.1. Herstellung polyklonaler Antikörper zur Detektion von TRiC Untereinheiten	77
3.1.1.2. Chromosomale Integration eines Epitop-tags in ein <i>TCP/CCT</i> -Gen	78
3.1.2. Immunpräzipitation von TRiC mittels Untereinheiten-spezifischer Antikörper	80
3.1.3. Immunpräzipitation von TRiC mittels HA-spezifischer Antikörper	81
3.1.4. Reinigung von TRiC mittels eines TEV-linker-6His-tags	82
3.1.4.1. Hefestamm zur Überproduktion von TRiC	85
3.1.4.1.1. Herstellung von Überexpressionsplasmiden für TRiC Untereinheiten	85
3.1.4.1.2. Herstellung eines Hefestammes zur Überproduktion von TRiC	87
3.1.4.1.3. Optimierung der TRiC Überproduktionsbedingungen im Großmaßstab	89
3.1.4.2. Entwicklung des Reinigungsprotokolls für TRiC	91
3.1.4.3. Qualitätskontrollen für gereinigtes TRiC	95
<b>3.2. <i>In vitro</i> Proteinfaltungsstudien mit gereinigtem TRiC im prokaryotischen Translationssystem</b>	<b>99</b>
3.2.1. TRiC-vermittelte Proteinfaltung mit Hilfe akzessorischer Faktoren	100
3.2.1.1. Reinigung von GimC aus <i>S. cerevisiae</i>	100
3.2.1.1.1. Optimierung des Reinigungsprotokolls	100
3.2.1.1.2. Qualitätskontrollen für gereinigtes GimC	103
3.2.1.2. Reinigung von Ssb1p aus <i>E. coli</i>	105
3.2.2. Klassische TRiC Substrate: Aktin und Tubuline	107
3.2.2.1. Löslichkeit von Aktin und Tubulinen in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren	107
3.2.2.2. Faltung von Aktin in Abhängigkeit von TRiC und GimC im prokaryotischen Translationssystem	109
3.2.2.3 Löslichkeitsverhalten von alpha- und beta-Tubulinen in Abhängigkeit von TRiC und GimC	110
3.2.3. Neue Substratklasse von TRiC: Proteine mit <i>WD-repeat</i> Motiv	112
3.2.3.1. Löslichkeit von Cdc20p, Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren	113
3.2.3.2. Bindungspartner für TRiC Substrate mit <i>WD-repeats</i>	115
3.2.3.3. Faltung von <i>WD-repeat</i> Proteinen in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren	116
3.2.3.3.1. Löslichkeit und Faltung von <i>in vitro</i> synthetisiertem Cdc20p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p	118
3.2.3.3.2. Löslichkeit von <i>in vitro</i> synthetisiertem Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p	121
3.2.3.3.3. Faltung von Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA aus Hefelysat in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1/2p	122
<b>3.3. Experimente zur Bestimmung der beta-Tubulin Faltungskinetik <i>in vivo</i></b>	<b>125</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>129</b>
<b>4.1. Reinigung von TRiC aus <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>129</b>
4.1.1. Vergleich verschiedener Strategien zur Anreicherung von TRiC	129
4.1.2. Entwicklung eines Reinigungsprotokolls von TRiC im Großmaßstab	131
<b>4.2. <i>In vitro</i> Faltungsstudien mit gereinigtem TRiC aus <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>133</b>
4.2.1. Entwicklung von <i>in vitro</i> Rekonstitutionstests zur Faltung von TRiC Substraten	133
4.2.2. Anwendung von <i>in vitro</i> Faltungstests zur Validierung potentieller TRiC Substrate	136
4.2.2.1. <i>De novo</i> Faltung von Cdc20p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p	137
4.2.2.2. Löslichkeit von Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb	138
<b>4.3. <i>In vivo</i> Faltungskinetiken mit beta-Tubulin</b>	<b>141</b>
<b>4.4. Ausblick</b>	<b>143</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>144</b>

---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Proteinfaltung

Proteine spielen in lebenden Zellen eine zentrale Rolle. Sie bilden mengenmäßig den größten Anteil einer Zelle. Sie sind nicht nur Strukturelemente, aus denen die Zellen konstruiert sind, sondern führen z.B. in Form von Enzymen zahlreiche dynamische und metabolische Funktionen aus. Zahlreiche chemische Reaktionen werden durch enzymatisch vermittelte Katalysen begünstigt. Neben vielfältigen Aufgaben wie z.B. allgemeine Transport- und Reservefunktionen ermöglichen Proteine auch den selektiven Transport bzw. Informationsaustausch zwischen unterschiedlichen Kompartimenten, Zellen oder Geweben. Um die Vielfalt dieser Aufgaben abzudecken, müssen Proteine in der Lage sein, mit anderen Proteinen oder Substraten gezielt Wechselwirkungen einzugehen. Die Spezifität dieser Interaktionen wird vor allem durch die drei-dimensionale Struktur aller Proteine gewährleistet. Obwohl eine neu-synthetisierte, lineare Polypeptidkette theoretisch eine Vielzahl unterschiedlicher Konformationen einnehmen könnte, ist die native, drei-dimensionale Struktur eines Proteins, seine Faltung, exakt festgelegt. Die gefaltete Konformation eines Proteins wird durch seine Aminosäureabfolge bestimmt. Während für viele Proteine die Information der Aminosäuresequenz allein ausreicht, um ihre korrekte drei-dimensionale Struktur selbständig zu erreichen, benötigen andere Proteine die Hilfe von Proteinen, den so genannten „molekularen Chaperonen“. In ihrer Funktion als Faltungshelfer verhindern Chaperone (franz. *chaperone*, Anstandsdame) die Missfaltung und Aggregation von Proteinen. Ferner sind sie in die funktionelle Regulation von Signalproteinen sowie in die Regulation des Proteinabbaus involviert. Die Erforschung molekularer Chaperone hat daher das Verständnis für zelluläre Mechanismen zum Ziel, die sich hinter diesen Prozessen verbergen.

### 1.1.1. Proteinfaltung *in vitro*

Durch die Arbeiten von Christian Anfinsen konnte in den 1960er Jahren anhand Hitze-denaturierter Ribonuklease A gezeigt werden, dass Proteinfaltung *in vitro* spontan erfolgen kann ohne die Hilfe zusätzlicher Faktoren (Anfinsen 1969, 1972, 1973). Demzufolge sind alle nötigen Informationen für die Ausbildung der drei-dimensionalen Gestalt eines Proteins in dessen Aminosäuresequenz enthalten. Auf welche Weise aber ein Protein seine native (= energetisch günstigste) Konformation erlangt, war lange Zeit nicht verstanden. Geht man von der stark vereinfachten Annahme aus, dass jeder Aminosäurerest aufgrund des freien Rotationswinkels der C-C Bindung nur zwei unterschiedliche Konformationen in einer Polypeptidkette annehmen könnte, ergäben sich für ein Protein von 100 Aminosäuren bereits  $2^{100}$  ( $\sim 10^{30}$ ) unterschiedliche Konformationen. Bei einer Faltungsrate von  $10^{11}$  Konformationsänderungen pro Sekunde würde demzufolge die theoretische Faltungszeit  $10^{11}$  Jahren betragen (Dinner *et al.*, 2000).

Gewöhnlich erfolgt die Proteinfaltung *in vivo* aber innerhalb von Sekunden (Sali *et al.*, 1994). Dieser Widerspruch wird als Levinthal-Paradoxon beschrieben. Das Levinthal-Paradoxon beruht auf der Erkenntnis, dass sich der Faltungsprozess eines Proteins in seine native Struktur nicht durch das zufällige Durchspielen aller möglichen Konformationen erklären lässt (Zwanzig *et al.*, 1992).

Unter der Annahme, dass ein korrekt gefaltetes Protein die niedrigste freie Energie aufweist, lässt sich der Faltungsprozess jedoch nach thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten mittels einer so genannten Konformations-Energiekarte beschreiben (Dobson und Karplus, 1999). In diesem Modell ist die „Energiewand“ trichterförmig, mit vielen nach unten ragenden Ausläufern dargestellt. Die native Proteinstruktur befindet sich am unteren Ende des Trichters (Schultz, 2000). Während des vektoriellen Faltungsprozesses erreicht ein Protein oftmals lokale Energie-Minima, die transienten Faltungsintermediaten oder kinetisch gefangenen, missgefalteten Konfigurationen entsprechen (Pande *et al.*, 1998). Für Proteine mit komplexer Struktur beschreibt das Modell folgende, vereinfachte Faltungsschritte. Zufällig gebildete Sekundärstrukturen kollabieren schnell zum *molten globule*, d.h. zu einer locker organisierten, aber fast nativen Proteindomäne. Hydrophobe Kernbereiche lagern sich zu einer kompakten, aber noch flexiblen Struktur zusammen. Sekundärstrukturelemente, die mehr oder weniger dem späteren nativen Zustand ähneln, können bereits vorhanden sein. Die *molten globules* weisen aber noch keine definierte Tertiärstruktur auf und exponieren noch hydrophobe Reste. Langwieriger sind dagegen die anschließenden konformationellen Anpassungen und Assoziationen verschiedener Untereinheiten, die zu einer kompakteren Struktur führen. Schließlich erreicht das Protein in einem letzten schnellen Schritt seine native Struktur (Dinner *et al.*, 2000). Je geringer die Anzahl thermodynamisch favorisierter Zwischenkonformationen ist, die ein Protein während seiner Faltung einnehmen kann, desto kürzer ist auch die Zeitspanne, die eine spontane Proteinfaltung beanspruchen würde. Der gerichtete Faltungsverlauf eines Proteins von hoher bis zu niedriger freier Enthalpie bietet die Erklärung, mit der das Levinthal-Paradoxon aufgehoben wird.

## **1.1.2. Proteinfaltung *in vivo***

### **1.1.2.1. Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen**

Verglichen mit *in vitro* Experimenten ist die Proteinfaltung *in vivo* wesentlich komplexer. Die Proteinkonzentration im Zytoplasma einer Zelle beträgt bis zu 300 g/l (Cayley *et al.*, 1991; Zimmerman und Trach, 1991). Diese hohen Makromolekülkonzentrationen führen unweigerlich zu einem Volumenausschlusseffekt (*excluded volume effect* oder *molecular crowding*). Die Konsequenz solch einer dicht gedrängten Umgebung äußert sich u.a. in verstärkten intra- und intermolekularen Assoziationsraten von Proteinen (Minton, 1983, Zimmerman und Minton, 1993). Daneben können auch Parameter wie Temperatur, pH-Wert oder Ionenkonzentrationen die spontane Proteinfaltung beeinflussen. Ferner lassen

*in vitro* Experimente oftmals nur Aufschluss über die Rückfaltung eines zuvor denaturierten Proteins zu. Der Faltungsprozess neu-synthetisierter Proteine *in vivo* unterscheidet sich aber von der Rückfaltung eines Proteins vor allem durch den Umstand, dass er mit der Proteinsynthese gekoppelt ist (ko-translationale Faltung; Netzer und Hartl, 1997). Solange das C-terminale Ende einer Polypeptidkette sich noch im ribosomalen Ausgangstunnel befindet (ca. 30-40 Aminosäuren der naszenten Polypeptidkette), kann es nicht in den Faltungsprozess involviert werden. Dieser Umstand impliziert, dass eine Proteindomäne (ca. 100-300 Aminosäuren) erst dann eine stabile Struktur einnehmen kann, nachdem die vollständige Aminosäuresequenz den ribosomalen Ausgangstunnel verlassen hat. Damit ist die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, die durch exponierte hydrophobe Aminosäuren zustande kommen, erhöht (Hartl und Hayer-Hartl *et al.*, 2002). Solche Faltungsintermediate, die während der Elongation der Polypeptidkette entstehen, neigen zur Aggregation.

Fehlfaltungen innerhalb eines Proteins entstehen z.B. durch Interaktionen zwischen Regionen, die im nativen Zustand nicht benachbart liegen. Hydrophobe Seitenketten, die im Inneren des nativen Proteins verborgen sind, können exponiert im hydrophilen Milieu des Zytoplasmas weitere Fehlfaltungen begünstigen. Im weiteren Verlauf können sich Aggregate bilden, die durch hydrophobe Kräfte und Wasserstoff-Brückenbindungen innerhalb der Polypeptidkette zusammengehalten werden (Ellis und Hartl, 1999; Dobson und Karplus, 1999). Dabei können typisch strukturierte, fibrilläre Aggregate entstehen, die mit der Ausbildung bestimmter Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington in Verbindung gebracht werden (Dobson, 1999).

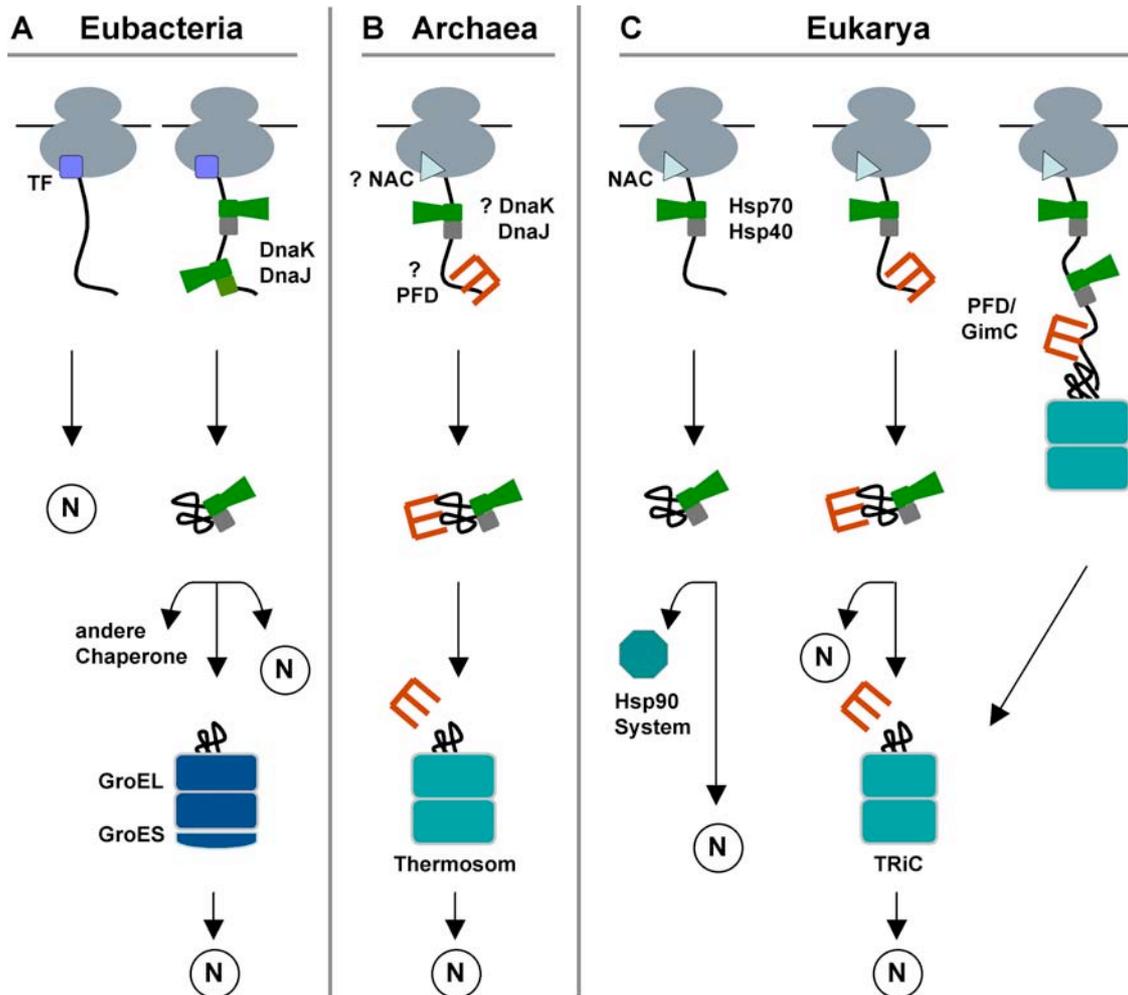
### 1.1.2.2. Molekulare Chaperone

In der Zelle wird die Akkumulation fehlgefalteter Proteine durch das Einwirken molekularer Chaperone reduziert. Die Bezeichnung „molekulares Chaperon“ wurde Ende der 70er Jahre für Nucleoplasmin aufgrund seiner speziellen Rolle bei der Ausbildung der Chromatinstruktur geprägt (Laskey *et al.*, 1978). Heute kennt man eine ganze Reihe von Chaperon-Familien, die im Reich der Eubacteria, Archaea und Eukarya vorzufinden sind. Alle Chaperone teilen folgende charakteristische Eigenschaften (Ellis und Hartl, 1999): Sie enthalten weder sterische Informationen für andere Proteine noch sind sie Teil der nativen Struktur des gefalteten Proteins. Im Gegensatz zu Enzymen (z.B. Isomerasen) beeinflussen Chaperone nicht die Faltungsrate ihrer Substratproteine. Ihre Wirkungsweise beschränkt sich hauptsächlich darauf, zur Aggregation neigende Bereiche eines nicht gefalteten Proteins abzuschirmen, bis dieses seine native Struktur erreicht hat (Agashe und Hartl, 2000). Dies geschieht gewöhnlich durch wiederholtes Binden und Freisetzen einer ungefalteten Polypeptidkette in Abhängigkeit von ATP-Hydrolyse. Demzufolge begünstigen Chaperone intrazelluläre Bedingungen, in denen unerwünschte Wechselwirkungen, die zur Missfaltung oder Aggregation führen können, reduziert werden und somit eine produktive Proteinfaltung gefördert wird.

Eine effiziente Proteinfaltung ist umso wichtiger, wenn der Organismus Stressfaktoren, wie z.B. extremen Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen, ausgesetzt ist. Unter diesen Bedingungen kann es zur Destabilisierung der nativen Konformation eines bereits gefalteten Proteins kommen, die mit der Exponierung hydrophober Bereiche einhergeht und somit Akkumulation von Proteinaggregaten begünstigt. Die Zelle reagiert auf die erhöhte Menge ungefalteter Proteine mit einer verstärkten *de novo* Synthese bestimmter Chaperone (Lindquist, 1986; Morimoto, 1998). Basierend auf Untersuchungen an Zellen, die Temperaturstress ausgesetzt worden waren, wurde in diesem Zusammenhang der Begriff Hitzeschock-Protein (*heat-shock protein*, Hsp) erstmalig geprägt. Viele Chaperone gehören insofern zu den Hitzeschock-Proteinen, als sie - obwohl konstitutiv exprimiert - unter Stress-Bedingungen vermehrt gebildet werden. Mittlerweile handelt es sich bei der Abkürzung Hsp um ein weit verbreitetes Synonym für Chaperone. Hsp-Chaperone binden partiell ungefaltete Proteine, verhindern dadurch deren Aggregation und halten sie solange stabil, bis die Zelle eine korrekte Rückfaltung gewährleisten kann. Demzufolge übernehmen Chaperone eine essentielle Schutzfunktion in der Zelle. Die Auslösung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wird auf die Akkumulation von Proteinaggregaten, wie z.B. im Fall des Prion Proteins oder Huntingtins, zurückgeführt. In diesen Aggregaten wurden verschiedene Chaperone assoziiert vorgefunden. Demzufolge wird bei der Ausprägung des Krankheitsbildes eine verminderte Schutzfunktion von Chaperonen diskutiert, die mit einem Ungleichgewicht zwischen dem Chaperonsystem und der massiven Akkumulation toxischer Proteinaggregate erklärt werden könnte (Soti und Csermely, 2002; Barral *et al.*, 2004).

## **1.2. Netzwerk der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung im Zytosol**

Molekulare Chaperone beeinflussen und kontrollieren die Konformation anderer Proteine in vielfältiger Weise. Sie sind an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt wie z.B. Bindung und Schutz naszenter Polypeptidketten bei der Translation, der Stabilisierung faltungskompetenter Übergangsformen, der Assemblierung oligomerer Proteine und der korrekten Rückfaltung missgefalteter Proteine. Die einzelnen Chaperone haben überlappende Funktionen und kooperieren miteinander. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass unterschiedliche Chaperone ein Netzwerk bilden, innerhalb dessen Substrate vom Ribosom bis zu ihrer nativen Struktur mit verschiedenen Chaperonen interagieren (Young *et al.*, 2004). Obwohl viele Fragen bezüglich der Funktion oder des Substratspektrums bestimmter Chaperone noch unbeantwortet sind, so ist doch das Zusammenspiel der einzelnen Chaperonen in solch einem Netzwerk verständlicher geworden. Abbildung 1.1 zeigt anhand eines vereinfachten Schaubildes, wie die verschiedenen Komponenten bei der Faltung *de novo* synthetisierter Polypeptidketten miteinander kooperieren.



**Abb. 1.1: Modell für die Chaperon-vermittelte Faltung neu-synthetisierter Proteine in Eubacteria, Archaea und im Zytosol der Eukarya.** N: Natives Protein, TF: *trigger factor*, NAC: *nascent chain associated complex*, PFD: Prefoldin in Archaea und Säugetieren (= GimC in *Saccharomyces cerevisiae*), DnaK/DnaJ: bakterielle Hsp70/Hsp40-Proteine, GroEL/GroES: bakterielles Chaperonin, Thermosom: Chaperonin in Archaea, TRiC: Chaperonin im Zytosol der Eukarya. Kofaktoren und zusätzliche Faltungswege wurden nicht in das Schema aufgenommen. (A) Eubacteria, (B) Archaea: Nur manche Archaea beinhalten DnaK/DnaJ und PFD. Die Interaktion zwischen Chaperonen und der naszenten Polypeptidkette ist bislang nicht experimentell erwiesen. (C) Eukarya: Im Gegensatz zu GroEL können Chaperonine der Gruppe II an der ko-translationalen Proteinfaltung beteiligt sein. Nach Hartl und Hayer-Hartl, 2002.

Bei einigen, weniger komplexen Proteinen läuft die Proteinfaltung nach Freisetzung der Polypeptidkette vom Ribosom spontan ab. Eine Vielzahl von Proteinen, insbesondere Proteine mit mehreren strukturellen Domänen, benötigt dagegen die Hilfe von Chaperonen während und nach der Translation (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Noch während der Synthese verlässt der N-terminale Bereich der naszenten Polypeptidkette den Polypeptid-Ausgangstunnel der großen ribosomalen Untereinheit. Zu diesem Zeitpunkt können bereits erste Wechselwirkungen der wachsenden Polypeptidkette mit Ribosomen-assoziierten Faktoren entstehen. Bei diesen Ribosomen-gebundenen Faktoren handelt es sich in *Escherichia coli* um TF (*trigger factor*), der direkt an das ribosomale Protein L23

bindet. Es wird angenommen, dass TF den ersten Kontakt mit hydrophoben Regionen der wachsenden Polypeptidkette außerhalb des ribosomalen Ausgangstunnels herstellt. TF zeigt keine ATPase Aktivität, besitzt aber eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase Funktion. Allerdings stellt TF keine essentielle Komponente dar, und seine biologische Relevanz für die Proteinfaltung ist noch nicht vollständig geklärt (Bukau *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2002). Ein strukturell homologes Protein zu TF ist für das eukaryotische Zytosol zwar nicht bekannt, jedoch interagiert in *Saccharomyces cerevisiae* und höheren Eukaryoten ein analoger Ribosomen-gebundener Komplex mit der wachsenden Polypeptidkette, NAC (*n*ascent *c*hain *a*ssociated *c*omplex). Seine Funktion könnte vermutlich in der Bindung und damit dem Schutz hydrophober Bereiche der naszenten Polypeptidkette liegen. Des Weiteren wurde in *S. cerevisiae* ein zusätzlicher Ribosomen-assoziiertes Komplex identifiziert, RAC (*r*ibosome, *a*ssociated *c*omplex), der aus dem Hsp70 Chaperon Ssz1p und dem Hsp40 Ko-Chaperon Zuotin besteht (Näheres hierzu siehe 1.2.1).

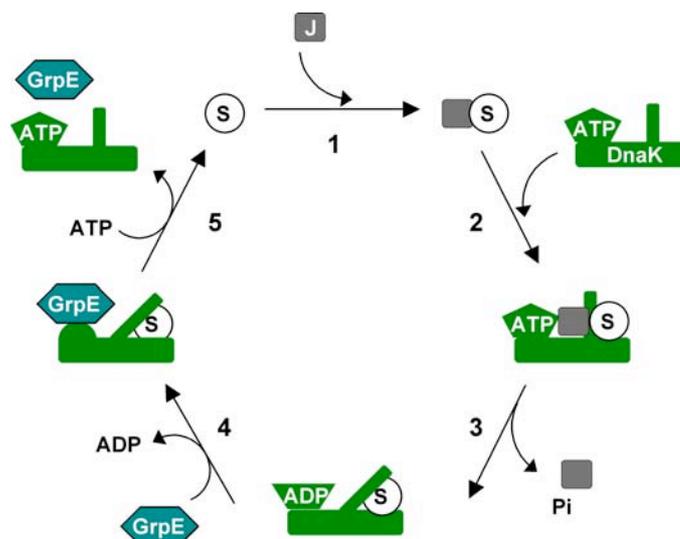
Daneben binden weitere Mitglieder der Hsp70-Familie an die noch nicht vollständig synthetisierte Polypeptidkette. Das bekannteste Hsp70 Protein ist das bakterielle DnaK (Teter *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* interagiert Ssb1/2p (*s*tress-*s*eventy *s*ubfamily *B*) mit der naszenten Polypeptidkette (Craig *et al.*, 2003). Hsp70 Chaperone verhindern hierdurch unkorrekte intramolekulare Interaktionen der wachsenden Polypeptidkette bzw. intermolekulare Interaktionen mit anderen nicht-gefalteten Polypeptidketten (Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Rudiger *et al.*, 1997). Für einige, meist kleinere Proteine reicht die Unterstützung von Hsp70 Chaperonen aus, um schrittweise zu ihrer nativen Konformation zu gelangen (Netzer und Hartl, 1998). Andere Proteine benötigen dagegen für ihre korrekte Faltung weitere Chaperone, die in unterschiedlichen Faltungswegen fungieren. In Eukaryoten werden einige Proteine z.B. an das Hsp90-System weitergeleitet, in welchem Hsp70 gemeinsam mit Hsp90 und einer Vielzahl von Kofaktoren die Faltung dieser Proteine begünstigt. Das Hsp90-System ist an der Faltung von diversen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Kinasen, beteiligt. Strukturelle oder funktionelle Gemeinsamkeiten sind bei den bislang bekannten Substraten jedoch nicht erkennbar.

Andere Substrate werden während ihrer Faltung an die Familie der Chaperone, die einen zylindrischen Aufbau mit einer zentralen Faltungshöhle besitzen, weitergeleitet, in deren Inneren der Faltungsprozess des Proteins gegenüber dem Zytosol abgeschirmt stattfindet (Young *et al.*, 2004). Bakterielle Chaperonine wie GroEL benötigen einen Kofaktor, GroES, der eine Deckelfunktion für die Faltungshöhle einnimmt. Eukaryotische Chaperonine wie TRiC benötigen für ihre eigentliche Funktion keinen Kofaktor. TRiC kooperiert aber bei Faltung von Substraten eng mit anderen Chaperonen (GimC/Prefoldin bzw. Ssb1/2p, s. 1.3.1.1. und 1.3.1.2.), die an die naszente Polypeptidkette binden.

### 1.2.1. Hsp70-System

Mitglieder der Hsp70-Familie haben ein Molekulargewicht von ungefähr 70 kDa und kommen in Eubacteria, Eukarya und in manchen Archaea vor. Hsp70 Chaperone sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, so z.B. an der Faltung neu-synthetisierter Proteine, der Rückfaltung denaturierter Proteine oder am Abbau fehlgefalteter Proteine (Zylicz und Wawrzynow, 2001). Hsp70-Proteine binden an exponierte hydrophobe Bereiche von denaturierten bzw. nicht-gefalteten Proteinen. Solange Hsp70-Chaperone an das partiell gefaltete Substrat gebunden sind, ist dessen weitere Faltung und damit eine eventuelle Aggregation blockiert. Die meisten Hsp70-Proteine kooperieren während ihres funktionellen Zyklus mit Partnerproteinen, zu denen Hsp40-Proteine und Nukleotid-Austausch-Faktoren zählen.

DnaK aus *E. coli* ist das am besten untersuchte Hsp70-Protein. Während des Bindungszyklus wird DnaK einer starken strukturellen Konformationsänderung unterzogen, die durch Bindung und Freisetzung von Nukleotiden ausgelöst wird (Bukau und Horwich, 1998; Naylor und Hartl, 2001). Das Zusammenspiel mit dem Hsp40 Ko-Chaperon DnaJ und dem Nukleotid-Austauschfaktor GrpE kontrolliert den Bindungszyklus. Die Bindung eines nicht-nativen Proteins an DnaK wird durch DnaJ initiiert. DnaJ stimuliert die DnaK vermittelte ATP-Hydrolyse und führt somit zu einer stärkeren Interaktion zwischen DnaK und Substrat. GrpE katalysiert den Austausch von DnaK-gebundenem ADP mit ATP, worauf die Substrat-Interaktion vermindert wird und sich hierdurch die Möglichkeit einer korrekten Faltung des Substrats ergibt. Die Bindungszyklen können sich solange fortsetzen, bis z.B. das Substrat seine native Struktur erhalten hat (s. Abb. 1.2 für *E. coli*).



**Abb. 1.2: Model des Reaktionszyklus von DnaK.**

(1) Schnelle, transiente Assoziation von DnaJ (J) mit Substrat (S). (2) Substrattransfer zu DnaK, geringe Substrataffinität, hohe Assoziations- und Dissoziationsraten. (3) DnaJ stimuliert ATP-Hydrolyse und stabilisiert so die Substratbindung. (4) Assoziation von GrpE führt zur Nukleotid-Freisetzung. (5) ATP-Bindung an DnaK und Disassemblierung des Komplexes. Nach Hartl und Hayer-Hartl, 2002.

Eukaryotische Hsp70 Chaperone (z.B. Ssa1-4p in *S. cerevisiae*, Hsc70 in Säugetierzellen) unterliegen einem ähnlichen Bindungszyklus. Eukaryotische Hsp40 Homologe von DnaJ (z.B. Ydj1p oder Sis1p in *S. cerevisiae*, Hdj1 und Hdj2 in Säugetieren; Cyr *et al.*, 1994) interagieren ebenso mit ungefalteten Substraten und stimulieren die ATP-Hydrolyse ihres Hsp70-Partners. Dagegen sind für das eukaryotische Zytosol keine GrpE-homologen Proteine bekannt. Allerdings wurden andere Proteine mit ähnlicher Funktion identifiziert, die aber keine strukturellen Gemeinsamkeiten zu GrpE aufweisen (z.B. Fes1p *S. cerevisiae*, BAG1 oder HspBP1 in Säugetieren; Kabani *et al.*, 2002a; Kabani *et al.*, 2002b; Höfeld und Jentsch, 1997).

Im Zytosol und in einzelnen Kompartimenten von *S. cerevisiae* wurden zahlreiche Hsp70-Chaperone identifiziert, die sich in verschiedene Unterklassen einordnen lassen. Die Klasse der Ssa1-4p- und Ssb1/2p-Chaperone (stress-seventy subfamilies A und B) gelten bislang als die am besten untersuchten zytosolischen Hsp70-Unterklassen. Das Genom von *S. cerevisiae* beinhaltet 4 SSA- und 2 SSB-Gene, wobei die Genprodukte innerhalb einer Unterklasse eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von mehr als 90% aufweisen. Ssa1-4p Chaperone spielen eine entscheidende Rolle in post-translationalen Prozessen, wie z.B. der Faltung und Membrantranslokation von Polypeptiden ins ER oder Mitochondrien (Mayer und Bukau, 2005). Einige Mitglieder dieser Gruppe unterliegen einer Hitzeschock-induzierbaren Genexpression. Im Gegensatz zur Ssa-Unterklasse ist die Gruppe der Ssb-Chaperone nicht essentiell. Ssb1p und Ssb2p sind Ribosomen-assoziiert und interagieren direkt mit naszenten Polypeptidketten. Ssb1/2p scheint einer besonderen Regulation zu unterliegen, da der vermeintliche Hsp40-Partner, Zuo1p, mit einem weiteren Hsp70 Chaperon, Ssz1p, in dem RAC Komplex vorliegt (Craig *et al.*, 2003). Inwieweit die drei Komponenten einen funktionellen Komplex bilden und RAC die Interaktion von Ssb1/2p mit der naszenten Polypeptidkette begünstigt, ist bislang jedoch nicht geklärt.

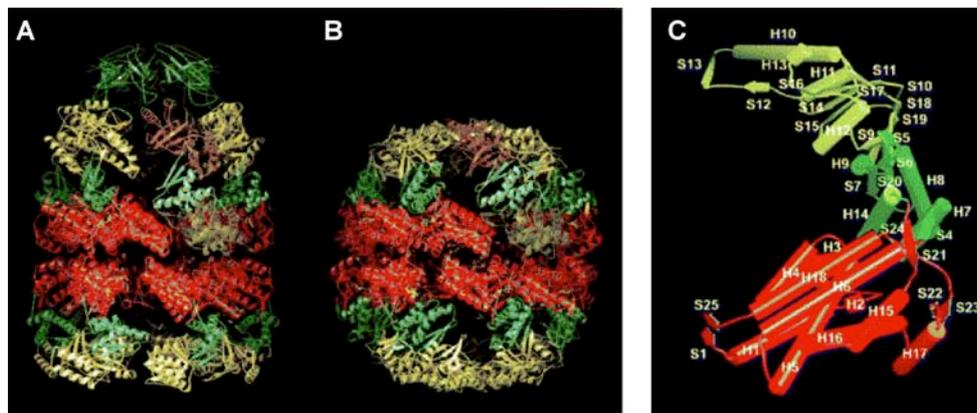
### 1.2.2. Chaperonine

Bei den Chaperoninen handelt es sich um eine essentielle, hoch konservierte Proteinfamilie (Fayet *et al.*, 1989), die in allen drei Reichen (Eubacteria, Archaea und Eukarya) vorkommt. Die multimeren, zylindrischen Komplexe mit einem Molekulargewicht von ca. 950 kDa sind aus zwei übereinander gelagerten Ringstrukturen aufgebaut. Jeder der beiden Ringe umschließt eine zentrale Höhle. Chaperonine zeichnen sich durch ihren einzigartigen Faltungsmechanismus aus, bei dem Substrate im Inneren der Faltungshöhle abgeschirmt von störenden Einflüssen einen Faltungszyklus durchlaufen (Martin *et al.*, 1993; Mayhew *et al.*, 1996; Leroux und Hartl, 2000).

Die Klasse der Chaperonine lässt sich in zwei Untergruppen teilen, die zwar strukturell verwandt sind, aber partiell starke Sequenzunterschiede aufweisen. Zur Gruppe I gehören Chaperonine der Eubacteria (GroEL in *E. coli*) und der eukaryotischen Organellen

(Cpn60 in Chloroplasten, Hsp60 oder Cpn60 in Mitochondrien). Mitglieder dieser Gruppe kooperieren mit einem Kofaktor der Hsp10-Familie (GroES in *E. coli*, Hsp10 oder Cpn10 in Mitochondrien und Chloroplasten). Durch die Bindung des Kofaktors an das Chaperonin ist das Substrat komplett in der Faltungshöhle eingeschlossen. Die Gruppe II umfasst Chaperonine der Archaea (Thermosom in *Thermoplasma acidophilum*) und des eukaryotischen Zytosols (TRiC, auch bekannt als CCT; siehe unten). Diese Chaperonine benötigen anders als Mitglieder der Gruppe I keinen Kofaktor, kooperieren aber mit anderen Chaperonen wie GimC/Prefoldin und Hsp70 (Näheres siehe 1.3.1.1. und 1.3.1.2.).

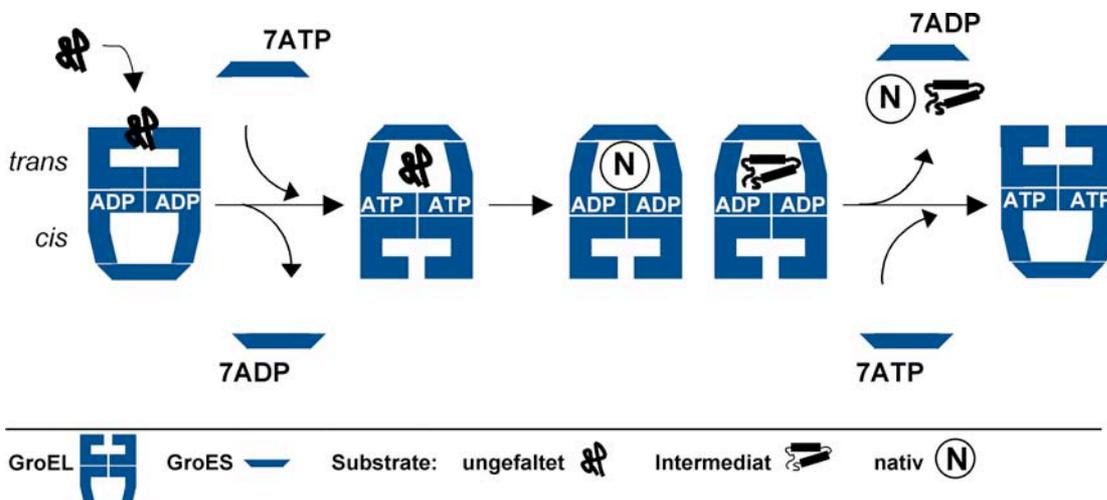
GroEL aus *E. coli* gilt als das am besten untersuchte Chaperonin. Bei diesem prokaryotischen Chaperonin handelt es sich um einen homo-oligomeren Komplex, in dem die beiden Ringe von je 7 Untereinheiten gebildet werden. Die monomeren, ca. 60 kDa großen Untereinheiten sind aus 3 Domänen aufgebaut. Bezogen auf ihre Position in der Doppel-Ringstruktur werden sie als äquatoriale, intermediäre oder apikale Domäne bezeichnet (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Allgemeine Struktur der Chaperonine.** (A) Seitenansicht des asymmetrischen GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> Komplexes (Xu *et al.*, 1997). Rot: äquatoriale Domäne, Grün: intermediäre Domäne, Gelb: apikale Domäne. (B) Seitenansicht der hexadekameren Thermosom-Struktur. (C) Thermosom-Untereinheit mit den 3 Domänen. Abbildung aus Ditzel *et al.*, 1998.

Die Substratbindung erfolgt über die hydrophoben Bereiche der apikalen Domänen. In einem phasenverschobenen Prozess kann Substrat immer nur von einem Ring aufgenommen werden (Fenton *et al.*, 1994; Hartl, 1996). Der Faltungszyklus beginnt mit der Substratanlagerung an die apikale Domäne des offenen Rings (*trans*-Ring; Abb. 1.4, siehe folgende Seite). Bindung von ATP an die äquatorialen Domänen seiner Untereinheiten führt zu drastischen Konformationsänderungen innerhalb des Rings, die eine Vergrößerung des Volumens der Faltungskammer und ein Verschieben der Substratbindestellen zur Folge haben (*cis*-Ring). Dies erlaubt einerseits die Anlagerung des Kofaktors GroES an die apikalen Domänen sowie den Transfer des Substrats ins Innere der hydrophilen Faltungskammer (Braig *et al.*, 1994; Roseman *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Bukau und Horwich, 1998). Durch die Anlagerung von GroES werden Substrate mit einem Molekulargewicht von bis zu 60 kDa vollständig in der Faltungskammer

eingeschlossen (Ellis, 2001; Mayhew und Hartl, 1996; Brinker *et al.*, 2001). Dieser so genannte „Anfinsen-Käfig“ begünstigt den Prozess der Substratfaltung in einer abgeschirmten Umgebung unbeeinflusst von Aggregation-auslösenden Faktoren (Anfinsen, 1973; Ellis, 1996). Allerdings konnte bislang noch nicht geklärt werden, ob GroEL nur durch das alleinige Bereitstellen eines Faltungskompartmentes passiv die Substratfaltung begünstigt. Ein anderes Model favorisiert die Hypothese, dass Konformationsänderungen innerhalb des Chaperonins partiell die Entfaltung des Substrats verursachen oder aber dessen Bindung an die apikalen Chaperonin-Bereiche beeinflussen, so dass es zu einer Neuorientierung des Substrats kommt (Todd *et al.*, 1996; Fenton und Horwich, 1997). Im Anschluss an die ATP-Hydrolyse dissoziiert GroES zusammen mit dem Substrat. Liegt das Protein zu diesem Zeitpunkt noch nicht in seiner nativen Form vor, kann nach wiederholter Bindung ein erneuter Faltungszyklus eingeleitet werden.



**Abb. 1.4: Schematisiertes Modell des GroEL/GroES Reaktionszyklus.**

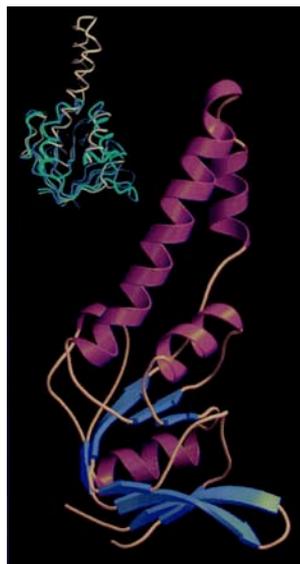
Ungefaltete Substrate binden an die apikalen Domänen von GroEL (*trans*-Ring). Bindung von ATP und GroES führt zu einer konformationellen Änderung des Substrat-bindenden Ringes (*cis*-Ring). Das ungefaltete Substrat geht in der Faltungskammer in seinen nativen Zustand (N) oder einen intermediären Faltungszustand über. Gleichzeitig erfolgt Hydrolyse von ATP zu ADP. An den gegenüberliegenden, *trans*-Ring bindet ATP. ADP löst sich vom *cis*-Ring, GroES dissoziiert und Substrat entweicht. Faltungsintermediate können einen erneuten Zyklus durchlaufen. Nach Hartl und Hayer-Hartl, 2002.

Unter normalen Bedingungen interagieren ungefähr 10-15% aller zytoplasmatischen Proteine mit GroEL (Ewalt *et al.*, 1997). Studien ergaben, dass ein hoher Anteil von GroEL-Substraten sich oftmals durch  $\beta\alpha$ -barrel Sekundärstrukturen auszeichnet, in denen hydrophobe  $\beta$ -Faltblätter von  $\alpha$ -Helices Tonnen- oder Sandwich-förmig umgeben sind (Houry *et al.*, 1999; Kerner *et al.*, 2005). Die Notwendigkeit der Chaperonin-vermittelten Faltung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Deletion von GroEL für die Zelle letal ist (Horwich *et al.*, 1997).

### 1.3. Das eukaryotische Chaperonin TRiC

Bei den Chaperoninen der Gruppe II handelt es sich um hetero-oligomere Komplexe. Sie bilden ebenfalls Zylinder aus zwei Ringen, jedoch bestehen die Ringe aus 8 oder 9 Untereinheiten. Chaperonine der Archaea beinhalten zwei oder drei verschiedene Untereinheiten, die eine 8- oder 9-fach symmetrische Anordnung im Ring erfahren. TRiC (*TCP-1 ring complex*; *TCP-1: tailless complex polypeptide 1*), auch bekannt als CCT (*chaperonin containing TCP-1*), ist das Chaperonin des eukaryotischen Zytosols und besteht aus 8 verschiedenen Untereinheiten (Tcp1-8p; jeweils 50-60 kDa) pro Ring (Kubota *et al.*, 1995). Die 8 zueinander homologen TRiC-Untereinheiten besitzen eine ca. 30%ige Übereinstimmung bezüglich ihrer Aminosäuresequenz. Während in allen untersuchten Organismen und Geweben jede der 8 verschiedenen TRiC-Untereinheiten von einem individuellen Gen kodiert wird, wurde im Hodengewebe von Säugetieren neben den 8 *TCP/CCT*-Genen ein zusätzliches Gen (*CCT $\zeta$ 2*) identifiziert. Das *CCT $\zeta$ 2*-Gen ist stark homolog zum *CCT $\zeta$* -Gen, welches in *S. cerevisiae* *TCP/CCT6* entspricht (Kubota *et al.*, 1995).

Die Lösung der Kristallstruktur des zu TRiC homologen Thermosom-Komplexes aus *T. acidophilum* ergab, dass die Domänen der einzelnen Untereinheiten eine ähnliche strukturelle Anordnung einnehmen wie in GroEL. Höhe und Durchmesser des Komplexes betragen 158 Å bzw. 164 Å (GroEL: 184 Å Höhe und 140 Å Durchmesser; Ditzel *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenzen der äquatorialen und intermediären Domänen sind in den Chaperoninen der Eubacteria, Archaea und Eukarya stark konserviert. Sequenzabweichungen finden sich dagegen vor allem im Bereich der apikalen Domäne, der die Substratinteraktion zugeschrieben wird. Bezeichnenderweise besitzen die Chaperonine der Gruppe II im apikalen Bereich  $\alpha$ -helikale Fortsätze (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Helikales Segment der apikalen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit des Thermosoms.** Links oben ist eine Übereinanderlagerung mit einer GroEL-Untereinheit (grün) gezeigt, die das Ausmaß der  $\alpha$ -helikalen Extension (gelb) verdeutlicht. Aus Klumpp *et al.*, 1997.

Das Schließen der Faltungskammer wird hier durch Rotation der apikalen Domänen im Uhrzeigersinn erreicht. Dabei bilden die  $\alpha$ -helikalen Fortsätze gemeinsam, ähnlich einer Irisblende, das Deckelsegment der Faltungskammer (Klumpp *et al.*, 1997; Ditzel *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2003).

Basierend auf der Kristallstruktur des Thermosoms wird angenommen, dass Substrate bei allen Gruppe II Chaperoninen ähnlich wie bei GroEL in der Faltungskammer eingeschlossen werden und dort ihre native Konformation in Abhängigkeit von ATP-Hydrolyse erlangen. Analog zu GroEL ist in Abwesenheit von ATP die Faltungskammer des Thermosoms offen (Ditzel *et al.*, 1998). Allerdings zeigte eine jüngste Studie mit TRiC, dass ATP-Bindung allein nicht zum Schließen der Faltungshöhle ausreicht; dieses wird erst durch ein Zwischenstadium während der ATP-Hydrolyse ausgelöst (Meyer *et al.*, 2003). Dissoziation des abgespaltenen gamma-Phosphats von ATP führt wieder zum Öffnen der Faltungshöhle und ermöglicht die Freisetzung des gefalteten Substrats (Spiess *et al.*, 2004). Bislang ist aber noch nicht genau geklärt, wie die Faltung des Substrats durch ATP-Hydrolyse stimuliert wird. Obwohl kein weiterer Faktor wie GroES in den Faltungszyklus eingreift, scheint TRiC nicht als symmetrischer Komplex zu operieren. Jüngste Daten sprechen dafür, dass beide TRiC-Ringe ähnlich wie bei GroEL negativ kooperieren und somit in unterschiedlichen Stadien (*trans* bzw. *cis*) der Nukleotidbindung vorliegen (Kafri *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003).

Welche Abschnitte im apikalen Bereich für die Substratbindung erforderlich sind, ist bislang noch nicht geklärt. Die unmittelbaren helikalen Extensionen scheinen hierfür nicht unbedingt erforderlich zu sein, da zumindest Deletionen dieser Bereiche beim Gruppe II Chaperonin des Archaeums *Thermococcus* sp. KS-1 die Substratbindung nicht beeinträchtigen (Iizuka *et al.*, 2004). Alternativ könnten zwei zu GroEL homologe, distal gelegene Bereiche der apikalen Domäne mit  $\alpha$ -helikaler Struktur die Substratbindung vermitteln. Schließlich werden als Substratbindungsstellen auch geladene und polare Aminosäuren diskutiert, die an der Innenseite im apikalen Bereich der Faltungshöhle lokalisiert und in orthologen Untereinheiten konserviert sind (Pappenberger *et al.*, 2002). Die einzelnen Hypothesen schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus. Angesichts der beachtlichen Sequenzunterschiede in den apikalen Domänen von Gruppe II Chaperoninen könnten die individuellen Untereinheiten durchaus unterschiedliche Bindungsmotive zur Verfügung stellen, die bei der Substrat-Bindung miteinander kooperieren (Spiess *et al.*, 2004). Die Diversität der potentiellen Bindungsmotive könnte aber auch dazu dienen, verschiedene Substrate mittels unterschiedlicher Untereinheiten spezifisch zu erkennen (Llorca *et al.*, 2000).

Die Abwesenheit eines GroES-ähnlichen Kofaktors lässt die Möglichkeit zu, dass Substrate nicht vollständig in die Faltungskammer gelangen müssen und stattdessen die Faltung von größeren Proteinen auf bestimmte Proteindomänen beschränkt ist (Frydman *et al.*, 1994; Ditzel *et al.*, 1998; Llorca *et al.*, 2001). Diese Annahme ist in Übereinstim-

mung mit dem Befund, dass verschiedene Proteine, deren Molekulargewicht die Größe von 100 kDa und damit die hypothetische Kapazität der Faltungshöhle überschreitet, mit TRiC assoziiert vorgefunden wurden (Thulasiraman *et al.*, 1999). Diese Hypothese würde auch der Beobachtung Rechnung tragen, dass TRiC im Gegensatz zu GroEL nicht nur post-translational, sondern auch ko-translational mit neu-synthetisierten Polypeptidketten interagiert (Ewalt *et al.*, 1997; Roobol und Carden, 1999; McCallum *et al.*, 2000).

### 1.3.1. Substrate von TRiC

Konditionale Mutanten der TRiC-Untereinheit *TCP1/CCT1* aus *S. cerevisiae* weisen schwere Zellteilungsdefekte auf (z.B. bezüglich der Knospung und Karyokinese) und sind hypersensitiv gegenüber anti-mitotischen Wirkstoffen wie Benomyl, welches die Mikrotubuli-Polymerisation inhibiert. Zusätzlich zeigen solche Mutanten genetische Interaktionen mit konditionalen Mutanten von Aktin- und Tubulin-kodierenden Genen (Ursic und Culbertson, 1991; Ursic *et al.*, 1994). Ähnliche Befunde wurden für Mutanten anderer TRiC-Untereinheiten kodierender Gene festgestellt (Chen *et al.*, 1994; Vinh und Drubin, 1994). Diese genetischen Daten legten nahe, dass TRiC eine Rolle in der *de novo* Synthese von Aktin und Tubulinen spielt. Biochemische Daten belegten schließlich, dass der Chaperonin-Komplex die Faltung von Aktin und Tubulinen vermittelt (Gao *et al.*, 1992; Frydman *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1992; Yaffe *et al.*, 1992).

Lange Zeit galt TRiC als ein spezialisiertes Chaperonin für Aktin und Tubulin (Lewis *et al.*, 1996; Stoldt *et al.*, 1996). Die Identifizierung anderer, weniger abundanter Substratproteine war durch die essentielle Bedeutung von TRiC für die Faltung von Aktin und Tubulinen besonders erschwert. Berechnungen zufolge beanspruchen diese Zytoskelettproteine ca. 50-60% der gesamten Kapazität von TRiC (Siegiers *et al.*, 2003). Anhand von *Pulse Chase* Experimenten mit Säugetierzellen konnte aber gezeigt werden, dass TRiC auch mit zahlreichen anderen Proteinen transient interagiert. Dabei wurde für ca. 12% aller neu-synthetisierten Proteine mit einem Molekulargewicht von 30-120 kDa eine Assoziation mit TRiC gezeigt (Thulasiraman *et al.*, 1999).

Zu dem erweiterten Substratspektrum von TRiC gehören beispielsweise das bei der retinalen Phototransduktion involvierte  $G\alpha$ -Transduzin (Farr *et al.*, 1997), der Zellzyklus-abhängige Kinaseaktivator Zyklin E (Won *et al.*, 1998), das virale Protein EBNA 1 (Kashuba *et al.*, 1999), das Motorprotein Myosin (Srikakulam *et al.*, 1999) oder das Tumorsuppressor-Protein VHL (Feldman *et al.*, 1999). Kürzlich konnten anhand von groß angelegten Proteom-Studien in Kombination mit Massenspektrometrie weitere TRiC-assoziierte Proteine identifiziert werden (Ho *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002). Interessanterweise zeichnen sich viele dieser Proteine durch so genannte *WD-repeat* Motive aus. Biochemische und genetische Analysen belegten für einige dieser Proteine, dass es sich hierbei tatsächlich um Faltungssubstrate von TRiC handelt (Siegiers *et al.*, 2003; Camasses *et al.*, 2003; s. Kapitel 1.3.1.2.). Damit war es zum ersten Mal möglich TRiC-Substrate

einer strukturellen Klasse zuzuordnen. Bei *WD-repeat* Motiven handelt es sich um schwach-konservierte, sich wiederholende Sequenzen von 40-60 Aminosäuren, die mit den Aminosäureresten Tryptophan-Aspartat (WD) enden. Mehrere dieser Sequenz-Wiederholungen bilden eine stark konservierte, zirkuläre Struktur, die auch als  $\beta$ -Propeller bezeichnet wird. Jedes einzelne Propeller-Blatt wird dabei von kurzen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen gebildet. *WD-repeat* Motive werden in Proteinen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen gefunden (s. auch Kapitel 1.3.1.2.).



**Abb. 1.6:  $\beta$ -Propeller Struktur der  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins Transducin.** Die  $\beta$ -Untereinheit von Transducin enthält sieben *WD-repeat* Motive (grün), die jeweils in antiparallelen Faltblattstrukturen angeordnet sind und zusammen die Propellerstruktur ausbilden. Nach Sondek *et al.*, 1996.

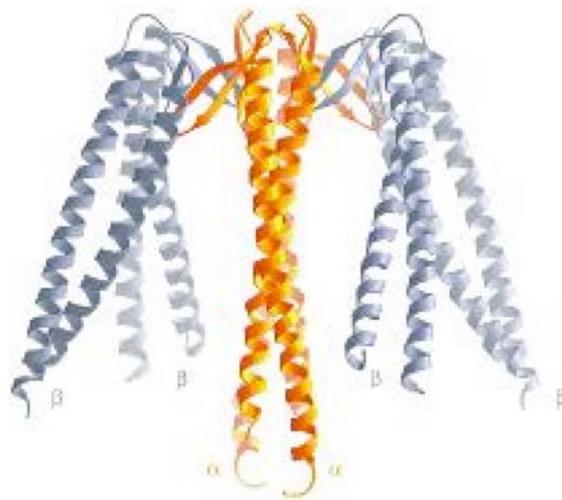
Interessanterweise zeichnen sich auch viele andere TRiC-Substrate durch einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus. Da die Faltung dieser Sekundärstruktur im Vergleich zur  $\alpha$ -Helix-Ausbildung mehr Zeit in Anspruch nimmt, wird vermutet, dass dieses Strukturmotiv bei der Substratspezifität von TRiC eine Rolle spielen könnte (Spiess und Frydman, 2003).

### 1.3.1.1. GimC und die Faltung von Aktin und Tubulinen

Für die effiziente Faltung von Aktin und Tubulinen konnte gezeigt werden, dass TRiC auf eine funktionelle Kooperation mit dem Ko-Chaperon GimC/Prefoldin angewiesen ist. Der hetero-oligomere Komplex aus *S. cerevisiae* wird als GimC (Geissler *et al.*, 1998; Siegers *et al.*, 1999) und dessen Homologe in Archaea und höheren Eukaryoten als Prefoldin bezeichnet (Vainberg *et al.*, 1998). GimC/Prefoldin wird aus 6 konservierten Untereinheiten gebildet. Während der eukaryotische Komplex von 6 verschiedenen Genen (*GIM1-6* bzw. *PFD1-6*) kodiert wird, besteht der Komplex der Archaea aus nur zwei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Sequenzvergleiche ordnen die GimC-Untereinheiten Gim2p und

Gim5p den  $\alpha$ -Untereinheiten des Komplexes aus Archaea zu, während Gim1p, Gim3p, Gim4p und Gim6p den  $\beta$ -Untereinheiten entsprechen.

Die Kristallstruktur von Prefoldin aus Archaea (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) zeigt, dass die zentralen Bereiche der einzelnen Untereinheiten zusammen eine Plattform bilden, von der sich die N- und C-terminalen Enden tentakelförmig fortsetzen (Siegert *et al.*, 2000). Die N- und C-terminalen Regionen der 6 Untereinheiten zeichnen sich durch ihre  $\alpha$ -helikalen Strukturen aus, die als „spiralisierte Spiralen“ (*coiled coils*) die Tentakel bilden. Die Enden dieser Tentakel sind reich an hydrophoben Aminosäuren und werden für die Substratinteraktion verantwortlich gemacht (Abb. 1.7; Siegert *et al.*, 2000).

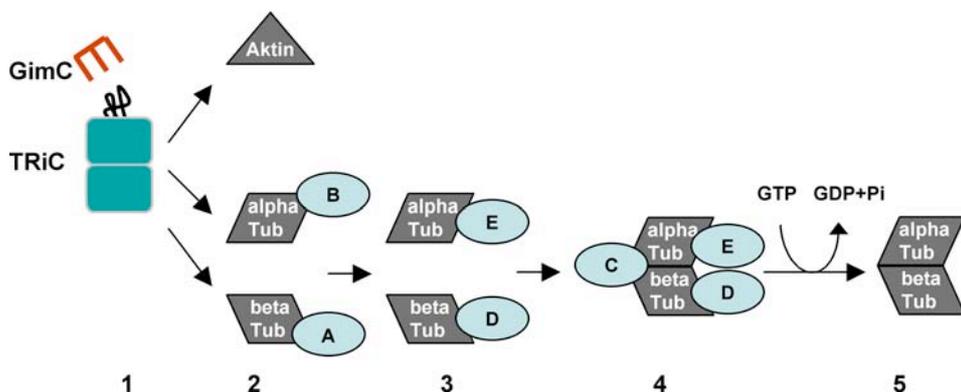


**Abb. 1.7: Kristallstruktur von Prefoldin aus *M. thermoautotrophicum*.** Seitenansicht von Prefoldin. Zwei zentrale  $\alpha$ -Untereinheiten (orange) und 4  $\beta$ -Untereinheiten (blau). Aus Siegert *et al.*, 2000.

In *S. cerevisiae* wurde GimC im Rahmen genetischer Studien identifiziert. Deletionen von *GIM*-Genen sind synthetisch letal mit einer konditionalen Mutante von  $\gamma$ -Tubulin und weisen auf eine Funktion des Gim-Komplexes (*genes involved in microtubule biogenesis complex*) in der Mikrotubuli-Biogenese hin. Darüber hinaus sind *gim*-Deletionsmutanten hypersensitiv gegenüber Latrunculin-A, welches die Depolymerisation von Aktin-Filamenten bewirkt (Geissler *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass Mutanten von GimC phänotypisch denen von TRiC ähneln, legte eine Funktion des Gim-Komplexes in der TRiC-vermittelten Faltung nahe. Funktionelle Studien *in vitro* und *in vivo* konnten schließlich belegen, dass GimC/Prefoldin und TRiC während der Faltung von Aktin und Tubulinen eng kooperieren (Vainberg *et al.*, 1998; Siegers *et al.*, 1999). Insbesondere zeigen *gim*-Deletionsmutanten eine niedrigere, TRiC-vermittelte Aktinfaltungsrate, die einhergeht mit einer erhöhten Menge missgefalteten Aktins (Siegers *et al.*, 1999). GimC selber zeigt keine ATPase-Aktivität. Die funktionelle Kooperation von TRiC mit GimC ist aber nicht mit dem Zusam-

Beispiel von GroEL/GroES vergleichbar. Im Gegensatz zu GroES bindet GimC ko- und post-translational ungefaltete Substrate wie Aktin und Tubuline. Demnach nimmt GimC im Vergleich zu GroES eine aktivere Rolle in der Chaperon-vermittelten Proteinfaltung ein. Allerdings ist GimC nur unter bestimmten Bedingungen für das Wachstum von Zellen essentiell; so sind *gim*-Deletionsmutanten kältesensitiv und mit konditionalen Mutanten von TRiC synthetisch letal. Dagegen ist TRiC unter allen Bedingungen lebensnotwendig.

Während TRiC und GimC für das Erlangen der nativen Konformation von Aktin ausreichen, benötigen alpha- und beta-Tubulin für ihre Dimerisierung zusätzliche Kofaktoren. Viele dieser Faktoren konnten bereits identifiziert werden, wenn auch ihre genaue molekulare Funktion teilweise noch ungeklärt ist. In Säugetieren bindet im Anschluss an die TRiC/Prefoldin(GimC)-vermittelte Faltung der Tubulin-Kofaktor B an alpha-Tubulin und der Kofaktor A an beta-Tubulin. Während des Dimersierungsprozesses werden diese Kofaktoren von Kofaktor E bzw. D ersetzt. Schließlich formiert sich ein so genannter „Super-Komplex“, der sich aus alpha- und beta-Tubulin, Kofaktor E, D und dem weiteren Kofaktor C zusammensetzt. Die Freisetzung des alpha-/beta-Tubulin Heterodimers wird unter GTP-Hydrolyse katalysiert (Fontalba *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 1996).



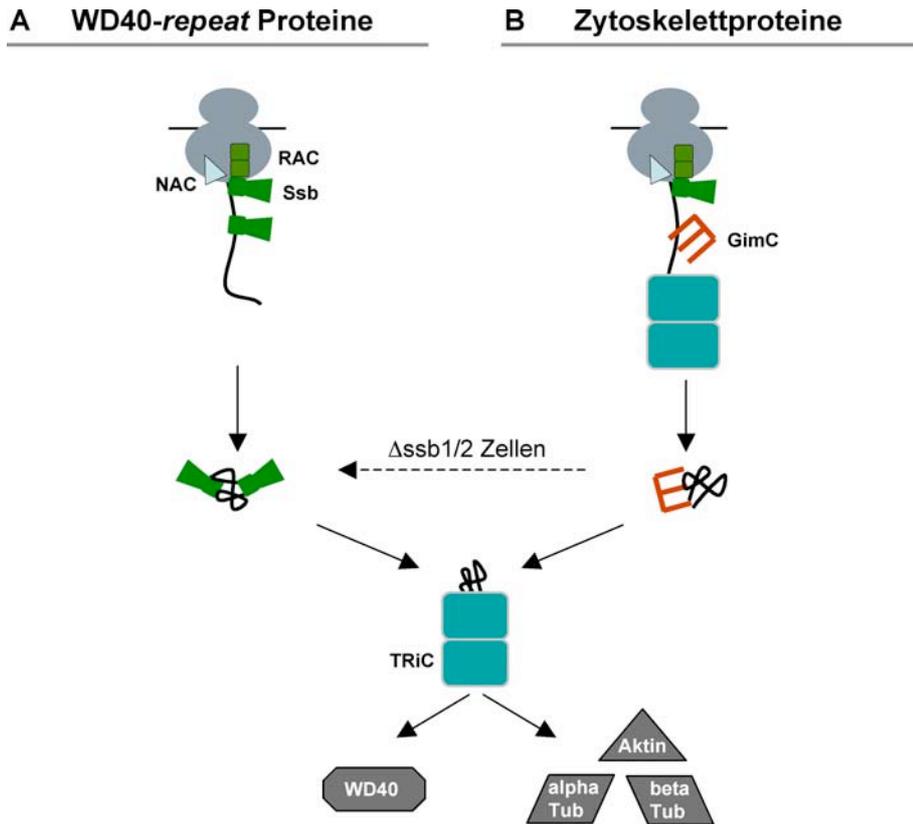
**Abb. 1.8: Schematisiertes Modell für die Faltung von Aktin und Tubulinen in Säugetieren.** (1) Aktin erreicht allein durch TRiC/Prefoldin(GimC)-vermittelte Faltung seine native Struktur. Alpha- und beta-Tubulin benötigen zusätzliche Unterstützung von Kofaktoren. (2) Kofaktor B (*S. cerevisiae*: Alf1p) bindet an alpha-Tubulin, Kofaktor A (*S. cerevisiae*: Rbl2p) bindet an beta-Tubulin. (3+4) Im Folgenden bindet Kofaktor E (*S. cerevisiae*: Pac2p) alpha-Tubulin und Kofaktor D (*S. cerevisiae*: Cin1p) beta-Tubulin. Zusammen mit Kofaktor C (*S. cerevisiae*: Cin2p) bildet sich ein „Super-Komplex“. (5) Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren alpha- und beta-Tubulin als Heterodimer von den Kofaktoren. Nach Tian *et al.*, 1996 und 1997.

Für *S. cerevisiae* wurden homologe Proteine für die einzelnen Kofaktoren aus Säugetieren identifiziert, die auch an alpha- bzw. beta-Tubulin binden (Rbl2p, Alf1p, Cin2p, Cin1p und Pac2p für Kofaktor A, B, C, D bzw. E; Lopez-Fanarraga *et al.*, 2001). Allerdings ist bislang nicht vollständig geklärt, welche genaue Rolle Kofaktoren bei der Dimerisierung der Tubuline spielen, da sie in *S. cerevisiae* im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten *in vivo* nicht essentiell sind. Zusätzlich könnten aber auch weitere, redundante Proteine an der Dimerisierungsreaktion beteiligt sein, die bislang noch nicht identifiziert worden sind.

### 1.3.1.2. Ssb und die Faltung von Proteinen mit *WD-repeat* Motiv

Kürzlich wurde für einige Protein mit *WD-repeat* Motiv, wie z.B. Cdc20p, Cdc55p oder Pex7p, gezeigt, dass ihre Faltung durch TRiC vermittelt wird (Siegers *et al.*, 2003; Camasses *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* wurden über 90 Proteine mit *WD-repeats* identifiziert, was mehr als 1% des Hefegenoms entspricht (Valpuesta *et al.*, 2002). Die meisten dieser Proteine sind Bestandteile hetero-oligomerer Protein-Komplexe, und die komplexen Faltungsanforderungen dieser Proteine könnten demnach die Notwendigkeit von TRiC begründen. TRiC kooperiert bei der Faltung von *WD-repeat* Proteinen nicht mit GimC sondern mit Chaperonen der Hsp70 Ssb1/2p-Unterklasse. Dabei scheint Ssb1/2p ko- und post-translational mit der Polypeptidkette zu interagieren, bis die Faltung durch die Beteiligung von TRiC abgeschlossen wird (Siegers *et al.*, 2003). Interessanterweise kann GimC die Funktion von Ssb1/2p in einem *ssb1/ssb2* Deletionsstamm partiell kompensieren. Umgekehrt kann Ssb1/2p aber nicht die Rolle von GimC für die Faltung von Zytoskelettproteine übernehmen. Eine kombinierte Deletion der *GIM1-6*- und *SSB1/2*-Gene ist jedoch für die Zelle letal und deutet daraufhin, dass *in vivo* für eine effiziente Faltung TRiC allein nicht ausreichend ist (Siegers *et al.*, 2003).

Proteine mit *WD-repeats* existieren nicht im Reich der Eubacteria und Archaea (Smith *et al.*, 1999). Das Auftreten von *WD-repeat* Proteinen und die Entwicklung eines komplexen Zytoskelettsystems in Eukaryoten korreliert mit der Heterogenität von TRiC und lässt die Vermutung zu, dass die Diversität der einzelnen 8 Untereinheiten der Komplexität und Spezifität der verschiedenen Substrate von TRiC Rechnung trägt. So kann GroEL zwar ungefaltete TRiC-Substrate binden, dennoch ist es nicht in der Lage, deren Faltung zu bewirken (Tian *et al.*, 1995). Ferner wurde aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen von TRiC in Assoziation mit nicht-nativem Aktin bzw. Tubulin die Hypothese aufgestellt, dass bestimmte Untereinheiten präferenziell bestimmte Substratproteine binden (Llorca *et al.*, 1999; Llorca *et al.*, 2000; Martín-Benito *et al.*, 2002; Simons *et al.*, 2004). Inwieweit die einzelnen Chaperon-Untereinheiten eine unterschiedliche Rolle bei der Faltung verschiedener Substrate spielen, ist bislang jedoch noch weitgehend unverstanden.



**Abb. 1.9: Chaperon-vermittelte Faltung von Proteinen mit *WD-repeats* sowie Aktin und Tubulinen in *S. cerevisiae*.** (A) Faltung von Proteinen mit *WD-repeats*. RAC rekrutiert vermutlich Ssb zum Ribosom (Craig *et al.*, 2001). Ssb kooperiert mit TRiC während der Faltung von Proteinen mit *WD-repeats*. Inwieweit TRiC auch ko-tranlational an die Polypeptidkette bindet, ist noch nicht eindeutig geklärt. (B) Faltung von Aktin und Tubulinen durch GimC und TRiC (ko- und post-translationale Chaperon-vermittelte Faltung). GimC unterstützt TRiC in der Faltung von Proteinen mit *WD-repeats* in Abwesenheit von Ssb. Nach Siegers *et al.*, 2003.

### 1.3.3. Krankheiten assoziiert mit Proteinmissfaltungen von TRiC-Substraten

Zahlreiche humane Krankheiten werden mittlerweile als eine direkte oder indirekte Konsequenz unerwünschter Faltungsreaktionen betrachtet, wie sie unter anderem bei neurodegenerativen Krankheiten auftreten. Verschiedene zytosolische Chaperone wurden in Proteinaggregaten vorgefunden (DeBurman *et al.*, 1997; Cummings *et al.*, 1998), die als Auslöser einiger dieser Erkrankungen diskutiert werden. Im Fall der Alzheimer Erkrankung wurde über Aggregationen von Zytoskelettproteinen berichtet, und für Patienten konnte *post mortem* eine erniedrigte zelluläre Menge der zeta-Untereinheit von TRiC (Tcp6p) festgestellt werden (Schuller *et al.*, 2001). Daneben wird auch eine beeinträchtigte Funktion von TRiC bei vererbbaaren sensorischen Neuropathien (*hereditary sensory neuropathies*, HSN) vermutet, da in einem Tiermodell die Krankheit u.a. durch eine Punktmutation in *TCP4/CCT4* ausgelöst wird (Lee *et al.*, 2003).

Auch Tumor-Erkrankungen lassen sich in einen Zusammenhang mit Defekten in der Proteinfaltung bringen. Bei dem TRiC Substrat VHL (von Hippel-Lindau) handelt es

sich um ein Tumorsuppressor Protein (Feldman *et al.*, 1999; Melville *et al.*, 2003). Mutationen im *VHL* Gen (*loss-of-function mutations*) führen zu Tumoren im Nierengewebe, der Nebennierenrinde und zentralen Nervensystem. Einige dieser Mutationen beeinträchtigen direkt die Faltung und Assemblierung von VHL in einen funktionellen Multiproteinkomplex. Bezeichnender Weise werden diese Abschnitte im VHL Protein, die von Tumor-auslösenden Mutationen betroffen sind, auch für die Assoziation von VHL mit TRiC benötigt (Feldman *et al.*, 2003). Folglich kann der Ausfall der TRiC-vermittelten Faltung bzw. Komplexassemblierung von VHL direkt zu Tumorentstehungen führen.

## 1.4. Ziel der Arbeit

Zwei wesentliche Aspekte wurden innerhalb dieser Arbeit verfolgt: Die Entwicklung eines Reinigungsprotokoll für TRiC aus *S. cerevisiae* sowie die funktionelle Analyse des gereinigten Chaperonin-Komplexes in einem isolierten System mittels *in vitro* Faltungsstudien mit bekannten Substraten (Aktin, Tubuline). Darüber hinaus wurden die hier entwickelten *in vitro* Faltungsexperimente auch zur Substratvalidierung bislang weniger gut charakterisierter Substrate der *WD-repeat* Proteinklasse herangezogen.

Bislang wurde TRiC entweder aus Säugetierzellen oder Geweben, in dem das Chaperonin in großen Mengen vorkommt (z.B. Rinderhoden), gereinigt. Diese Systeme erlauben jedoch kaum den Einsatz genetischer Methoden wie z.B. die Verwendung von TRiC-Mutanten, mit deren Hilfe sich gezielt einzelne Bereiche des Chaperonins untersuchen lassen. Dagegen zeichnet sich Hefe als detailliert charakterisierter und vor allem leicht genetisch manipulierbarer Modellorganismus aus. Im Vergleich zu Rinderhoden kommt TRiC allerdings in Hefe in geringeren zellulären Mengen vor, was die Entwicklung einer äußerst effizienten Reinigungsstrategie notwendig machte.

Um den Komplex mittels funktioneller Studien *in vitro* untersuchen zu können, wurde ein prokaryotisches *in vitro* Transkriptions-/Translations-System gewählt, in dem keine eukaryotischen Chaperone vorkommen. Ziel war es, Substrate von TRiC mittels dieses *in vitro* Systems zu synthetisieren und deren *de novo* Faltung in Gegenwart von gereinigtem TRiC sowie anderer, gereinigter eukaryotischer Chaperone (GimC, Ssb1p) zu untersuchen. Hierfür war es zusätzlich erforderlich, geeignete Methoden zur Faltungsanalyse der verschiedenen Substrate von TRiC zu entwickeln.

Schließlich wurde die TRiC-vermittelte Faltung von beta-Tubulin auch *in vivo* analysiert. In Anlehnung an Experimente mit Aktin wurde hierzu eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe sich die Faltungskinetik von beta-Tubulin bestimmen lässt.

---

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Enzyme)

Chemikalien werden mit dem Reinheitsgrad *p.a.* (*pro analysis grade*) von Fluka (Deisenhofen, BRD), Merck (Darmstadt, BRD), Roche (Basel, Schweiz) und Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD) bezogen. Bei allen anderen Reagenzien wird die Bezugsfirma direkt bei der angewendeten Methode angegeben. Restriktionsenzyme werden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, BRD) oder Roche bezogen. Radiochemikalien stammen von Amersham Bioscience (Freiburg, BRD). Komponenten für die Herstellung von Kulturmedien stammen von Difco (Heidelberg, BRD).

#### 2.1.2. Geräte

Amersham Bioscience (Freiburg, BRD)	FPLC-System, SMART-System, Säulen
Avestin (Ottawa, Kanada)	High Pressure Homogenizer
Beckman (München, BRD)	Zentrifugen: Avanti J-20, J6 MI, LE-80K
	UV-VIS Spektralphotometer DU640
Bender & Hobein (Zürich, Schweiz)	Vortex
Biometra (Göttingen, BRD)	PCR-Apparatur
BioRad (Hercules, USA)	Gelelektrophorese System für DNA und Proteingele
Bioengineering (Wald, Schweiz)	200 l Fermenter
Biospec (Bartlesville, USA)	Bead Beater
Eppendorf (Hamburg, BRD)	Tisch-Zentrifugen, Thermomixer
Fuji (Stamford, USA)	Phosphorimager Fuji Film FLA2000; LAS-3000 <i>Luminescent Image Analyser</i>
Heraeus (Hanau, BRD)	Incubator (Inkubator)
Lauda (Königshofen, BRD)	Wasserbad
Life Science (Freiburg, BRD)	Geltrockner SGD2000
Kodak (Stuttgart, BRD)	Filmentwickler X-Omat
Max-Planck-Institut, Zentralwerkstatt (München, BRD)	Säulen
Mettler-Waagen (Gießen, BRD)	Elektronischen Feinwaage AE160, Laborwaage Toledo
Misonix Inc. (New York, USA)	Sonicator Ultrasonic Processor XL (Sonifizierer)
New Brunswick Scientific (Nörttingen, BRD)	Innova 4430 Incubator Shaker (Schüttler)
Padenbergl (Lahr/Baden, BRD)	Durchflusszentrifuge
Rainin (Woburn, USA)	Gilson Pipetten
Savant (Holbrook, USA)	Geltrockner SGD300
Thermoquest (Egelsbach, BRD)	Forma Science, Orbital Shaker (Schüttler)

#### 2.1.3. Lösungen und Puffer

##### Allgemeine Puffer:

1 x PBS	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,7
50 x TAE	2 M Tris, 64 mM EDTA, pH 7,7 mit Eisessig eingestellt
10 x TBS	0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,6 mit HCl eingestellt

##### Probenpuffer für Proteingele:

Laemmli-Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl pH6,8, 2% (v/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 0,0025% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
----------------------	--

HU-Puffer	200 mM Tris/HCl pH6,8, 8 M Harnstoff, 5% (v/v) SDS, 0,1 mM EDTA, 0,0025% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Nativ-Gel Probenpuffer	50 mM Bis-Tris pH 7, 5% (w/v) Glycerin, 2 mM DTT, 15 mM CDTA pH8, 0,025% (w/v) Bromphenolblau

**Probenpuffer für Agarosegele:**

Ladepuffer	500 $\mu$ l 15% (w/v) Glycerin + 15 $\mu$ l 6x Auftragspuffer (Fermentas, St.Leon-Rot/BRD)
------------	--

**Protease-Inhibitoren für Hefelysat:**

ALATI-Stocklösung	4 mM Antipain, 4 mM Leupeptin, 0,4 mM Aprotinin, 0,12 mM Trypsin-Inhibitor in H <sub>2</sub> O (Roche, Sigma); Stocklösung wird 1:400 verdünnt eingesetzt.
Complete EDTA free	Protease-Inhibitoren Cocktail zur Inhibierung von Serin- und Cystein-Proteasen (Roche); 1 Tablette/50 ml Puffer
PC-Stocklösung	0,4 M Pepstatin, 10 mM Chymostatin in DMSO gelöst (Roche); 1:1000 verdünnen

**Protease-Inhibitoren für *E. coli* Lysat:**

PefablocSC	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonyl fluorid hydrochlorid (Roche); Stocklösung: 200 mg/ml in H <sub>2</sub> O, davon werden 1/1000 verdünnt eingesetzt.
------------	--

**2.1.4. Kultivierungsmedien****2.1.4.1. *Escherichia coli***

TY-Medium 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl

TY-Platten 20 g/l Bacto-Agar, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl

Gegebenenfalls wird nach dem Autoklavieren ein Antibiotikum als Selektionsmittel zum Medium gegeben (Ampizillin, 100  $\mu$ g/ml; Kanamycin, 50  $\mu$ g/ml; Chloramphenicol, 20  $\mu$ g/ml).

Minimal-Medium (M9ZB-Medium) 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g/l Casein-Hydrolysat, 5 g/l NaCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, 30  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (1 M Stocklösung), 400  $\mu$ l Glukose (20% Stocklösung)

Minimal-Medium (für KC8-Zellen) 75,2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, ad 1 l H<sub>2</sub>O  
3 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M Stocklösung), 20 ml Glukose (20% Stocklösung), 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (1 M Stocklösung), 1 ml Ampizillin, 1:500 verdünnt Thiamin HCl (5 mg/ml Stocklösung), 100 ml Aminosäuremix (je 2 g/100 ml: Ala, Asn, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val), bei Bedarf je 0,12 g His, Leu, Trp od Ura zufügen.

SOC-Medium 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Trypton, 20 g/l Glukose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl

**2.1.4.2. *Saccharomyces cerevisiae***

YPD-Medium 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Glukose

YPD-Platten 20 g/l Bacto-Agar, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Glukose

G418-Platten s. YPD-Platten; nach Autoklavieren Zugabe von 200 mg/l Genetizin (G418; sterilfiltr.)

SC-Medium 6,7 g/l Bacto-Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/l C-Quelle (z.B. Glukose, s.u.), 2 g/l *Drop out* Mix

SC-Platten a) 20 g Bacto-Agar ad 500 ml H<sub>2</sub>O

b) 6,7 g Bacto-Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g C-Quelle (z.B. Glukose, s.u.), 2 g *Drop out* Mix, ad 500 ml H<sub>2</sub>O

a) und b) werden erst nach dem autoklavieren gemischt, um aufgrund des niedrigen pH-Wertes die Hydrolyse des Agars zu verhindern.

5'-FOA-Platten a) 1,34 g Bacto-Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 4 g Glukose, 0,4 g *Drop out* Mix, 10 mg Urazil, 0,2 g 5-FOA, ad 100 ml H<sub>2</sub>O

b) 4 g Bacto-Agar ad mit 100 ml H<sub>2</sub>O

a) und b) werden erst nach dem autoklavieren gemischt

Der *Drop out* Mix ist eine Mischung von Substanzen, die für das Wachstum von Hefezellen auf Selektionsmedium notwendig sind. Hierbei wird auf Prototrophie, d.h. die Fähigkeit zur Biosynthese einer für das Wachstum nötigen Substanz, selektiert, die durch Expression eines entsprechenden chromosomal- oder Plasmid-kodierten Gens vermittelt wird. In Abwesenheit dieses Gens ist der Hefestamm auxotroph für die Substanz und kann dementsprechend auf Selektionsmedium nicht wachsen. Die Wildtypstämme YPH499 und YPH500 sind unter anderem auxotroph für Adenin, weshalb dem Medium Adenin stets aus einer 5 mg/ml Stammlösung 1:50 zugegeben wird.

Die Zusammensetzung des *Drop out* Mix variiert je nach Auxotrophie und gewünschter Selektion. Für die Herstellung eines SC-Ade/-Cys/-His/-Leu/-Met/-Lys/-Trp/-Ura *Drop out* Mixes werden folgende Substanzen in den angegebenen Mengen über Nacht gemischt:

20 g	Alanin	20 g	Isoleuzin
20 g	Arginin	2 g	p-Aminobenzoesäure
20 g	Asparagin	20 g	Phenylalanin
20 g	Asparaginsäure	20 g	Prolin
20 g	Glutamin	20 g	Serin
20 g	Glutaminsäure	20 g	Threonin
20 g	Glyzin	20 g	Tyrosin
20 g	myo-Inositol	20 g	Valin

Je nach benötigtem Selektionsmedium werden 34,2 g des Mixes mit folgenden Substanzen versetzt und über Nacht durchmischt.

0,5 g	Adenin	4 g	Leuzin
2 g	Cystein	2 g	Methionin
2 g	Lysin	2 g	Urazil
2 g	Histidin	2 g	Tryptophan

Anstelle von Glukose werden SC-Medien auch mit 2% Raffinose, 2% Raffinose + 2% Galaktose, 2% Glukose + 2% Galaktose hergestellt, falls dies für die Versuche erforderlich ist. Raffinose und Galaktose werden jeweils als 20%ige Lösungen sterilfiltriert und zu dem autoklavierten Medium gegeben.

Für die Überproduktion von TRiC wird der *TCP/CCT*-Überexpressionsstamm in SC-Leu/-His/-Trp/-Ura Flüssigmedium mit gespaltener Laktose (Endkonz. 2%) kultiviert. 400 g Laktose (Merck, Darmstadt/BRD) werden in 1 Liter H<sub>2</sub>O gelöst und in einer 1 Liter Schott-Flasche autoklaviert. Nach Abkühlung der 40%igen Laktose-Lösung werden 100 mg  $\beta$ -Galaktosidase (*Aspergillus oryzae*; Merck, Darmstadt/BRD) zugegeben. Zur Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose wird die Lösung für ca. 1 Woche bei mind. 37°C (Optimaltemperatur für enzymatische Aktivität: 50°C) inkubiert. Für eine 200 l Fermenter-Kultur werden 20 l 40%ige Laktose gespalten.

## 2.1.5. Stämme

### 2.1.5.1. *E. coli*

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	<i>E. coli B F- dcm ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> , <i>m<sub>B</sub></i> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [ <i>plysSCam<sup>R</sup></i> ] <i>supE supF</i>	Stratagene
BL21(DE3)/ codon plus RIL	<i>E. coli B F- dcm ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> , <i>m<sub>B</sub></i> ) <i>Tet<sup>R</sup> gal</i> $\lambda$ (DE3) [ <i>argU ileY, leuW Cam<sup>R</sup></i> ] <i>supE supF</i>	Stratagene
GM2163	F <sup>-</sup> <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dam-6 hisG4 rfbD1 rspL136 dam13::Tn9(Cam<sup>R</sup>)xyIA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	New England BioLabs
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5(kan<sup>R</sup>), hisB463, lacDX74, strA, galU, K</i>	Stratagene

### 2.1.5.2. *S. cerevisiae*

Hefestamm	Genotyp	Herkunft
YPH499	Mata <i>ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1</i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1	Sikorski und Hieter, 1989
YPH500	Mata $\alpha$ <i>ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1</i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1	"
YPH501	Mata $\alpha$ <i>ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1</i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1	"
CHY1	Mata <i>TCP1::TCP1-3HA-HIS3MX6</i>	Claudia Hopp
KSY321	Mata pRS316- <i>TCP1</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 CDC55::CDC55-3HA-kanMX6</i>	Katja Siegers
KSY323	Mata pRS316- <i>TCP1</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 PEX7::PEX7-3HA-kanMX6</i>	"
KSY339	Mata pCMS38- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 CDC55::CDC55-3HA-kanMX6</i>	"
KSY340	Mata pCMS38- <i>tcp1-3</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 CDC55::CDC55-3HA-kanMX6</i>	"
KSY348	Mata pCMS38- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 PEX7::PEX7-3HA-kanMX6</i>	"
KSY349	Mata pCMS38- <i>tcp1-3</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6 PEX7::PEX7-3HA-kanMX6</i>	"
KSY355	Mata <i>ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1</i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1 $\Delta$ <i>reg1::loxP</i>	"
KSY356	Mata $\alpha$ <i>ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1</i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1 $\Delta$ <i>reg1::loxP</i>	"
KSY365	Mata pCMS38- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1::HIS3MX6</i> $\Delta$ <i>ssb1::loxP</i> $\Delta$ <i>ssb2::loxP</i> <i>PEX7::PEX7-3HA-kanMX6</i>	"
KSY436	KSY355 <i>TCP1::TCP1-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	"
KSY437	KSY356 <i>TCP1::TCP1-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	"
KSY439	KSY355 <i>TCP5::TCP5-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	"
KSY440	KSY356 <i>TCP5::TCP5-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	"
RC757	Mata $\alpha$ <i>his6 met1 sst2-1 cyh2 can1</i>	Chan, 1982
RH448	Mata <i>leu2 his4 lys2 ura3 bar1</i>	Manney, 1983
UBY3	Mata <i>TCP2::TCP2-3HA-HIS3MX6</i>	diese Arbeit
UBY4	Mata <i>TCP4::TCP4-3HA-HIS3MX6</i>	"
UBY5	Mata <i>TCP5::TCP5-3HA-HIS3MX6</i>	"
UBY6	Mata <i>TCP3::TCP3-3HA-HIS3MX6</i>	"
UBY7	Mata <i>TCP6::TCP6-3MYC-HIS3MX6</i>	"
UBY8	Mata <i>TCP7::TCP7-3MYC-HIS3MX6</i>	"
UBY9	Mata <i>TCP8::TCP8-3MYC-HIS3MX6</i>	"
UBY10	Mata $\alpha$ <i>TCP6::TCP6-3HA-kanMX6</i>	"
UBY11	Mata $\alpha$ <i>TCP7::TCP7-3HA-kanMX6</i>	"
UBY19	Mata <i>TCP6::TCP6-9MYC-kiTRP1</i>	"
UBY20	Mata <i>TCP7::TCP7-9MYC-kiTRP1</i>	"
UBY28	Mata <i>TCP3::TCP3-6HA-kiTRP1</i>	"
UBY29	Mata $\alpha$ <i>TCP3::TCP3-6HA-kiTRP1</i>	"
UBY30	Mata <i>TCP3::TCP3-9MYC-kiTRP1</i>	"
UBY31	Mata $\alpha$ <i>TCP3::TCP3-9MYC-kiTRP1</i>	"
UBY32	Mata <i>TCP8::TCP8-6HA-kiTRP1</i>	"

UBY33	Mata <i>TCP8::TCP8-9MYC-kITRP1</i>	“
UBY34	Mata <i>TCP1::TCP1-TEV-linker-6His-HIS3MX6</i>	“
UBY35	Mata <i>TCP1::TCP1-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	“
UBY36	Mata <i>TCP2::TCP2-TEV-linker-6His-HIS3MX6</i>	“
UBY37	Mata <i>TCP2::TCP2-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	“
UBY38	Mata <i>TCP3::TCP3-TEV-linker-6His-HIS3MX6</i>	“
UBY39	Mata <i>TCP3::TCP3-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	“
UBY40	Mata <i>TCP5::TCP5-TEV-linker-6His-HIS3MX6</i>	“
UBY41	Mata <i>TCP6::TCP6-TEV-linker-6His-HIS3MX6</i>	“
UBY42	Mata <i>TCP6::TCP6-TEV-linker-6His-kanMX6</i>	“
UBY43	Mata <i>TCP7::TCP7TEV-linker-6His-kanMX6</i>	“
UBY48	Mata <i>pCMS38-tcp1-2 Δtcp1::HIS3MX6 Δssb1::loxP Δssb2::loxP CDC55::CDC55-3HA-kanMX6</i>	“
UBY49	KSY436 x KSY437 2n <i>TCP1::TCP1-TEV-linker-6His-kanMX6</i> pUB43, pUB46, pSI231, pSI341 ( <i>TCP/CCT</i> -Überexpressionsstamm)	“
UBY50	KSY439 x KSY440 2n <i>TCP5::TCP5-TEV-linker-6His-kanMX6</i> pUB43, pUB46, pSI241, pSI349 ( <i>TCP/CCT</i> -Überexpressionsstamm)	“
UZY10	YPH499 x YPH500 2n <i>GIM6::GIM6-TEV-6His-kanMX6</i> pUZ10, pUZ5, pUZ11 ( <i>GIM</i> -Überexpressionsstamm)	Ute Zeidler

*TCPx::HIS3MX6* (bzw. *Δreg1::loxP*) bedeutet, dass *TCPx* (*Δreg1*) durch das Modul *HIS3MX6* (loxP Sequenz) ersetzt wird (2.2.2.6.). *TCPx::TCPx3HA-HIS3MX6* bedeutet, dass *TCPx* C-terminal mit einem 3HA-Epitop sowie einem heterologen Selektionsmarker fusioniert wird (2.2.2.5.).

### 2.1.6. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBBY7	pRSETa- <i>ACT1</i> ohne Intron	Bettina Bölker
pGS25	pRSET6a- <i>TUB1</i> ohne Intron	Silke Grallath
pGS26	pET17b- <i>TUB2</i>	“
pProEX-HtB-SSB1	pProEX-HTb- <i>SSB1</i>	Andreas Bracher
pUB1	pGEX-5X-1- <i>TCP1/CCT1</i> ( <i>TCP1/CCT1</i> , 1-1979 Bp)	diese Arbeit
pUB3	pGEX-5X-1- <i>TCP2/CCT2</i> ( <i>TCP2/CCT2</i> , 1-1904 Bp)	“
pUB9	pGEX-5X-1- <i>TCP5/CCT5</i> ( <i>TCP5/CCT5</i> , 1-1869 Bp)	“
pUB12	pGEX-4T-3- <i>TCP6/CCT6</i> ( <i>TCP6/CCT6</i> , 1-1863 Bp)	“
pUB13	pGEX-5X-1- <i>TCP7/CCT7</i> ( <i>TCP7/CCT7</i> , 1-1913 Bp)	“
pUB19	pTOPO2.1- <i>TCP2/CCT2</i>	“
pUB20	pTOPO2.1- <i>TCP3/CCT3</i>	“
pUB21	pTOPO2.1- <i>TCP4/CCT4</i>	“
pUB22	pTOPO2.1- <i>TCP5/CCT5</i>	“
pUB23	pTOPO2.1- <i>TCP6/CCT6</i>	“
pUB24	pTOPO2.1- <i>TCP7/CCT7</i>	“
pUB25	pTOPO2.1- <i>TCP8/CCT8</i>	“
pUB26	pTOPO2.1- <i>TCP1/CCT1</i>	“
pUB28	p426GAL1- <i>TCP2/CCT2</i>	“
pUB29	p423GAL1- <i>TCP6/CCT6</i>	“
pUB31	p425GAL1- <i>TCP4/CCT4</i>	“
pUB32	p425GAL1- <i>TCP5/CCT5</i>	“
pUB41	pGEX-5X-1- <i>TCP3/CCT3</i> ( <i>TCP3/CCT3</i> , 1306-1605 Bp)	“
pUB42	pQE32- <i>TCP3/CCT3</i> ( <i>TCP3/CCT3</i> , 594-1121 Bp)	“
pUB43	p426GAL1- <i>TCP3-CYC1-GAL1-TCP2-CYC1</i>	“
pUB45	p423GAL1- <i>TCP8/CCT8</i>	“
pUB46	p423GAL1- <i>TCP6-CYC1-GAL1-TCP8-CYC1</i>	“
pUB50	pGEX-5X-1- <i>TCP8/CCT8</i> ( <i>TCP8/CCT8</i> , 343-1190 Bp)	“
pUB52	pKM263-4T3-TEV- <i>TCP4/CCT4</i> ( <i>TCP4/CCT4</i> , 1-545 Bp)	“
pUB54	pKM263-4T3-TEV- <i>TCP4/CCT4</i> ( <i>TCP4/CCT4</i> , 448-1109 Bp)	“
pUB56	pET21a- <i>POT1</i>	“

pUB58	pET22b-TPD3	“
pUB59	pRSET6a-PEX7-3HA	“
pUB60	pET17b-PEX7-3HA	“
pUB61	pRSET6a-CDC20-6His-3HA	“
pUB62	pET17b-CDC20-6His-3HA	“
pUB63	pET17b-CDC55-3HA	“
pUB64	pRSETa-‘hsl1’ (2097-‘hsl1’-2616 Bp)	“
pUB65	pRSETa-TPD3	“
pSI231	p425GAL1-TCP4-CYC1-GAL1-TCP5-CYC1	Katja Siegers
pSI239	p424GAL1-TCP7/CCT7	“
pSI240	p424GAL1-TCP1/CCT1	“
pSI241	p424GAL1-TCP1-CYC1-GAL1-TCP7-CYC1	“
pSI250	p426GAL1-TCP3/CCT3	“
pSI314	pKM263-TCP8/CCT8 (TCP8/CCT8, 343-1707 Bp)	“
pSI315	pKM263-TCP8/CCT8 (TCP8/CCT8, 1-1219 Bp)	“
pSI341	p424GAL1-TCP1-TEV-linker-6His-CYC1-GAL1-TCP7-CYC1	“
pSI349	p424GAL1-TCP4-CYC1-TCP5-TEV-linker-6His-CYC1	“
pSI447	pRSET6a-CDC20-3HA	“
pYM1	pFA6a-3HA-KanMX6, Plasmid mit PCR-Modul	Knop <i>et al.</i> , 1999
pYM2	pFA6a-3HA-HIS3MX6, Plasmid mit PCR-Modul	“
pYM3	pFA6a-6HA-KITRP1, Plasmid mit PCR-Modul	“
pYM5	pFA6a-3MYC-HIS3MX6, Plasmid mit PCR-Modul	“
pYM6	pFA6a-9MYC-kITRP1, Plasmid mit PCR-Modul	“
pYM16	pFA6a-TEV-6His-KanMX6, Plasmid mit PCR-Modul	Katja Siegers
pYM24	pFA6a-TEV-linker-6His-HIS3MX6, Plasmid mit PCR-Modul	“
pYM25	pFA6a-TEV-linker-6His-KanMX6, Plasmid mit PCR-Modul	“

### 2.1.7. Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3' (*)
CCT1-1 (TCP1 NcoI, EcoRI)	AGCtccATGGAATTCCAATTATTCAATAACTCGCGCTC
CCT1-2 (TCP1 XhoI)	gtcgactcgagCTTTAACAGGGTTCCTGCTCG
TCP1-OE1PstIEcoRI	gatctgcagaattCGATGTCCCAATTATTCAATAACTC
TCP1-OE2ClaIXhoI	gatcatcgatctcgagCAAAGAATCAATGATCGTGCGG
TCP1/CCT2-SEQ2	TCAAAGCATAACCTGGCACC
TCP1S6HA	TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTtatcccgtaaagggtgtcaatg
CCT2/BIN3-1 (BamHI)	cgctggatccgACTCACCCATATCTGGAAAG
CCT2/BIN3-2 (Sall)	ttacgcgtcgacATGGTGGCTGTTGCAGTGTC
CCT2-OE1(BamHI/PstI)	gatcctgCagggatccCAGGATGAGTGTACAGATATTTGG
CCT2-OE2 (XhoI/EcoRI)	gatcGaAttcCtcgAgTATGTTACATATGTTGTCTATTGGCGG
TCP2/CCT2-S2	aataatgacagtggtggcggtttattattttcaggtatatacctaaatagtATCGATGAATTCCG AGCTCG
TCP2/CCT2-S3	gtggataacatcatccgtgcaagaccaagaaccgccaatagacaacatagCGTACGCT GCAGGTCGAC
TCP2/CCT2-Seq1	AGAAGTTGATTGATCAATCC
TCP2/CCT2-Seq2	GGCGCAACCGCCGCC
CCT3/BIN2-1 (NcoI/EcoRI)	GCCACCATGGAATTCCCAGTGGTATTTATGAATGCTTC
CCT3/BIN2-2 (Sall)	TGTCGTCGACACGCTTATGACATACTGTAGGG
TCP3/CCT3-OE1 (EcoRI/PstI)	gAtcctgcAggaAttCCACAATGCAAGCTCCAGTGG
TCP3/CCT3-OE2 (XhoI/Sall)	gAtcgTcgaCTCGAGGCTATTATTCTTGTCTTTCTTACACC
TCP3/CCT3-S2	aagaaacaccaaataataaacggcagtaatgaagttaacctcgaggcatATCGATGAAT TCGAGCTCG
TCP3/CCT3-S3	tgttactattaagggtgatgatattgtagtggtgaagaaacaagaaCGTACGCTGCA GGTCGAC
TCP3-AKSeq-BamHI	gatcggatccAAATTGATTCAAGCCTCTATCGG
TCP3-AKSeq-XhoI	gatcctcgagttACATCACATTACGAGCAACAGC
TCP4/CCT4-1(BamHI/SmaI)	agtaccgggggatccCTGCTAAAGTTCCATCTAACGC
TCP4/CCT4-2 (XhoI)	atgtctcgagCACGACCACAATAATGAGCGG

<i>TCP4/CCT4-OE1</i> (BamHI/ SpeI)	gatcActAGtGgATccAACGATGTCTGCTAAAGTTCCATCTAACGC
<i>TCP4/CCT4-OE2</i> (XhoI)	gatcgTcagctcgAgCCCATGTTAACGGCTGAATGC
<i>TCP4/CCT4-S2</i>	aacatataatgtatataatgcataaacatattgataactgggaaacccatgATCGATGAATT CGAGCTCG
<i>TCP4/CCT4-S3</i>	tctgaatgtgttaaataccatcttaggtattgatgatattgcattcagccgtCGTACGCTGCAG GTCGAC
<i>TCP4/CCT4-Seq1</i>	GTGATCTTGACCGGAGC
<i>TCP4/CCT4-Seq2</i>	ACCACCAGCGATTAACCC
<i>TCP5/CCT5-1</i> (BamHI/SmaI)	aatacccggggATCCCTGCTCGTCCACAACAACCTC
<i>TCP5/CCT5-2</i> (XhoI)	gtcgactcgagGCAAATAACTGAAACGCC
<i>TCP5/CCT5-OE1</i> (BamHI/SpeI)	gaTcActagtgATccGAAAATGGCTGCTCGTCCAC
<i>TCP5/CCT5-OE2</i> (XhoI/ClaI)	gaTcATcgaTctcgagTACAAAATCAATACTCATCTTTACC
<i>TCP5/CCT5-S2</i>	ttgtgggatattgattaaaactatctttattattattatacaaaaATCGATGAATTGAG CT
<i>TCP5/CCT5-S3</i>	agaatgatttaaagattgataacgtcatcattagtgtaaagatgagatCGTACGCTGCA GGTCCGAC
<i>TCP5/CCT5-Seq1</i>	agttgttagtacaactttcc
<i>TCP5/CCT5-Seq2</i>	CACACATAGTGAGTCATGC
<i>TCP6/CCT6-1</i> (NcoI/NotI)	agtagcggccgccCATGgCATTGCAATTGTTGAATCCGAAG
<i>TCP6/CCT6-2</i> (XhoI/Sall)	gtcgactcgagTGTGGTCAACGCGAAGAGGG
<i>TCP6/CCT6-OE1</i> (PstI/ClaI)	gatcatcgatctGcAGAAGCATGTCATTGCAATTGTTGAATCC
<i>TCP6/CCT6-OE2</i> (XhoI/EcoRV)	gatcgatattcTcgagTTTTTTTACTGTGGTGTTCCTTC
<i>TCP6/CCT6-S2</i>	actactagattcgtgtctgttattattattattattatttttaATCGATGAATTGAGCT CG
<i>TCP6/CCT6-S3</i>	tgcgatgaattgtaagggcaggtagatccacttgaagaacaccacagCGTACGCTG CAGGTCCGAC
<i>TCP6/CCT6-Seq1</i>	CGGATCATCACTGATGGG
<i>TCP6/CCT6-Seq2</i>	GCGATGTAGAACGCACC
<i>TCP7/CCT7-1</i> (BamHI/SmaI)	aactcccgggatccACTTTGGAAGCCAAACACCTAC
<i>TCP7/CCT7-2</i> (XhoI/Sall)	gtcgactcgagATCCAACCCGGATGACGACC
<i>TCP7/CCT7-OE1</i> (BamHI/HindIII)	gatcaAgcTtggAtcCcttttATGAACTTTGGAAGCC
<i>TCP7/CCT7-OE2</i> (XhoI/EcoRI)	gatcgaaTTctcGaGTTAATTACATTGGCATACTCTCCC
<i>TCP7/CCT7-S2</i>	aaaaagagtaataataaaatgtatgcagcacatgttttagagtgttaaATCGATGAATTC GAGCTCG
<i>TCP7/CCT7-S3</i>	gctggcatgatgctcccaaggggctggaagagggagaggtatgccaatgCGTACGCT GCAGGTCCGAC
<i>TCP7/CCT7-Seq1</i>	TTAGTGATATTTCTAGAGC
<i>TCP7/CCT7-Seq2</i>	CACCATACCATTCTCACC
<i>TCP8/CCT8-1</i> (BamHI/SmaI)	atcaccgggatccCACTTAGATTGCCACAAAATCCC
<i>TCP8/CCT8-2</i> (XhoI/Sall)	gtcgactcGAGTACAGGTACACATGATACTGCC
<i>TCP8/CCT8-AK-BamHI/EcoRI</i>	gatcgaattctggatccCGAAAAACTGATTTCAATGGGC
<i>TCP8/CCT8-AK-XhoI/EcoRI</i>	gatcgaattctcgagTGCAACACCATCATCAATGGC
<i>TCP8/CCT8-OE1</i> (ClaI/BamHI)	gATcTcagatggAtccAACCATGTCACCTTAGATTGCCACAAAATCCC
<i>TCP8/CCT8-OE2</i> (Sall/XhoI)	gatcgtcGActCgAgCAAATCAGTCTTCTTGGTCCCAGTTACC
<i>TCP8/CCT8-S2</i>	tctgtgttgcaggatatactactttgtaagtataaagatgcaaaacaaaATCGATGAATTC GAGCTCG
<i>TCP8/CCT8-S3</i>	ggtccaagagcacctcaaggcccaaggccaggtactgggaccaagaagacCGTACGC TGCAGGTCCGAC
<i>TCP8/CCT8-Seq1</i>	cctcattaacatcaagacc
<i>CDC20</i> HindIII/NheI	tcagaagcttAgctagcATGCCAGAAAGCTCTAGAGATAAG
<i>CDC20</i> XhoI/SpeI	agtcactagctcgagATGCTAAGCGTAATCTGGAACG
<i>CDC55</i> HindIII	AAGAAATATAAgcTtGCGCACAAATGGC
<i>Pex7</i> NheI/XbaI	tcagtctagagctagcATGCTCAGATATCATATGCAAGG
'HSL1' BamHI/NdeI	agtcaagcttttactcgagCTGAATAGGTTTGAGTGGTG
'HSL1' XhoI/HindIII	tcagggatcccatatgCCTAGTAAGAAACCAGCATCC
<i>POT1</i> BamHI/SacI	tCAggAgcTcggAtccATGTCTCAAAGACTACAAAGTATC
<i>POT1</i> XhoI/Sall	tcaGgtcgActcgagTTCTTTAATAAAGATGGCGGCG
<i>TPD3</i> BamHI/NdeI	tcagggatcccATATGTCTGGAGCAAGATCAAC
<i>TPD3</i> HindIII/Sall	agtcaagcttagtcgacATTTTTTAAAGTTCTTGACATTCTG
<i>REG1-S4</i>	aagattataatcctaagcaagcatattgacgaagacgagataagaaaaatccaaaatgC GGTGGCGGCCGCTCTAG

REG1-S5	gatccacactacgtgattttttctctcatgttgactcaaaattcttcttctaCCTCGAGGT CGACGGTATC
REG1-BglII-SmaI	gatccccgggagatctCCTGAGATTGTGTGACAAGCC
REG1-PstI-XhoI	gatcctgcagctcgagAAGTTGTGCCTAAAACAAGCCG
HIS&KAN-rescue	gataagcttgaattcatctgatatctcgaGTCCATGTCGCTGGCCGGG

(\*) Sequenzübereinstimmung mit PCR-Matrize (genomische DNS bzw. Plasmid) in Großbuchstaben

## 2.1.8. Antikörper

### 2.1.8.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
anti-Tcp1p	1:40 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp2p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp3p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp4p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp5p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp6p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp7p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tcp8p	1:20 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim1p	1:2000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim2p	1:2000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim3p	1:2000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim4p	1:100	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim5p	1:2000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Gim6p	1:100	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Act1p	1:25 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tub1p	1:50 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-Tub2p	1:50 000	polyklonale Antikörper aus Kaninchen
anti-HA	1:20	Hybridoma-Zell-Linie 12CA5
anti-myc	1:20	Hybridoma-Zell-Linie 9E10
anti-Adh1p	1:10 000	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen

### 2.1.8.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
HRP konjugierter anti-Kaninchen Antikörper aus Ziegen (Fc-Fragment)	1:10 000	Dianova
HRP konjugierter anti-Maus Antikörper aus Schafen (Fc-Fragment)	1:10 000	Dianova

## 2.1.9. Standards

### 2.1.9.1. Protein-Standard für SDS-PAGE

Zur SDS-PAGE Analyse wird *page ruler protein ladder* von Fermentas oder „BenchMark Standard“ von Invitrogen (Karlsruhe, BRD) verwendet. Von dem Marker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, BRD) werden durchschnittlich 0,175 µg von jedem Protein aufgetragen (Markergrößen: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50\*, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa; \* = Bande zeigt eine intensivere Coomassie-Färbung im Vergleich zu den anderen Markerbanden). Von dem Marker der Firma Invitrogen werden 0,5 µg von jedem Protein aufgetragen (Markergrößen: 10, 15, 20\*, 25, 30, 40, 50\*, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa).

### 2.1.9.2. Protein-Standard für Gelfiltrationschromatographie

Für die Gelfiltrationschromatographie werden folgende Eichproteine (Amersham Bioscience; Freiburg/BRD) verwendet: Dextran (2000 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (400 kDa), Katalase (230 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (24 kDa) und RibonukleaseA (13 kDa). Die Proteine werden zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml in PBS mit 5% Glycerin gelöst, vereint und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der Gelfiltrationschromatographie wird der Standard zentrifugiert (20000 g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), um zu vermeiden, dass Aggregate auf die Säule geladen werden.

### 2.1.9.3. DNS-Standard

Für die Agarosegelelektrophorese wird *gene ruler 1 kb DNA ladder* von Fermentas verwendet. Durchschnittlich werden 2,5  $\mu\text{g}$  des Markers auf ein Agarosegel aufgetragen (Markerbanden: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 6000, 8000, 10000 Bp)

## 2.1.10. Säulenmaterial zur Reinigung von Proteinen

Sämtliches Säulenmaterial zur Reinigung von Proteinen stammt von Amersham Bioscience, Freiburg/BRD (Ausnahme:  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose von Qiagen, Hilden/BRD). Die gelisteten Eigenschaften beruhen auf Angaben der Hersteller.

### Affinitätschromatographie:

Säule	Verwendung	Matrix	Kapazität
$\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose	Reinigung von Proteinen mit 6His-Epitop	Metallionen sind an Nitrilotri-Essigsäure (NTA) gebunden, welche an Sepharose gekoppelt ist (Partikelgröße 45-165 $\mu\text{m}$ ). Ein $\text{Ni}^{2+}$ -Ion wird von NTA über 4 Bindestellen gebunden. Die Struktur des Histidins weist einen Imidazolring auf, der eine spezifische Bindung an immobilisierte $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen ermöglicht. Durch Zugabe von steigenden Imidazolkonzentrationen (0,1-0,5 M) kann das 6His-Epitop und somit das spezifisch gebundene Protein von immobilisierten $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen verdrängt und folglich eluiert werden. Eine geringe Imidazol-Konzentration im Bindungspuffer (20 mM) verringert unspezifische Bindungen.	5-10 mg Protein/ml
$\text{Ni}^{2+}$ -chelating Sepharose	Reinigung von Proteinen mit 6His-Epitop	Metallionen sind an Iminodi-Essigsäure (IDA) gebunden, welche an Sepharose gekoppelt ist (Partikelgröße 45-165 $\mu\text{m}$ ). Ein $\text{Ni}^{2+}$ -Ion wird von IDA über 3 Bindestellen gebunden. Erfahrungsgemäß (diese Arbeit) führt die Verwendung von $\text{Ni}^{2+}$ -IDA bei TRiC-Reinigung zu besseren Ergebnissen, was ev. auf eine bessere Zugänglichkeit der $\text{Ni}^{2+}$ -IDA Matrix für den Epitop-tag des Chaperonins zurückzuführen ist. Die chelating Sepharose wird nach Anleitung des Herstellers (Amersham) mit $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen.	5-10 mg Protein/ml

**Gelfiltrationschromatographie:**

Säule	System	Volumen	Matrix	Auftrennungsbereich	Menge
Superdex 200 HR 10/30	FPLC	24 ml	Agarose/Dextran	10-600 kDa	10 mg
Superdex 200 HR 16/60	FPLC	120 ml	„	10-600 kDa,	1 g
Superdex 200 PC3.2	SMART	2,4 ml	„	10-600 kDa	0,5-3 mg
Sephacryl S400	FPLC	1,2 l	Dextran/Bisacrylamid	20-8000 kDa	10 g
Superose 6 PC3.2	SMART	2,4 ml	Agarose	5-5000 kDa	0,5-3 mg

**Ionenaustauschchromatographie:**

Säule	System	Volumen	Matrix	Eigenschaft	Menge
MonoQ HR 10/10	FPLC	8 ml	Polystyren/ Divinylbenzen	starker Anionenaustauscher	0.1-0,4 g

Generell werden alle Säulen in 20% Ethanol gelagert. Vor Benutzung werden die Säulen zunächst mit 2-3 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O und anschließend mit 2 Säulenvolumen Puffer gespült. Nach Gebrauch werden die Säulen mit 2 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O und mit 2 Volumen 20% Ethanol gespült. Die Flussrate ist in der Regel (Ausnahme: Ethanol mit ca. 4fach geringerer Geschwindigkeit) mit der Flussrate des eigentlichen Säulenlaufs identisch. Zur Entfernung von Partikeln werden H<sub>2</sub>O und Puffer vor dem Säulenlauf für 30 min im Ultraschallwasserbad oder mittels Filter (Millipore, Schwalbach/BRD) über eine Vakuumpumpe entgast.

**2.1.10.1. Immobilisierung von Ni<sup>2+</sup>-Ionen und Regenerierung von Sepharose**

Für die Immobilisierung Ni<sup>2+</sup>-Ionen an Chelating Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg/BRD; s. Tabelle) werden 80 ml Säulenmatrix (in 20% Ethanol) in eine Säule (Durchmesser: 1,5 cm, Höhe: 11 cm, Werkstatt des Instituts) überführt und mit 3 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gespült (Gravitationsfluss). Hierzu wird H<sub>2</sub>O direkt von oben in die Säule gefüllt (oberer Säulenadapter fehlte). Bei sämtlichen Schritten ist darauf zu achten, dass die Gel-Matrix nicht trocken läuft. Die Matrix wird mit einem Säulenvolumen NiCl<sub>2</sub>-Lösung (200 mM) und anschließend mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gespült. Der obere Adapter wird auf den Säulenzylinder gesetzt, so dass der Adapterstempel luftblasenfrei in die Flüssigkeit oberhalb der noch nicht vollständig abgesetzten Gel-Matrix hineinragt. Der Adapter wird über den *inlet* Schlauch mit einer Peristaltikpumpe verbunden und der gewünschte Puffer wird auf die Säule transferiert (4 ml/min) wobei sich die Gel-Matrix weiter absetzte. Auf diese Weise wird die Säule mit 2 Säulenvolumen Puffer gespült. Der Stempel wird anschließend auf dem Gelbett positioniert und die Säule konnte zur Proteinreinigung eingesetzt werden.

Nach Gebrauch wird der obere Adapter entfernt und die Säule mit 2 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gespült (Gravitationsfluss), gefolgt von 10 Volumen 50 mM EDTA, 0,5 M NaCl (zur Entfernung immobilisierter Ni<sup>2+</sup>-Ionen) sowie 2-3 Volumen 0,5 M NaCl. Ausgefallene oder hydrophobe Proteine werden durch waschen mit 1/4 Säulenvolumen 1 M NaOH entfernt. Hydrophob-geladene Proteine und Lipide werden durch spülen mit 4 Volumen 79%

Ethanol entfernt. Die Matrix wird mit 3 Volumen 20% Ethanol gespült und in einem Gefäß bei 4°C gelagert.

#### **2.1.10.2. Packen einer Gelfiltrationssäule**

Zunächst wird das Säulenvolumen errechnet, um die benötigte Menge der Gel-Matrix bestimmen zu können (z.B. 1,2 l Sepharcyl S400 für XK50-Säule von Pharmacia). Das entsprechende Volumen Gel-Matrix wird mit einem äquivalenten Volumen H<sub>2</sub>O versetzt und luftblasenfrei in eine am unteren Ende verschlossene Säule überführt. Während dieses Prozesses wird der *outlet* Schlauch geöffnet, damit überschüssige Flüssigkeit durchläuft und die restliche Gel-Matrix weiterhin von oben in die Säule nachgefüllt werden kann. Dabei ist stets darauf zu achten, dass die Gel-Matrix nicht trocken läuft. Nachdem die gesamte Matrix in die Säule überführt wurde und sich abgesetzt hatte wird der Adapter am oberen Säulenende aufgesetzt. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Stempel luftblasenfrei in die Flüssigkeit oberhalb des Gel-Bettes hineinragt. Der Stempel sollte allerdings noch nicht auf dem Gel-Bett aufliegen, da noch nicht abgesackte Matrixpartikel in der Flüssigkeit oberhalb des Gel-Betts schweben. Gemäß den Angaben des Herstellers wird der *inlet* Schlauch des Adapters an eine FPLC angeschlossen und die XK50-Säule/Sepharcyl S400 wird mit entgastem H<sub>2</sub>O wie folgt gespült: 2 Std mit 600 ml/Std und 1 Std mit 1,8 l/Std. Anschließend wird der Stempel vorsichtig auf das nun abgesetzte Gel-Bett positioniert. Die Säule wird mit Puffer äquilibriert und ein Testlauf mit Protein-Standard (2.1.9.2.) wird vollzogen.

#### **2.1.11. Einengen von Proteinproben**

Proteinproben werden mit Konzentrierern von Vivascience (Hannover, BRD) eingengt. Hierzu werden 20 ml Probe in ein Vivaspin 20 (je nach gewünschtem Ausschlussvolumen: 30 kDa bzw. 100 kDa) überführt und bei 4°C bei 3000 g zentrifugiert, bis die Proteinprobe auf das gewünschte Volumen eingengt ist. Hierzu wird der Zentrifugationsschritt in 15-30minütigen Intervallen unterbrochen, um den Grad der Einengung zu bewerten. Prinzipiell werden die hier aufgeführten Proteine auf eine maximale Konzentration von 15 µg/µl eingengt. Nach erfolgter Einengung wird die Probe in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder einem weiteren Proteinreinigungsschritt unterzogen oder aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.1.12. Umpuffern von gereinigten Proteinen**

Für das Umpuffern von Proteinen mittels Micro Bio-Spin Säulchen (BioRad, München/BRD) werden Säulchen mit einem Ausschlussvolumen von 40 kDa nach Anleitung des Herstellers verwendet. Hierzu wird das Säulchen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um den enthaltenden Puffer zu entfernen, wird der Säulendeckel entfernt und das Säulchen zentrifugiert (1000 g, 2 min, 4°C). Der Durchlauf wird verworfen und das Säulchen durch 3 x 500 µl Waschen mit gewünschtem Puffer äquilibriert (1000 g, 1 min,

4°C). Der Durchlauf wird verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 20-75 µl Proteinprobe auf die Säulchenmatrix pipettiert und zentrifugiert (1000 g, 4 min, 4°C). Nach erfolgtem Pufferwechsel werden die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Alternativ werden Proteine mittels Konzentrieren von Vivascience umgepuffert (2.1.11.). Hierzu wird die eingengte Proteinlösung mehrmals mit dem gewünschtem neuen Puffer aufgefüllt und erneut durch Zentrifugation eingengt. Dieser Schritt wird solange wiederholt bis sich ein vollständiger Pufferwechsel vollzogen hatte. Um beispielsweise durch Umpuffern die Salzkonzentration einer Probe um den Faktor 10 zu reduzieren, wird die Probe mit einem 10fachen Volumen Puffer ohne Salz aufgefüllt und anschließend auf das gewünschte Volumen eingengt.

### **2.1.13. Filtration von Proteinproben**

Vor einer Gelfiltrationschromatographie wird die Proteinprobe sterilfiltriert und entgast, um die Injektion unerwünschter Aggregate zu vermeiden. Hierzu wird die Proteinprobe in eine Spritze (z.B. 30 ml; Braun, Melsungen/BRD) überführt, erst über einen 0,45 µm und anschließend über einen 0,2 µm Filter (Sartorius, Göttingen/BRD) filtriert. Der filtrierte Durchlauf wird in einem Zentrifugengefäß aufgefangen. Anschließend wird die Probe direkt einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen.

### **2.1.14. Waschen von Glasperlen**

Für den Aufschluss von Hefezellen werden Säure-gewaschene Glasperlen (Ø 0,45 mm; Sigma, Steinheim/BRD) verwendet. Hierzu werden die Glasperlen aus Sicherheitsgründen zunächst in einem Glasgefäß mit konz. Salpetersäure unter dem Abzug inkubiert (ca. 30 min). Die Glasperlen sollten gerade von der Säure bedeckt sein. Mit einem Glas-Stab wird das Gemisch vorsichtig durchmischt. Anschließend wird die Säure vorsichtig über einen Glastrichter abgegossen und für die nächsten Reinigungen sicher verwahrt. Die Glasperlen werden vorsichtig in eine Glasfritte umgefüllt und mit H<sub>2</sub>O unter Rühren mit einem Glasstab gewaschen (Vakuumpumpe). Der Durchlauf wird in einer Saugflasche aufgefangen, in ein Becherglas umgefüllt und mit NaOH Plättchen neutralisiert. Das Waschen der Glasperlen wird solange fortgesetzt bis der pH-Wert des Durchlaufs neutral ist (pH-Wert Teststreifen). Die Glasperlen werden in einem Glasgefäß über Nacht bei 180°C gebacken. Bevor die abgekühlten Glasperlen für den Zell-Aufschluss verwendet werden, wird mit pH-Wert Teststäbchen die Neutralisierung der Säure-gewaschenen Glasperlen überprüft.

## 2.2. Mikrobiologische und genetische Methoden

### 2.2.1. Arbeitstechniken für *E. coli*

#### 2.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen in TY-Medium werden, wenn nicht anders erwähnt, bei 37°C in Schikanekolben geschüttelt. Ausstrichkulturen auf Agarplatten werden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Antibiotika für die Selektion von transformierten Bakterien werden in einer Konzentration von 100 µg/ml (Ampizillin), 50 µg/ml (Kanamycin) bzw. 20 µg/ml (Chloramphenicol) dem Medium zugefügt. Die Dichte von *E. coli*-Kulturen wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt (Beckman D4 640 Spectrophotometer). Kulturen mit einer OD<sub>600</sub> > 0,5 werden für eine genaue Dichtebestimmung verdünnt und erneut mit dem Spektrometer gemessen. Kurzzeitig werden Ausstriche auf Agarplatten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert. Für die langfristige Lagerung wird 1 ml einer stationären Flüssigkultur mit 0,5 ml 50% sterilem Glycerin vermengt und bei –80°C eingefroren.

Der DH5α-Stamm wird zur Klonierung verwendet. BL21(DE3)-Zellen werden zur Überproduktion rekombinanter Proteine verwendet. GM2163-Zellen dienen der Gewinnung nicht-methylierter Vektor-DNS (dam-/dcm-DNS). KC8-Zellen dienen der Selektion von Hefepiasmiden, die *TRP1*, *LEU2* oder *HIS3* Hefe-Wildtyp Gene als Marker tragen (2.1.5.1.).

#### 2.2.1.2. Transformation von *E. coli*

Es werden sowohl chemischkompetente als auch elektroporationskompetente Zellen verwendet. In beiden Fällen wird aus Einzelkolonien des entsprechenden *E. coli*-Stammes eine Übernachtskultur in Flüssigmedium hergestellt. Mit dieser Vorkultur wird eine 400 ml Hauptkultur (1:50) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Abkühlung der Kultur in Eiswasser (10 min) werden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (sterile Zentrifugengefäße; 4°C, 2000 g, 10 min). Zur Herstellung kompetenter Zellen werden sämtliche Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

##### 2.2.1.2.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemischkompetenter Zellen wird das Zellsediment in 100 ml kaltem RF1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (w/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert) pro 400 ml Ausgangskultur resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt und 2 Std auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (900 g, 10 min, 4°C) werden die Zellen sanft in 16 ml kaltem RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (w/v) Glycerin, pH 6,8 mit NaOH eingestellt; sterilfiltriert) pro 400 ml Ausgangskultur resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension aliquotiert (550 µl), in Trockeneis/Ethanol schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### 2.2.1.2.2. Herstellung elektroporationskompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektroporationskompetenter Zellen wird die Zellkultur zuvor auf mehrere Zentrifugengefäße (je 50 ml) verteilt, um nach der Zentrifugation das Lösen des Pellets zu erleichtern. Zur Reduktion der Ionenstärke wird das Zellpellet vorsichtig in einem Kulturvolumen (400 ml insgesamt) kaltem Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Dieser Wasch-Schritt wird mit einem halben Kulturvolumen (insgesamt 200 ml) kaltem Wasser und anschließend mit 1/50 Kulturvolumen (insgesamt 8 ml) 10% kaltem Glycerin wiederholt. Die Zellen werden in insgesamt 0,8 ml 10% Glycerin aufgenommen, in 90 µl Aliquots in Trockeneis/Ethanol schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.2.3. Transformation chemischkompetenter Bakterien

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut. Für eine Transformation mit chemischkompetenten Zellen wird zu 100 µl Zellen 1 µl Plasmid-DNS (0,5 µl Plasmid DNS, ca. 1 µg DNS) bzw. 5 µl Ligationsansatz (ca. 10 pg DNS) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1,5 min bei 42°C (Wasserbad) und einer anschließenden Abkühlung für ca. 1-2 min auf Eis werden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C (sanft schüttelnd, 450 rpm) werden die Zellen vorsichtig pelletiert (1000 x g, 1 min) und auf eine Selektionsplatte plattiert. Die Transformationsplatten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.2.1.2.4. Transformation elektroporationskompetenter *E. coli*

Für eine Elektroporation werden 0,5 µl Plasmid (ca. 0,5 µg) DNS bzw. 5 µl Ligationsansatz (ca. 10 pg DNS) mit 40 µl elektroporationskompetenten Zellen gemischt. Die Suspension wird in einer kalten Elektroporationsküvette (0,1 cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1,8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Puls werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß transferiert und nach 60 min Inkubation bei 37°C (sanft schüttelnd, 450 rpm). Die Zellen werden vorsichtig pelletiert (1000 x g, 1 min) und auf Selektionsplatten plattiert. Die Transformationsplatten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 2.2.2. Arbeitstechniken für *S. cerevisiae*

### 2.2.2.1. Kultivierung von Hefen

Als Ausgangsstämme werden YPH499 und YPH500 (Hieter *et al.*, 1989), die auxotroph für Adenin, Histidin, Leuzin, Lysin, Tryptophan und Urazil sind, verwendet. Aus diesem Grund müssen die für die Anzucht dieser Hefestämme eingesetzten Medien (SC-Medium oder YPD-Medium) die fehlenden Komponenten beinhalten. Da in Platten-Nährmedien nur ein niedriger Adeningehalt enthalten ist, werden die Hefestämme während des Wachstums aufgrund ihrer Auxotrophie rot und können somit von Fremdstämmen unterschieden werden. Eine Mutation im *ADE2*-Gen führt zur Anhäufung des Stoffes AIR (5-Aminoimidazol-Ribonukleotid) in den Zellen. AIR verursacht die Rotfärbung der Zellen, da

es zu einem roten Farbstoff oxidiert wird. Zur Kultivierung werden Flüssigkulturen (Kolben) mit frisch gewachsenen Hefen von Plattenausstrichen angeimpft. Es wird stets mit Flüssigkulturen gearbeitet, welche aus einer frischen Vorkultur-Kultur verdünnt werden. Das Wachstum erfolgt in Kolben schüttelnd im Inkubator (240 rpm) bei 30°C. Die Zelldichte wird photometrisch bestimmt (Spektrophotometer) und die Zellzahl kalkuliert ( $OD_{600}=0,5$  entsprechen ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml). Für kurze Zeit (max. 1-2 Monate) werden Hefen auf Platte bei ca. 4°C gelagert. Für die Langzeitaufbewahrung werden Stämme auf Selektionsplatten großflächig ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Die stationären Zellen werden anschließend unter sterilen Bedingungen von der Platte abgenommen, in 1 ml 15% sterilem Glycerin resuspendiert, in Trockeneis eingefroren (um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden) und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2. Bestimmung der Verdopplungszeit von Hefen

Aus einer Übernacht-Kultur wird eine Hauptkultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft. Stündlich werden Proben entnommen und  $OD_{600}$ -Werte bestimmt (Beckman D4 640 Spectrophotometer). Die Verdopplungszeit wird anhand der Messwerte, die während der exponentiellen Phase des Wachstums entnommen werden, bestimmt:

$t_D = t/n$ ;  $t_D$  = Verdopplungszeit;  $n$  = Teilungen

$N_0 = N/2^n$ ;  $N_0$  = Zellzahl, Anfangs  $OD_{600}$ ;  $N$  = Zellzahl,  $OD_{600}$  nach  $\Delta t$

$N = N_0 \cdot 2^n = \log N - \log N_0 / \log 2 = 1 / \log 2 \cdot (\log N - \log N_0)$

$1 / \log 2 = 1 / 0,3 = 3,3$

$t_D = \Delta t / 3,3 \cdot (\log N - \log N_0)$

### 2.2.2.3. Fermenterkultur des TCP/CCT-Überexpressionsstammes

Für eine 200 l Kultur des TCP/CCT-Überexpressionsstammes werden 1,34 kg Bacto-Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 4 kg Glukose, 400 g Drop out Mix (SC-His/-Leu/-Trp/-Ura), ein Überschuss Adenin (80 g) und 180 ml H<sub>2</sub>O in den 200 l Fermenter gefüllt und bei 120°C für 3 Std autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums werden dem Fermenter 16 l Medium entnommen. Mit einer stationären Flüssigkultur des TCP/CCT-Überexpressionsstammes (UBY49 bzw. UBY50) und den 16 l Medium wird eine Vorkultur (16 Kolben mit je 1 l) für den Fermenter auf  $OD_{600}$  0,2 angeimpft. Die Zellen werden für 17 Std bei 30°C bis zu einer  $OD_{600}$  3,2 kultiviert (Verdopplungszeit des Stammes: 204 min). Anschließend werden die 16 l Hefekultur in den Fermenter überführt und mit maximaler Sauerstoffzufuhr bei 30°C, 250 rpm gezogen. Nach 7 Std wird die TCP/CCT-Überexpression durch Zugabe von 20 l gespaltener Laktose (2.1.4.2.) für ca. 18-20 Std induziert (während der Induktion verlangsamt sich das Hefewachstum). Um unerwünschte Schaumbildung zu vermeiden, werden ca. 0,5 ml autoklaviertes Antifoam (Sigma) in den Fermenter gegeben. Die Ernte erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von 3,5-4 über eine Durchflusszentrifuge. Hierzu wird der Fermenter in ein 200 l Auffanggefäß entleert. Die Kultur wird mittels einer Umwälzpumpe in die Durchflusszentrifuge überführt und die gesamten 200 l werden zentrifugiert.

Anschließend wird das Zellpellet mit einer 15%igen Glycerin-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (Beckman, JLA 10.500, 3000 g, 10 min, 4°C). Zur Lagerung wird das Zellpellet in 15%iger Glycerin-Lösung (15% vom Gewichtsvolumen des Zellpellets) aufgenommen und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Zellgranulat wird bei –80°C gelagert.

#### **2.2.2.4. Transformation von *S. cerevisiae***

##### **2.2.2.4.1. Generierung kompetenter Hefezellen**

Hefezellen werden aus einer Übernacht-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und schüttelnd (230 rpm) bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (1000 g, 3 min, RT) geerntet, mit einem Kulturvolumen sterilem Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert (1000 g, 3 min, RT), anschließend in 1/4 Pellet-Volumen LiSorb (100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl pH8, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, sterilisiert durch Filtration) aufgenommen und 20 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1000 g, 3 min, RT) und vollständiger Entfernung des Überstands werden die Hefezellen in 600 µl/25 OD<sub>600</sub> LiSorb resuspendiert. DNS aus Herings-Spermien (10 mg/ml; Clontech, Mountain View/USA) wird in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben, um bei einer Transformation die Plasmid-Aufnahme zu begünstigen. Die Zellen werden in 50 µl Aliquots bei –80°C eingefroren.

##### **2.2.2.4.2. Transformation von Hefezellen**

Zur Transformation mittels PCR-Produkten bzw. Plasmid-DNS werden 50 µl Zellsuspension kompetenter Hefezellen verwendet. Hierzu werden kompetente Hefezellen mit der zu transformierenden DNS (2–5 µg PCR-Fragment, 1 µg Plasmid-DNS) gemischt. Die Suspension wird in 6 Volumen LiPEG (100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl pH8, 1 mM EDTA, 40% PEG 3350, sterilisiert durch Filtration) versetzt und bei RT für 20 min schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von DMSO (Endkonzentration 10%) wird der Ansatz für 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und anschließend zentrifugiert (1500 g, 2 min). Zellen werden mit 1 x 200 µl sterilem Wasser gewaschen, anschließend in 200 µl Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Unter Verwendung der Resistenz (*kan*) gegen das Antibiotikum G418 erfolgte zuvor eine 4-5stündige Inkubation (30°C, schüttelnd) der transformierten Zellen in 5 ml YPD-Medium ohne Antibiotikum. In diesem Zeitraum prägen die Zellen die Resistenz gegenüber G418 aus. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (1500 g, 2 min) und auf YPD-G418 Platten plattiert. G418 interagiert mit den 80S-Ribosomen eukaryotischer Zellen und blockiert daher die Proteinbiosynthese in höheren Zellen. Nach ca. 2 Tagen ist eine Replika-Plattierung auf eine weitere Selektionsplatte erforderlich, um die Anzahl von Transformanten zu reduzieren, welche die zu transformierende DNS nicht stabil in das Genom integriert hatten.

### 2.2.2.5. Genomische Integration eines Epitop-tags

Das Einfügen eines Epitop-tags (z.B. HA = Hämagglutinin-Epitop) am 3'-Ende eines Gens (z.B. *TCP2/CCT2*) erfolgte mittels einer PCR Strategie (Knop *et al.*, 1999). Hierzu werden PCR-Kassetten verwendet, welche die Kodierungssequenz für den Epitop-tag (inklusive Stopp-Kodon) sowie für einen Selektionsmarker (z.B. *SpHIS5*, unter Kontrolle des *TEF*-Promotors und -Terminators des filamentösen Pilzes *Ashbya gossypii*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*) beinhalten. Im Fall von *SpHIS5* erlaubt die Expression dieses Selektionsmarkers das Wachstum von Hefen (mit *his3Δ200*) in Abwesenheit von Histidin im Medium (Wach *et al.*, 1997). Die PCR-Kassette wird mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert, deren Sequenzen komplementär zum 5'-Bereich der Epitop-tag Sequenz (S3-Primer; 2.1.7.) bzw. zum 3'-Bereich des *SpHIS5*-Gens (S2-Primer; 2.1.7.) sind. Zusätzlich enthalten die Primer Sequenz-Übereinstimmung (ca. 60 Basen) mit dem 5'- bzw. 3'-Bereich des Stopp-Kodons des Zielgens, z.B. *TCP2/CCT2*. Hiermit wird über homologe Rekombination die Integration der amplifizierten PCR-Kassette ermöglicht, wodurch das ursprüngliche Stopp-Kodon des *TCP2/CCT2*-Lokus ersetzt wird. Nach erfolgter Transformation kompetenter Hefezellen mit der PCR-Kassette werden Zellen auf Selektionsmedium plattiert. Die genomische Integration eines Epitop-tags am 3'-Ende eines Zielgens wird mittels Western-Blot (Epitop- oder Gen-spezifischen Antikörpern) sowie PCR (Primer korrespondierend zum 5'-Bereich und 3'-Bereich der genomisch integrierten Sequenz) überprüft.

Alternativ zu Aminosäure-Selektionsmarkern (z.B. *SpHIS5*) werden PCR-Kassetten verwendet, die einen Antibiotika-Resistenzmarker beinhalten. Das *kan<sup>R</sup>* Gen kodiert für Aminoglykosid-Phosphotransferase, die dem transformierten *S. cerevisiae* Stamm zu einer Resistenz gegenüber Genetizin (G418) verhilft (Wach *et al.*, 1994).

### 2.2.2.6. Disruption chromosomaler Gene

Die Gendisruption erfolgte mittels einer ähnlichen Strategie wie die Integration eines Epitop-tags (Longtine *et al.*, 1998). Die verwendeten Primer (z.B. *REG1-S4* und *REG1-S5* Primer; 2.1.7.) enthalten Template-spezifische Sequenzen (2.2.2.5.) zur Amplifikation einer Disruptionskassette. Zusätzlich beinhalten die Primer Sequenzen, die komplementär zum 5'-Bereich des Start-Kodons bzw. zum 3'-Bereich des Stop-Kodons des Zielgens (z.B. *REG1*) sind. In der amplifizierten Disruptionskassette ist die Sequenz des Selektions- bzw. Resistenzmarkers von zwei loxP Sequenzen flankiert. Die loxP-Sequenzen (*locus for crossingover of P1 phage*) dienen der Cre-Rekombinase (*causes recombination*) des Phagens P1 als Erkennungssequenz. Nach Transformation wird das Zielgen durch homologe Rekombination mit der Disruptionskassette ersetzt. Genomische Gen-Disruption wird mittels PCR (Primer korrespondierend zum 5'-Bereich und 3'-Bereich des disruptierten Gens) überprüft.

### 2.2.2.6.1. *Marker Rescue*

Im Anschluss an die Integration der Disruptionskassette wird der Hefestamm mit einem für Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid transformiert. Galaktose-vermittelte Expression des Cre-Rekombinase kodierenden Gens führt zur Rekombination zwischen den beiden loxP-Sequenzen, welche den Verlust der Selektionsmarker-Sequenz aus dem Genom zur Folge hat. Dieses Rekombinationsereignis resultiert folglich in dem Verbleib von einer loxP-Sequenz am ursprünglichen Lokus sowie der Rekombination (Exzision) eines zirkulären Fragments, das in folgenden Zellteilungen aufgrund fehlender Replikationskontroll-Abschnitte verloren geht.

### 2.2.2.7. Kreuzung haploider *S. cerevisiae* Stämme

Der Prozess der Kreuzung zweier haploider Stämme unterschiedlichen Paarungstyps (Mata bzw. Mat $\alpha$ ) setzt mit der Bindung von Pheromonen ( $\alpha$ - bzw.  $\alpha$ -Faktor) des entgegengesetzten Paarungstyps an Oberflächenrezeptoren ein, was einen G1-Zellzyklusarrest sowie das Anschalten verschiedener Signalwege zur Folge hat (Chan *et al.*, 1982; Manney *et al.*, 1993). Im Anschluss an die Zellfusion kommt es schließlich zur Karyogamie.

Zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps, die Plasmide mit unterschiedlichen Selektionsmarkern enthalten, werden bei 30°C in je 4 ml des entsprechenden Selektionsmediums bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 kultiviert. Die Zellen werden sedimentiert (1000 g, 3 min) und in 1 ml YPD-Medium aufgenommen. Von beiden Stämmen werden 0,5 ml Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß vereint und für 6 Std bei 30°C inkubiert. Anschließend werden ca. 20 Tropfen (je 15-20  $\mu$ l) Zellsuspension auf eine zweifach-Selektionsplatte pipettiert und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Nur diploide Hefezellen, die nach Kreuzung Selektionsmarker beider haploider Stämme tragen, können auf dem zweifach-selektiven Medium wachsen. In der Regel werden diploide Zellen erneut auf einer zweifach-Selektionsplatte ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten.

### 2.2.2.8. Analyse des Paarungstyps haploider *S. cerevisiae*

Zur Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen werden die Testerstämme RH448 (Mata; Chan *et al.*, 1982) und RC757 (Mat $\alpha$ ; Manney *et al.*, 1993) als Indikator-Stämme verwendet. Aufgrund von Mutationen weisen diese Stämme eine Hypersensitivität gegenüber Pheromonen von Hefestämme gleichen Paarungstyps auf. Diese Hypersensitivität resultiert in einer verminderten Fähigkeit der Zellen, den Zellzyklusarrest in der G1-Phase wieder aufzuheben. RH448 (Mata) trägt eine Mutation im *BAR1*-Gen, dessen Genprodukt in WT-Zellen das Pheromon  $\alpha$ -Faktor spaltet. Durch den Abbau des Pheromons können die Zellen den Zellzyklusarrest wieder aufheben und treten wieder in den Zellzyklus ein. Diese Fähigkeit besitzen Stämme, die kein funktionelles *BAR1*-Genprodukt kodieren, nur vermindert. Somit werden die Testerstämme im Zellzyklus arretiert und es bildet sich ein Hemmhof bei ausgestrichenen Stämmen unterschiedlichen

Paarungstyps. Beim Stamm RC757 (Mat $\alpha$ ) ist das *SST2*-Gen mutiert. Hierdurch entsteht eine Hypersensitivität gegenüber dem Pheromon des entgegengesetzten Paarungstyp (a-Faktor). Die Bindung des Pheromons an seinen Rezeptor führt dazu, dass die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (Guanin-Nukleotid bindendes Protein) in GTP-gebundener Form vorliegt, was zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins vom  $\alpha\beta$ -Komplex des G-Proteins führt. Hierdurch wird eine Kaskade von Proteinkinasen aktiviert, die in G1-Zellzyklusarrest, Induktion der Gentranskription und zu morphologischen Veränderungen führt. GTP-Hydrolyse führt zur Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins an den Komplex, wodurch die Signalkaskade blockiert wird. *Sst2p* bindet als negativer Regulator die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (*Gpa1p*) und führt somit zur Umwandlung der  $\alpha$ -Untereinheit in die GDP-gebundene Form. Die  $\alpha$ -Untereinheit (GDP-Form) des G-Proteins bindet an den  $\alpha\beta$ -Komplex des G-Proteins und führt zur Blockade der Kaskade. Zellen, denen das *SST2*-Genprodukt fehlt, können die Kaskade nicht regulieren und den Zellzyklusarrest nicht aufheben. Somit kommt es zur Ausbildung von Hemmhöfen bei Stämmen entgegengesetzten Paarungstyps. Sind die Paarungstypen beider Stämme jedoch gleich, ist kein Hemmhof zu erkennen.

Eine Einzelkolonie des jeweiligen, frisch ausgestrichenen Testerstammes wird in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. 50  $\mu$ l der Zellsuspension jedes Testerstammes werden mit 10 ml einer geschmolzenen 1% Agar-Lösung (Agar in YPD-Medium), vermischt und als Top-Agar auf eine YPD-Platte gegossen. Die zu testenden Stämme werden zusammen mit Positiv- und Negativkontrolle (YPH499/YPH500) nach Erstarren des Top-Agars als Replika plattiert. Nach 1-2 Tagen Inkubation bei 30°C kommt es jeweils zur Ausbildung von konzentrischen Hemmhöfen um Kolonien des zu testenden Stammes, wenn der jeweilige Testerstamm den reziproken Paarungstyp besitzt. Diploide Zellen bilden mit beiden Testerstämmen keine Hemmhöfe aus, da sie keine Pheromone sekretieren.

#### **2.2.2.9. Plasmid *shuffling***

Die Methode des Plasmid *shuffling* wird in dieser Arbeit dazu verwendet, in einem *TCP1/CCT1* Deletionsstamm das Plasmid-kodierte WT *TCP1/CCT1*-Gen durch eine Plasmid-kodierte *tcp1/cct1*-Mutation zu ersetzen. Diese Methode bietet die Möglichkeit, essentielle Gene bzw. Mutationen dieser Gene innerhalb der Hefe zu analysieren. Hierzu wird ein haploider Hefestamm mit einem Plasmid transformiert (2.2.2.4.2.), das den Selektionsmarker *URA3* und die intakte Kopie des zu analysierenden, essentiellen Gens enthält. Anschließend wird die chromosomale Kopie des zu analysierenden Gens disruptiert (2.2.2.6.). Das Plasmid mit der intakten Kopie des Zielgens ermöglicht die Lebensfähigkeit der Zellen nach Disruption eines essentiellen Gens. Positive Transformanten, die beide Plasmide enthalten werden parallel auf eine SC-URA (Kontrolle) und eine SC-5'-FOA (5'fluoroorotic acid) Selektionsplatte ausgestrichen. Das *URA3*-Gen kodiert für ein Enzym (*orotidine-5'-phosphate decarboxylase*), das für die Urazil-Synthese

benötigt wird. Werden die Zellen auf SC-5'-FOA Medium kultiviert, wandelt die *URA3*-kodierte Decarboxylase 5'-FOA in das für Zellen toxische 5-Fluorourazil um. SC-5'-FOA Platten enthalten zusätzlich Urazil, demnach sind nur Zellen lebensfähig, die das *URA3*-Plasmid mit der Wildtyp Kopie des Zielgens verlieren und nur noch das Plasmid mit der Mutation im Zielgen besitzen. Um einen vollständigen Verlust des *URA3*-Plasmids zu gewährleisten, wird von der SC-5'-FOA Platte eine Einzelkolonie entnommen und erneut parallel auf SC-URA und SC-5'-FOA Platten ausgestrichen. Zellen, die auf SC-5'-FOA nicht aber auf SC-URA wachsen, besitzen nicht mehr die Wildtyp Kopie des Zielgens.

#### **2.2.2.10. Plasmid *Gap Repair***

Die Methode *Gap Repair* wird in dieser Arbeit dazu verwendet, Mutationen innerhalb eines Hefe-Gens auf einem Plasmid durch die korrekte chromosomale Hefesequenz zu ersetzen. Hierzu wird das entsprechende Plasmid einem Restriktionsverdau unterzogen, wodurch die Mutation innerhalb des Gens aus dem Plasmid herausgeschnitten wird (2.3.4.1.1.). Die Restriktionsenzyme werden so gewählt, dass nach dem Verdau das linearisierte Plasmid an beiden Enden noch ca. 40 Basen der Gensequenz besitzt. Diese 40 Basen dienen der Überlappung mit der chromosomalen Gen-Sequenz und ermöglichen somit ein Rekombinationsereignis. Kompetente Hefezellen werden mit dem linearisierten Plasmid transformiert (2.2.2.4.2.). Über homologe Rekombination wird die Lücke innerhalb des Hefe-Gens auf dem Plasmid mit chromosomaler Hefe-Sequenz geschlossen. Transformanden werden auf Selektionsplatten selektiert, da das autonom replizierende Plasmid für einen Selektionsmarker kodiert. Nachdem Plasmide aus Hefezellen isoliert wurden (2.3.3.), werden elektroporationskompetente *E. coli* Zellen mit den Plasmiden transformiert, um höhere Plasmid-Konzentrationen zu erhalten (2.2.1.2.4.). Anschließend wird das Zielgen auf dem Plasmid per Sequenzierung überprüft (2.3.4.5.).

#### **2.2.2.11. Wachstumstest von Hefen mittels seriellen Verdünnungen**

Zur Analyse des Phänotyps von Hefestämmen werden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf YPD-Platten transferiert und für ca. 3 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Diese Methode erlaubt den Vergleich des Kolonie-Wachstums von unterschiedlichen Hefestämmen. Da für die zu vergleichenden Stämme jeweils die gleiche Zellzahl auf das Medium transferiert wird, bietet diese Methode verlässlichere Ergebnisse als der Austrich einer Einzelkolonie. Hefestämmen, die in YPD-Flüssigmedium bis  $OD_{600}$  3 kultiviert worden sind, werden mit sterilem  $H_2O$  auf  $OD_{600}$  0,2 verdünnt. Mit dieser Ausgangsverdünnung werden im Folgenden 6 weitere, serielle Verdünnungen (1:10 in  $H_2O$ ) in einer sterilen Mikrotiterplatte (96-well) vorbereitet. Die verschiedenen Zellsuspensionen werden mit einem Stempel (sterile Stahlstifte) auf eine YPD Platte transferiert. Der Stempel besitzt einzelne Stifte, die exakt der Anordnung der Mikrotiterplatten-Vertiefungen (96-well) entsprechen und in die Zellverdünnungssuspensionen hineinragen. Der Stempel wird zügig aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte

herausgezogen und Zellsuspension-Tröpfchen mittels der einzelnen Stifte auf eine YPD-Platte transferiert; gegenüber einem langsamen Herausziehen des Stempels wird hierdurch vermieden, dass Zellsuspension-Tröpfchen ungleichmäßig an den einzelnen Stiften hängenbleiben können. Der Stempel wird für ca. 30 s auf der YPD-Platte belassen, um einen gleichmäßigen und vollständigen Transfer der Tröpfchen von den Stiften auf das Medium zu gewährleisten.

## 2.3. Molekularbiologische Techniken

### 2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Je nach gewünschter Menge und Qualität an isolierter Plasmid-DNS werden unterschiedliche Techniken durchgeführt. Zur DNS-Isolierung aus Zellen wird die Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) angewandt. Proteine und chromosomale DNS werden mittels Kaliumazetat gefällt. Der Plasmid-haltige Überstand wird durch Zugabe von Isopropanol gefällt (Plasmid-DNS Isolation im Kleinmaßstab). Während unter Verwendung des QIAfilter-Plasmid-Midi-Kits (Qiagen; Hilden/BRD) der Plasmid-haltige Überstand zusätzlich auf eine Anionenaustauschsäule geladen wird, wird unter Verwendung des QIAprep-Säulchen-Minipräparations-Kits (Qiagen; Hilden/BRD) eine Kieselgelmembran verwendet, um Verunreinigungen wie DNS-assoziierte Proteine zu vermindern.

#### 2.3.1.1. Plasmid-DNS Isolation im Kleinmaßstab

Ein *E. coli* Klon wird in Antibiotikum-haltigem TY-Medium (je nach Antibiotika-Resistenz: 100 µg/ml Ampizilin, oder 50 µg/ml Kanamycin) über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Etwa 1,4 ml Zellsuspension wird zentrifugiert (20000 g, 3 min), der Überstand verworfen, die Zellen in 300 µl Puffer A resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl Lösung B lysiert (vorsichtiges Schwenken). Zugabe von 300 µl Puffer C führt zur Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNS, während die Plasmid-DNS in Lösung blieb. Nach erneuter Zentrifugation (20000 g, 10 min) und Umfüllen des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß wird DNS nach Zugabe von 600 µl Isopropanol durch Mischen gefällt. Nach erneutem Zentrifugationsschritt (20800 g, 10 min) wird der Überstand verworfen und präzipitierte DNS mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (20000 g, 5 min). Der Überstand wird abgenommen, die präzipitierte DNS im Vakuum (Exikator) 1-2 min getrocknet und in 40 µl sterilem Wasser gelöst.

<b><u>Resuspensionspuffer (Puffer A):</u></b>	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA, pH 8
<b><u>Alkalische Lysislösung (Lösung B):</u></b>	200 mM NaOH, 1% SDS, pH 14
<b><u>Neutralisationspuffer (Puffer C):</u></b>	3 M Kaliumazetat, pH 5,5

### 2.3.1.2. Säulchen-Mini-Präparation Kit

Die hier verwendeten Säulchen (QIAprep-Säulchen-Minipräparation Kit) bestehen aus einer Kieselgelmembran. Nukleinsäuren werden in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen von dieser Silicagel-Membran adsorbiert, während unerwünschte Verunreinigungen wie Proteine in Lösung bleiben und ausgewaschen werden. Schließlich wird Plasmid-DNS mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration wieder in Lösung gebracht. Es werden 5 ml TY-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthält, mit einem *E. coli* Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird abzentrifugiert (20000 g, 3 min), Zellen in 250 µl Puffer A resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl Lösung B lysiert. Durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 (Zusammensetzung unbekannt) fallen Proteine und chromosomale DNS aus. Nach erneuter Zentrifugation (20000 g, 10 min) wird der Überstand auf das QIAprep Säulchen geladen und zentrifugiert (20000 g, 60 s). Es folgen Waschschriffe mit 500 µl PB und 750 µl PE (Zusammensetzung unbekannt; je 20000 g, 60 s). Um restlichen Puffer zu entfernen, wird das Säulchen nochmals - ohne Puffer Zugabe - zentrifugiert (20000 g, 1 min). Plasmid-DNS wird durch Zentrifugation (20000 g, 1 min) mit 100 µl 10 mM Tris/HCl pH8 eluiert.

### 2.3.1.3. Plasmid-DNS Isolation im mittleren Maßstab

Um Plasmid-DNS im größeren Maßstab zu gewinnen, wird das QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit verwendet. Dabei wird ein durch alkalische Lyse erzeugtes Bakterien-Lysat filtriert und auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet Plasmid-DNS an das Säulenmaterial, während RNS und Proteine in folgenden Waschschriffen mit Puffern mittlerer Salzkonzentration entfernt werden. Die Plasmid-DNS wird zuletzt mit Puffern hoher Salzkonzentration eluiert.

TY-Medium (25 ml), das das entsprechende Antibiotikum enthält, wurde mit einem *E. coli* Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird abzentrifugiert (3200 g, 15 min, 4°C) und die Zellen werden in 4 ml Puffer A resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung B wird die Suspension durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wird mit 4 ml Puffer C versetzt (vorsichtiges Schwenken) und Proteine und chromosomale DNS fallen aus. Das Lysat wird auf den Qiagen-Filter aufgetragen und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Qiagen-Säulenmaterial mit Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) äquibriert. Danach wird das gefilterte Lysat auf das Säulenmaterial aufgetragen, diese 2 x mit 10 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol) gewaschen und die DNS mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15% Isopropanol) eluiert. Durch Mischen mit 3,5 ml Isopropanol wird Plasmid-DNS gefällt, zentrifugiert (20000 g, 20 min, 4°C) und das DNS-Präzipitat mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen (20000 g, 5 min, 4°C). Das Präzipitat wird 1-2 min im Vakuum (Exikator) getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser gelöst.

### **2.3.2. Isolierung chromosomaler DNS aus *S. cerevisiae***

Als Vorlage zur Amplifikation von Hefe-Genen mittels PCR wird isolierte, chromosomale DNS verwendet. Als Ausgangsmaterial dienen ca. 1,5 ml einer Übernachtskultur (ca.  $9 \times 10^7$  Zellen). Die Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert (3000 g, 3min), in 200  $\mu$ l Protoplasten Puffer (1x Puffer A, 10  $\mu$ l/ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2 mg/ml Zymolyase 20T) resuspendiert und für 1-2 Std bei 37°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Für die Zellyse werden 200  $\mu$ l Lösung B zugegeben und die Proben werden 20 min bei 65°C inkubiert. Der Fortgang der Protoplastierung lässt sich optisch anhand der zunehmenden Klärung der Suspension verfolgen. Anschließend wird die Suspension auf Eis schnell abgekühlt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer C wird die Zellsuspension für 15 min auf Eis inkubiert. Präzipitiertes Kaliumdodezylsulfat und denaturierte Proteine werden anschließend durch Zentrifugation (20000 g, 3 min) entfernt und der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNS wird der Überstand mit 600  $\mu$ l Isopropanol versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird kurz zentrifugiert (20000 g, 0,5 min), um hochmolekulare, intakte chromosomale DNS zu präzipitieren. Die präzipitierte DNS wird mit 1 ml 70% Ethanol 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (20000 g, 0,5 min). Abschließend wird der Überstand abgenommen, das DNS-Präzipitat 1-2 min im Vakuum getrocknet und in 35  $\mu$ l Wasser gelöst.

### **2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNS aus *S. cerevisiae***

Die Isolierung von Plasmid-DNS unterscheidet sich von dem Protokoll zur Isolierung chromosomaler DNS in der Fällung der DNS. Anstelle eines kurzen Zentrifugationsschrittes wird die Plasmid-DNS mittels 10minütiger Zentrifugation präzipitiert. Sedimentierte DNS wird mit 0,5 ml 70% Ethanol für 10 min inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (20000 g, 5 min). Die gefällte Plasmid-DNS wird in 40  $\mu$ l Wasser gelöst. Da aus Hefezellen nur geringe Plasmid-Konzentrationen isoliert werden, werden kompetente *E. coli*s zunächst mittels Elektroporation mit Plasmiden aus Hefezellen transformiert. Das Verfahren der Elektroporation resultiert im Vergleich zur Transformation chemischkompetenter Zellen in einer größeren Zahl Transformanden. Für die Elektroporation von *E. coli*-Zellen wird 1  $\mu$ l Plasmid-DNS verwendet.

### **2.3.4. Klonierung von Plasmidkonstrukten**

#### **2.3.4.1. DNS-Modifizierung**

##### **2.3.4.1.1. Restriktionsendonuklease-Verdau von DNS**

Der sequenzspezifische Verdau von DNS wird mittels Restriktionsenzymen nach Angaben der Hersteller (NEB, Frankfurt/BRD; Roche, Basel/Schweiz) durchgeführt. Dabei können entweder glatte oder, bei versetztem Verdau einzelsträngige 3'- bzw. 5'-Überhänge entstehen. Das 3'-Ende trägt immer eine Hydroxylgruppe, das 5'-Ende immer eine

Phosphatgruppe. In der Regel werden maximal 1 U Enzym pro 1 µg DNS eingesetzt. Für den Verdau werden DNS, Enzyme, H<sub>2</sub>O und 10 x Reaktionspuffer vereint. Restriktionsansätze werden bei der für das Enzym geeigneten Temperatur mindestens 30 min für analytische und 2 Std für präparative Zwecke inkubiert. Endvolumina der Verdau-Ansätze betragen in der Regel für analytische Zwecke 20 µl und für präparative Ansätze 50-100 µl.

#### **2.3.4.1.2. Glätten überstehender DNS-Enden**

Für einige Klonierungen ist es erforderlich, überstehende Enden zu glätten. Sowohl 5'-, als auch 3'-überstehende Enden konnten mittels T4-DNS-Polymerase (NEB) geglättet werden. Dieses Enzym besitzt bei Abwesenheit von Nukleotiden im Reaktionsansatz eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, bei Anwesenheit von Nukleotiden eine 5'-3'-Polymeraseaktivität. Zum Auffüllen von 5'-überstehenden Enden wird der Restriktionsendonuklease-Verdau Ansatz (2.3.4.1.1.) für 30 min mit 1 U T4-DNS-Polymerase und 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2 mM) bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von 3'-überstehenden Enden werden die Verdau-Ansätze mit 1 U T4-DNS-Polymerase für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wie unter 2.3.4.1.3. beschrieben verfahren.

Alternativ werden 5'-überstehende Enden mittels des Klenow-Fragments der *E. coli* DNS-Polymerase I und durch Zugabe von dNTP-Mix aufgefüllt. Hierzu wird der Verdau-Ansatz mit 1 µl Klenow-Polymerase (5 U, NEB) und 1 µl dNTP-Mix (2 mM) vermischt und 25 min bei RT inkubiert.

#### **2.3.4.1.3. Dephosphorylierung**

Um bei Klonierungsexperimenten (Restriktionsverdau mit nur einem Enzym oder Verdau, die zu glatten Enden führen) die Ausbeute an rekombinaten Plasmiden zu erhöhen, werden vor Präparation der zu ligierenden DNS-Fragmente 5'-Phosphatgruppen des Vektors mit alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) hydrolysiert. Da die T4-DNS-Ligase die Verknüpfung von 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen katalysiert, die beim Verdau von DNS mit Restriktionsenzymen entstehen, kann nach Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppen des Vektors mit CIP dieser nicht mehr religieren.

Dephosphorylierung des Vektors wird nach Restriktionsenzym-Verdau und ev. nachträglich erforderlicher Modifikation der DNS-Enden (Glätten überstehender Enden) durchgeführt. Hierzu wird zum Reaktionsgemisch 1 µl/10 U CIP gegeben und anschließend mind. 30 min bei 37°C inkubiert.

#### **2.3.4.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS**

Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten werden 0,8% bis 1% Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gelschlitten, der mit einem Kamm versehen ist, gegossen. Nach Aushärtung des Gels wird das Gel in eine Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer gelegt. Die DNS-Proben werden mit 1/10 Volumen Ladepuffer vermischt, in Geltaschen geladen und bei 100 V in 1 x TAE-Puffer

elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 mg/ml in TAE-Puffer) inkubiert. Die DNS-Fragmente werden unter kurzwelligem Licht (254 nm) mittels des UV-Illuminators sichtbar, da das zwischen Basenpaare interkalierende Ethidiumbromid im Komplex mit DNS bei 590 nm im orangeroten Bereich des sichtbaren Lichts emittiert. Die Gele werden zur Dokumentation mittels einer Videokamera fotografiert. Durch die parallele Auftrennung eines Größenmarkers (1kb ladder) wird die Länge der DNS-Fragmente ermittelt.

#### **2.3.4.3. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelelen**

Die zu isolierenden DNS-Fragmente werden unter langwelligem UV-Licht (320 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNS wird mit Hilfe des Wizard Gel-Extraktions-Kits (Promega, Mannheim/BRD) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert. Hierzu wird das Gelstück mit Membran-Bindungslösung (1 µl/mg Gelstück) für 10 min bei 65°C schüttelnd (450 rpm, Thermomixer) inkubiert, um die Agarose zu verflüssigen. Danach wird das Gemisch in ein Säulchen überführt, 1 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (10000 g, 1 min). Der Durchlauf wird verworfen und das Säulchen mit 700 µl Membran-Waschlösung gewaschen (10000 g, 1 min). Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 500 µl Membran-Waschlösung gewaschen (10000 g, 1 min). Anschließend wird das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, die Membran zur Elution der DNS 1 min bei RT mit 25 µl 10 mM Tris/HCl pH8 inkubiert und zentrifugiert (10000 g, 1 min). Die eluierte DNS wird für Ligationen eingesetzt.

#### **2.3.4.4. Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4 DNS-Ligase**

T4-DNS-Ligase katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNS. Für die Ligation werden Vektor und einzufügendes Fragment im Verhältnis 1:7 eingesetzt und mit Ligationspuffer, 1 mM ATP und 1,2 U T4 DNS-Ligase vermischt (Endvolumen 10 µl). Der Reaktionsansatz wird bei RT für 4 Std (*sticky ends*) bzw. 8°C über Nacht (*blunt ends*) inkubiert. Um die Religationshäufigkeit des Vektors bestimmen zu können, wird zusätzlich nur Vektor-DNS mit Enzym, Puffer, ATP und Wasser inkubiert. Kompetente *E. coli*-Zellen werden mit 5 µl der Ansätze transformiert (s. 2.2.1.2.1.).

#### **2.3.4.5. Sequenzierung von DNS**

Für DNS-Sequenzierungen wird die Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) von der Firma Medigenomix (Martinsried/BRD) durchgeführt. Hierzu werden 700 ng DNS und 10 pmol Oligonukleotide pro Sequenzierreaktion bereitgestellt. In Gegenwart fluoreszierender Nukleotide (AbiPRISM; Forster City, USA) wird mittels DNS-Polymerase ein DNS-Strang synthetisiert. Jedes der 4 Didesoxyanaloga hat eine spezifische Fluoreszenzmarkierung in einer anderen Farbe. Aus der Sequenz der Farben ergibt sich

direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung die Basensequenz. Die Auswertung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem Programm Chromas (Technelysium Pty Ltd; Tewantin/Australien)

Zur Konzentrationsbestimmung der DNS wird Midi-Plasmid DNS 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Proben werden in Quarzküvetten im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für doppelsträngige DNS entspricht OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Um mögliche Pipettierfehler auszuschließen, werden jeweils 3 unabhängige Plasmid-Verdünnungen gemessen.

### 2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wird in dieser Arbeit zur Klonierung von Plasmidkonstrukten, zur Integration von DNS-Sequenzen in das Genom von *S. cerevisiae*-Stämmen, bzw. zur Analyse von Integrationen in das Hefe-Genom benutzt.

PCR-Reaktionen werden in einem Volumen von 100 µl (50 µl Ansätze: zur Analyse von Integrationen in das Genom) mit ca. 0,2 µg Plasmid-DNS bzw. 0,2-1 µg genomischer DNS in PCR-Puffer (Pfu-Puffer, Stratagene; Herkulase-Puffer, Stratagene; Taq-Puffer + MgCl<sub>2</sub>-Lösung; NEB, Frankfurt/BRD) durchgeführt. Außerdem beinhalteten die Ansätze 1 µM Oligonukleotid-Primer, 0,2 mM der Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 0,2-5 U Polymerase (Turbo-Pfu und Herkulase: Stratagene, La Jolla/USA; ; Taq, NEB, Frankfurt/BRD). Polymerasen werden im Anschluss nach Start-Denaturierung zum Ansatz gegeben.

1	Start-Denaturierung	95°C	3 min
2	Denaturierung	95°C	50 s
3	Anlagerung der Oligonukleotide	abhängig von den Oligonukleotiden (~48-54°C)	50 s
4	Elongation	72°C	abhängig von der Produktgröße und Polymerase (Elongationszeiten: Taq: 1 min/kb, Pfu: 3 min/kb, Herkulase: 1 min/kb)
5	Abschluss-Elongation	72°C	10 min
6	Abkühlung	4°C	

Ein Amplifikationszyklus (Schritt 2-4) wird 28-30 mal wiederholt. Im Anschluss an die Reaktion werden 5 µl PCR-Produkt einer Analyse mittels Agarose-Gel Elektrophorese unterzogen.

### 2.3.6. Fällern von DNS

Zur Fällung der PCR-Produkte wird der Ansatz mit 1 ml 100% EtOH für 30 min in Trockeneis inkubiert und zentrifugiert (20800 g, 15 min, 4°C). Plasmid-DNS, die kaum Salze enthält, wird vor dem Inkubationsschritt in Trockeneis zusätzlich mit 1/10 Volumen Natriumazetat (Stocklösung: 3 M, pH 3) und 2,5 Volumenanteilen 100% Ethanol (Endkonz. 70%) versehen und gut durchmischt. Das Präzipitat nach Zentrifugation wird mit 500 µl

70% EtOH gewaschen (20800 g, 5 min, 4°C), die DNS getrocknet und je nach DNS-Menge in 40-60 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.3.7. Insertion eines DNS-Fragments in den pCR-TOPO 2.1 Vektor**

Unter Verwendung des *TOPO TA Cloning Kits* (Invitrogen, Karlsruhe/BRD) lässt sich ein PCR-Produkt in kurzer Zeit in den TOPO-Vektor einfügen. Der Kit enthält linearisierten TOPO-Vektor mit 3'-T Überhängen. An die 3'-Phosphatreste des Vektors ist kovalent Topoisomerase (*Vaccinia Virus*) gebunden. Topoisomerase fügt die Enden von linearisiertem Vektor und einem PCR-Produkt mit 3'-A-Überhängen zusammen. Die erfolgreiche Integration des PCR-Produktes zerstört das lacZ $\alpha$  Fragment des Vektors, wodurch nach Transformation positive Klone anhand einer blau/weiß Selektion mittels X-Gal ermittelt werden können. Nach Anleitung des Herstellers wird zunächst ATP an die 3'-Enden der amplifizierten DNS angehängt. Hierzu werden 3 mM ATP, 1 x Taq-Polymerase Puffer (Mg<sup>2+</sup>-frei), 0,5 U Taq-Polymerase und 7,5 µl PCR-Produkt (2.3.5.) vermischt und für 15 min bei 72°C in einer PCR-Apparatur inkubiert. Anschließend wird 1 µl des Ansatzes mit 0,5 µl pCR-TOPO 2.1 Vektor, 0,5 µl TOPO-Salzlösung und 0,5 µl sterilem H<sub>2</sub>O vereint und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen, werden diese auf eine mit 40 µl X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; 40 µg/µl in DMF) beschichtete Selektionsplatte zur Blau/Weiß Selektion plattiert.

### **2.3.8. DNS-Markierung durch Einbau Digoxygenin-gekoppelten Desoxyuridins**

Die als Sonde in einer Hybridisierungsreaktion (2.3.9.) einzusetzende DNS wird mit Hilfe des *DIG DNA Labeling Mixes* (Roche, Basel/Schweiz) markiert. Bei dieser Methode binden Hexanukleotide an mehrere Stellen an die denaturierte DNS-Matrize und dienen als Primer für die DNS-Synthese, wobei Digoxygenin-11-dUTP eingebaut wird. Hierzu wird die zu markierende DNS (ca. 2-3 µg PCR-Produkt; 2.3.5.) über ein Agarose-Gel gereinigt (2.3.4.3), in 15 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert. Der DNS-Lösung werden 2 µl Hexanukleotid-Mix (Roche, Basel/Schweiz) sowie 1 µl Klenow-Polymerase I zugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die markierte DNS konnte bei -20°C gelagert werden und nach Denaturierung als Sonde in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

### **2.3.9. Kolonie-Hybridisierung**

Die Kolonie-Hybridisierung dient der Identifizierung von Bakterienkolonien, die ein spezifisches Plasmid enthalten. Zunächst werden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Plasmid transformiert (2.2.1.2.1.). Ein Hybond-N-Nylonfilter (Amersham, Freiburg/BRD) wird auf Größe der Agarplatte zugeschnitten. Der Filter wird luftblasenfrei auf die Agarplatte mit gewachsenen Bakterienkulturen transferiert und anschließend vorsichtig abgezogen. Auf diese Weise wird ein Replika der Bakterienkolonien auf dem Filter

hergestellt. Um Kolonien auf dem Filter denen auf der Agarplatte zuordnen zu können, werden zuvor sowohl Agarplatte und Filter markiert. Der abgezogene Filter wird mit den Kolonien nach oben auf eine Agarplatte gelegt und für ca. 2 Std bei 37°C inkubiert (Kolonien wuchsen auf ca.  $\varnothing$  0,5-1 mm an). Um die bakterielle Proteinbiosynthese zu hemmen, nicht aber die Plasmid-Amplifikation wird der Filter auf eine Agarplatte mit Chloramphenicol transferiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 4 Whatman-Papiere werden auf Größe einer Petrischale zugeschnitten, in leere Petrischalen gelegt und nacheinander mit jeweils 2 ml der folgenden Lösungen befeuchtet: Lösung A (10% SDS), Lösung B (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), Lösung C (1,5 M NaOH, 0,5 M Tris/HCl pH8) und 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM NaCitrat, pH7). Zur Zellyse wird der Filter (Kolonien nach oben) nacheinander für je 3 min auf Whatman-Papiere in den unterschiedlichen Petrischalen gelegt. Anschließend wird freigesetzte DNS durch 2stündige Inkubation bei 80°C im Hybridisierungssofen auf dem Filter fixiert. Zelltrümmer werden durch Waschen der Filter (50 ml Tris/HCl pH8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) für 1,5 Std bei 42°C entfernt. Die Filter werden wie unter 2.3.10. beschrieben weiterbehandelt.

### 2.3.10. Southern-Hybridisierung

Der mittels Koloniehybridisierung (2.3.9.) mit DNS-beladene Filter wird im Hybridisierungssofen für 5 Std bei 68°C mit 20 ml Prähybridisierungslösung (0,75 M NaCl, 75 mM NaCitrat pH7, 0,1% Laurylsarkosin, 0,02% SDS, 1% Blockierreagenz von Roche, Basel/Schweiz) inkubiert. Anschließend werden 15 ml der Prähybridisierungslösung entfernt. Die restlichen 5 ml werden mit DIG-markierter Sonde (2.3.8.) versetzt und mind. 5 Std bei 68°C mit dem Filter inkubiert. Anschließend wird der Hybridisierungsmix entfernt. Der Filter wird 2 x 5 min mit je 50 ml Puffer 1 (0,3 M NaCl, 30 mM NaCitrat pH 7, 0,1% SDS) bei RT, 2 x 15 min mit je 50 ml Puffer 2 (15 mM NaCl, 1,5 mM NaCitrat pH 7, 0,1% SDS) bei 68°C und 1 x 5 min mit 50 ml Puffer 3 (0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20) bei RT gewaschen. Die Hybridisierung wird durch einen enzymkonjugierten Antikörper, der gegen Digoxygenin (DIG; aus *Digitalis purpurea*) gerichtet ist (Roche, Basel/Schweiz), nachgewiesen. Dazu wurde der Filter nach 1stündigem Waschen in Puffer 4 (1% Blockierreagenz von Roche, 0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 150 mM NaCl) für 30 min mit dem Konjugat aus anti-DIG Antikörper und alkalischer Phosphatase (1:1000 in Puffer 4 verdünnt) inkubiert. Anschließend wird 2 x 15 min mit 20 ml Puffer 3 und 5 min mit 20 ml Puffer 5 (0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>) bei RT gewaschen. Die 20 ml Puffer 5 werden mit 135  $\mu$ l NBT (Nitroblau Tetrazolium 50 mg/ml in DMF) und 70  $\mu$ l BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl Phosphat 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O) versetzt. Unter Lichtabschluss wird der Filter solange mit dem Puffer-Gemisch inkubiert bis blaue Punkte auf dem Filter sichtbar werden (ca. 30 min). Die an die DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung von BCIP zu einem instabilem Intermediat, das mit NBT in einer Redoxreaktion reagiert. Die beiden löslichen Produkte BCIP und NBT

werden dabei in rote bzw. blaue und jeweils wasserunlösliche Verbindungen umgesetzt. Da die DIG-markierte Sonde nur an komplementäre DNS-Fragmente hybridisieren kann, wird auf dem Filter nur DNS von Kolonien angefärbt, die das entsprechende Gen enthält. Nach den Waschschritten führt ein Vergleich dieses Musters mit den Kolonien auf der Agarplatte führt zur Identifizierung von Transformanten.

## **2.4. Proteinbiochemische Techniken**

### **2.4.1. Gel- und Western-Blot Techniken**

#### **2.4.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970). Die Gele werden aus Acrylamid, N-N'-Methylen-bisacrylamid, TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt. Wird APS in H<sub>2</sub>O gelöst, so bildet es freie Radikale, die auf das Acrylamid übertragen werden und zur Polymerisation führen. Dadurch entstehen lange Polymerketten, die in Anwesenheit von N-N'-Methylen-bisacrylamid quervernetzt werden. Es werden 7,5%, 10%, 12% oder 15% Trenngele (Minigel: 6x9x0,75 cm) mit 4%igen Sammelgelen verwendet. Gewöhnlich werden Gele mit 12 bzw. 15 Geltaschen hergestellt. Für die Qualitätsbestimmung polyklonaler Seren bei der Herstellung von Antikörpern oder zur präparativen Protein-Isolierung werden Gele mit einer kleinen Tasche für die Markerproteine und 1 bzw. 2 großen Taschen für die Protein-Probe hergestellt (2.4.5.).

SDS bindet an die hydrophoben Regionen eines Proteins, dabei dissoziieren Proteine in ihre Untereinheiten. Die durch SDS-Bindung eingeführte negative Ladung überdeckt alle sonstigen Ladungen der Proteine. Das Sammelgel besitzt einen geringeren pH-Wert als das Trenngel. Im Laufpuffer liegt das Glyzin in 2 Formen vor. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen der ungeladenen Form (Zwitterion) und dem Glyzinat mit der Ladung -1. Bei der Elektrophorese wandern Cl<sup>-</sup>-Ionen, Proteine und das Glyzin im elektrischen Feld in Richtung Anode. Im Sammelgel wird das Gleichgewicht des Glyzins aufgrund des sauren pH-Wertes in Richtung der Zwitterionen verschoben, die im elektrischen Feld nicht wandern. Dadurch entsteht ein Mangel an beweglichen Ionen, der durch erhöhte Spannung zwischen den am schnellsten laufenden Cl<sup>-</sup>-Ionen und den nachfolgenden Glyzinat-Ionen ausgeglichen wird. Die stark negativ geladenen Proteine wandern in diesem lokal hohen elektrischen Feld sehr schnell, werden auch durch die großen Poren des Sammelgels in ihrem Laufverhalten wenig behindert. Sobald die Proteine aber die Cl<sup>-</sup>-Ionen erreichen, werden sie in ihrer Bewegung abgebremst, da dort, wo die Cl<sup>-</sup>-Ionen laufen, kein Ionen-Mangel herrscht, demzufolge auch die hohe Feldstärke nicht vorhanden ist. Dadurch entsteht ein Sammeleffekt, bzw. eine starke Ansammlung der Proteine in einer schmalen Bande zwischen Cl<sup>-</sup>-Ionen und Glyzin. Beim Übergang ins Trenngel wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine aufgrund der kleineren Porengröße des Gels

verringert, die Glyzin-Zwitterionen gehen in den geladenen Zustand über (pH-Wert > IP von Glyzin), und der Mangel an Ionen wird aufgehoben. Im Trenngel werden die Proteine nun nach Größe getrennt.

Zusammensetzung	4%	7,5%	10%	12%	15%
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	333 µl	1,25 ml	1,67 ml	2 ml	2,5 ml
1.5M Tris/HCl pH8	-	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
0,5M Tris/HCl pH6,8	625 µl	-	-	-	-
10% SDS	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10% APS	12,5 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O ad	2,5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS				

In der Regel werden Proben mit 1/5 Volumenanteil Laemmli-Probenpuffer (2.1.3.) gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend werden nichtlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 5 min bei 20000 g abgetrennt (denaturierte Hefeextrakte werden in HU-Probenpuffer, 2.4.2.1., aufgenommen). Das Gel wird in seiner Apparatur an den elektrischen Stromkreis angeschlossen (Stromstärke: 25 mA). Zum Größenvergleich der Proteine werden Protein-Marker verwendet (2.1.9.1.).

#### 2.4.1.2. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (native PAGE)

Die Auftrennung von TRiC und GimC nach Ladung und Größe erfolgte unter nativen Bedingungen mit einem 12,5% Bis-Tris-Gel und einem 2-Puffersystem.

Zusammensetzung	12,5%
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	2,08 ml
3 x Gelpuffer (1,5 M Aminocarbonsäure, 150 mM Bis-Tris pH 7)	1,67 ml
Glyzerin (v/v 100%)	0,79 ml
H <sub>2</sub> O	0,44 ml
10% APS	16,7 µl
TEMED	1,7 µl
Endvolumen	5 ml

Das Gel wird in eine Gelkammer eingespannt (BioRad, Hercules/USA). Die innere Gelkammer wird mit Kathodenpuffer (50 mM Trizin, 15 mM Bis-Tris pH 7), die äußere mit Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris pH 7) aufgefüllt. Die Proteinprobe wird in Probenpuffer für native Gele (2.1.3.; Verhältnis 1:2) aufgenommen und in die Geltasche geladen. Die Auftrennung nach Ladung und Größe erfolgte bei ca. 300 V (oder 13 mA) im Kühlraum. Anschließend wird das Gel einer Coomassie-Färbung (2.4.1.6.1.) unterzogen.

#### 2.4.1.3. Western Blots

Zum Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran wird ein Western-Blot mit einer *semi dry* Blotapparatur durchgeführt. Hierzu wird nach erfolgter Elektrophorese das SDS-Gel für ca. 5 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Whatman-3MM Papiere und Transfermembran (Schleicher und Schüll) werden zuvor auf die Größe von 6 x 9 cm (entspricht Fläche des Trenngels) zugeschnitten. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, werden einzeln Puffer-getränkte Whatman Papiere, Transfermembran und SDS-Gel Lufblasen-frei

übereinander gestapelt. Hierzu werden zunächst auf die Anodenplatte der Blotapparatur 3 in Anodenpuffer I getränkte Whatman Papiere gelegt, gefolgt von 3 Whatman Papieren und der Transfermembran in Anodenpuffer II. Auf die Nitrozellulose-Membran wird das zuvor mit Anodenpuffer II äquilibrierte Gel gelegt. Den Abschluss bilden 6, in Kathodenpuffer getränkte Whatman Papiere und die Kathodenplatte der Blotapparatur. Der Proteintransfer erfolgt bei einer Stromdichte von ca.  $0,93 \text{ mA/cm}^2$  für 1 Std (bei TCA-Extrakten in HU-Probenpuffer für 1,5 Std.). Anschließend wird die Nitrozellulose-Membran für einige Minuten in einer PonceauS Lösung (0,2% (w/v) PonceauS, 3% (v/v) Trichloroessigsäure) inkubiert, um die Effizienz und Qualität des Protein-Transfers abschätzen zu können. Nach Markierung der Proteinbanden des Markers wird die Färbelösung abgegossen und die Membran durch Inkubation mit TBS-Tween (50 mM Tris/HCl pH7,6, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween) entfärbt.

<b><u>Anodenpuffer I:</u></b>	0,3 M Tris, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4 mit HCl einstellen
<b><u>Anodenpuffer II:</u></b>	25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, pH 10,4 mit HCl einstellen
<b><u>Kathodenpuffer:</u></b>	40 mM Norleuzin, 20% (v/v) Methanol, pH 7,6 mit 1 M Tris/HCl Puffer einstellen

#### **2.4.1.4. Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen**

Die Nitrozellulose-Membran wird 1 Std bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in Blockierlösung (5% (w/v) Magermilchpulver, in TBS-Tween) inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran mit primären Antikörpern (verdünnt in TBS-Tween) für 2 Std bei RT schwenkend inkubiert. Die Blot-Membran wird anschließend 3 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen und dann für 2 Std. mit an alkalischer Peroxidase (HRP, *horse raddish peroxidase*) gekoppelten sekundär Antikörpern (Ziege anti-Kaninchen oder Schaf anti-Maus) inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut 3 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Zur Detektion wird das ECL (*enhanced chemiluminescence*) System von Amersham Bioscience verwendet. Das Prinzip der Chemilumineszenz beruht auf Anregung von Elektronen bestimmter Moleküle durch eine enzymatische Reaktion. Kehren die Elektronen in ihren Grundzustand zurück, geben sie Energie ab, die im Bereich des sichtbaren Spektrums liegt. In einem ECL-System wird HRP/Wasserstoffperoxid-katalysierte Oxidation von Luminol (im basischen Milieu) genutzt. Die Lichtemission liegt bei 428 nm, wodurch eine Schwärzung eines photographischen Films (Amersham Pharmacia, Freiburg/BRD; Filmentwicklung: X-Omat, Kodak, Stuttgart/BRD) erfolgt. Alternativ erfolgt die Detektion der Signale mit einer CCD-Kamera (*LAS-3000 Luminescent Image Analyser*, Fuji, Stamford/USA).

#### **2.4.1.5. Präparative Protein-Isolierung aus SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur präparativen Auftrennung von Proteinen werden SDS-Polyacrylamidgele mit einer kleinen Geltasche für den Marker und einer großen Geltasche für die Proteinprobe hergestellt (2.4.1.1.). Somit konnte die gesamte Gel-Breite als Trennfläche ausgenutzt werden. Nach beendeter Auftrennung wird das SDS-Gel einer Kupferchlorid-Färbung

unterzogen (2.4.1.6.3.). Die entsprechende Proteinbande wird in Form eines vertikalen Streifens aus dem Gel herausgeschnitten und einer Elektroelution unterzogen.

#### **2.4.1.5.1. Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen**

Im Anschluss an die Kupferchlorid-Färbung werden Gelstückchen durch 3 x 10 min Waschen (0,25 mM EDTA, 0,25 mM Tris/Cl, pH9) entfärbt. Das Gelstückchen wird in ein Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml *Soak Buffer* (125 mM Tris/HCl pH6,8, 0,5% SDS, 4 M Harnstoff) für ca. 30 min bei RT äquilibriert. Um die Aggregation unlöslicher Proteine während der Elektroelution zu verhindern, enthält der Puffer Harnstoff. Anschließend wird das Gelstückchen in einen Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe) überführt. Für eine effiziente Elektroelution sollten im Dialyseschlauch keine Luftblasen vorhanden sein. Entsprechend der Größe des aus dem SDS-Gel zu isolierenden Proteins, ist das Ausschlussvolumen des Dialyseschlauchs zu berücksichtigen (z.B. 12-14 kDa). Die Elektroelution von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte mit Hilfe einer Elektrophorese-Kammer. Der Dialyseschlauch wird in die Puffer-gefüllte (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS, 4 M Urea) Gelkammer gelegt. Die Elektroelution erfolgte 2-3 Std bei 60 mA. Im elektrischen Feld wandern die durch SDS-Bindung negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode heraus. Im Gegensatz zu Salzen und kleinen Molekülen, die die Poren des Dialyseschlauches passieren können, verbleiben die zu reinigenden Proteine bei der angelegten elektrischen Spannung im Dialyseschlauch. Anschließend werden die Proteine zur Lagerung in ein Reaktionsgefäß überführt.

#### **2.4.1.6. Färbung von Proteingelen**

##### **2.4.1.6.1. Coomassie-Färbung**

Im sauren Milieu färbt der Coomassie-Farbstoff Polypeptide an (Nachweisgrenze: ca. 100-50 ng Protein). Dabei werden hauptsächlich Polypeptidketten mit vielen basischen- und aromatischen Resten gefärbt. Polyacrylamidgele werden nach Elektrophorese (2.4.1.1.) für ca. 30 min in Färbelösung (0,25% *Brilliant blue* R250 von Serva, 7% Essigsäure, 50% Methanol) geschwenkt. Dabei dient Essigsäure der Fixierung von Proteinen im Gel, das durch den Farbstoff *Brilliant blue* angefärbt wird. Durch wiederholtes Wechseln der Entfärbelösung (7% Essigsäure, 50% Methanol) wird der Farbstoff aus proteinfreien Bereichen des Gels selektiv gelöst, während Proteine aufgrund des gebundenen Farbstoffs Blau-gefärbt bleiben.

##### **2.4.1.6.2. Silber-Färbung**

Die Silber-Färbung ist eine hochempfindliche Methode Proteine (ca. 0,3 ng Protein) in SDS-Gelen anzufärben. Hierzu werden die Proteine im Gel zunächst fixiert (7% Essigsäure, 50% Methanol). Anschließend wird das Gel 2 x 1 Std in Inkubationslösung (0,5 g Natrium Thiosulfat, 10,3 g Natrium Azetat, 1,3 ml Glutaraldehyd, ad 250 ml H<sub>2</sub>O ) geschwenkt. Anschließend werden die Gele 3 x 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Gele

werden 30 min in Silber-Lösung (250 mg AgNO<sub>3</sub>, 150 µl Formaldehyd, ad 250 ml H<sub>2</sub>O ) inkubiert. Die Silberionen werden in der Gelmatrix bei pH-Werten >10,5 durch Komplexbildung an Proteine gebunden. Nicht komplexierte Silberionen werden durch Waschen in H<sub>2</sub>O entfernt. Anschließend wird das Gel 5 min in Entwicklerlösung (6,25 g NaCO<sub>3</sub>, 25 µl Formaldehyd, ad 250 ml H<sub>2</sub>O ) geschwenkt. Die Proteinfärbung wird durch Reduktion der an den Proteinen komplexierten Silberionen hervorgerufen. Der Gel-Transfer in die Stopp-Lösung (7,3 g EDTA, ad 500 ml H<sub>2</sub>O, pH8) stoppt die Färbereaktion.

#### **2.4.1.6.3. Kupferchlorid-Färbung**

Zum Anfärben von präparativen SDS-Polyacrylamidgelen (2.4.1.5.) wird die Kupferchlorid-Färbemethode verwendet. Hierzu wird das Gel zum Entfernen von Puffer-und SDS-Resten mehrfach in Wasser gewaschen. Anschließend wird das Gel 5 min in Färber (0,3 M CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) und 2 x 10 min in H<sub>2</sub>O geschüttelt. Bei dieser Methode wird nur Gel-Hintergrund und nicht Proteine durch Kupferchlorid angefärbt (Negativfärbung). Die Proteine werden als durchsichtige Bande aus dem Gel herausgeschnitten und einer Elektroelution unterzogen (2.4.1.5.1.).

#### **2.4.1.7. Trocknen von Proteingelen**

Zum Trocknen wird das Gel zwischen zwei befeuchtete Zellophan-Folien gespannt und für ca. 2 Std in einem Geltrockner (*Gel Dryer*, BioRad, Hercules/USA) inkubiert.

Werden radioaktiv-markierte Proben analysiert, wird das entfärbte und gewässerte Gel auf Whatman Papier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und im Geltrockner unter Vakuum und Hitze für 2 Std bei 70°C getrocknet. Anschließend werden die einzelnen Markerbanden radiaktiv markiert. Das auf Whatman Papier getrocknete Gel wird in eine Foto-Kassette gelegt und über Nacht ein *Phosphoimager Screen* aufgelegt (2.4.1.8.).

#### **2.4.1.8. Phosphoimaging und Quantifizierung**

Eine Computer-gestützte Visualisierung und Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wird mittels Phosphoimaging durchgeführt. Auf die getrockneten Gele wird über Nacht ein *Phosphoimager Screen* aufgelegt. Die Signale werden von einem Phosphoimager (Fuji-FLA2000) ausgelesen und mit dem Computer-Programm AIDA (Raytest) ausgewertet. Für die Quantifizierung werden Signale, die dem Vollängenprotein entsprechen, verwendet. Für die Auswertung von *in vitro* Transkriptions-/Translationsexperimenten (2.4.10.) werden mindestens 3 unabhängige Versuche herangezogen und der Mittelwert aus den quantifizierten Signalen gebildet. Die Abweichung um den Mittelwert wird als Standardfehler (*standard error*, S.E.; Standardabweichung dividiert durch Wurzel der Anzahl unabhängiger Experimente) angegeben.

## 2.4.2. Herstellung von Zellextrakten

### 2.4.2.1. Herstellung von denaturierten Hefe-Extrakten (TCA-Extrakte)

Diese Methode dient der Herstellung von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen. Für den TCA-Aufschluss werden entweder 3 OD<sub>600</sub> einer Übernachtskultur eines Hefestamms oder eine äquivalente Menge an Zellmaterial mit einem Zahnstocher einer Platte entnommen. Das Zellpellet wird in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Zur Zellyse sowie zur Reduktion von Disulfidbrücken wird die Zellsuspension mit 150 µl 1,85 M NaOH + 7,5% β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Proteine werden durch Zugabe von 150 µl TCA (55% w/v) auf Eis für 10 min gefällt. Nach Zentrifugation (15 min bei 20000 g und 4°C) wird der Überstand vollständig entfernt und das Präzipitat wird in HU-Puffer (200 µl/3 OD<sub>600</sub>; 2.1.3.) resuspendiert. Zur Analyse mittels SDS-PAGE werden Proben für 10 min bei 65°C inkubiert und nicht gelöste Bestandteile abgetrennt (16100 g, 5 min).

### 2.4.2.2. Herstellung von nativen Hefe-Extrakten

#### 2.4.2.2.1. Aufschluss von Hefezellen im kleinen Ansatz

Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur werden geerntet (2400 g, 3 min, 4°C) und mit kaltem PBS oder Lysepuffer (je nach Experiment) gewaschen. In einem 50 ml Zentrifugengefäß wird das Zellpellet in 500 µl gekühltem Lysepuffer + Protease-Inhibitoren aufgenommen. Anschließend werden zur Suspension ein äquivalentes Volumen Glasperlen (ø 425-600 µm, Sigma) gegeben. Zum Aufschluss wird die Zellsuspension für 8 x 30 s stark durchmischt (Vortex). Zwischen den Intervallen wird die Suspension 30 s auf Eis gekühlt. Die Effizienz des Zellaufschlusses wird mikroskopisch überprüft. Anschließend wird das Lysat in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die Glasperlen werden mit ca. 3 x 250 µl Lysepuffer gewaschen, welcher mit dem Lysat vereint wird. Zur Abtrennung von Zellwandresten und nicht-aufgeschlossenen Zellen wird das gesamte Lysat zentrifugiert (1000 g, 3 min, 4°C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Trennung löslicher und unlöslicher Proteine zentrifugiert (20800 g, 10 min, 4°C). Aliquots der löslichen Fraktion (Endkonz. 1 µg/µl) bzw. äquivalente Volumina der unlöslichen Fraktion werden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

#### 2.4.2.2.2. Aufschluss von Hefezellen im großen Ansatz

Für den Zellaufschluss des *TCP/CCT*-Überexpressionsstammes zur Reinigung von TRiC (2.4.4.2.) werden 300 g gefrorene Zellsuspensionströpfchen (bei -80°C gelagert) in Zentrifugengefäße gefüllt und mit Lysepuffer + Protease-Inhibitoren (1 g Zellmaterial/ml Puffer) versetzt. Die Zellen werden unter Bewegung auf dem Rollmixer aufgetaut. Der Aufschluss erfolgt mechanisch mittels Glasperlen in *Bead Beatern* (BioSpec,

Bartlesvill/USA) bei 4°C. Hierzu werden in 3 Aufschlussgefäße je 200 g Glasperlen gefüllt. Anschließend wird die Zellsuspension in die Gefäße transferiert. Unter Rühren werden Glassperlen und Suspension gut durchmischt, um unerwünschte Lufteinschlüsse zwischen den Glasperlen zu entfernen. Auf diese Weise sollte während der Lyse die Schaumbildung und damit Proteindenaturierung reduziert werden. Anschließend werden die Aufschlussgefäße mit Lysepuffer bis zum Rand aufgefüllt. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe eines Rotors über einen Zeitraum von 40 min im 90 s Intervall für jeweils 30 s. Zur Kühlung wird das Aufschlussgefäß von einem Salz-Eisgemisch umgeben, um die Temperatur auf -10°C zu erniedrigen. Die Effizienz des Zellaufschlusses betrug > 95%. Anschließend wird das Lysat in ein vorgekühltes Becherglas umgefüllt. Restbestände von Lysat werden mit ca. 200 ml Lysepuffer mittels einer Fritte und einer Vakuumpumpe von den Glasperlen gewaschen. Anschließend wird das gesamte Lysat (ca. 900 ml) zur Abtrennung von Zellwandresten und nicht-aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (1000 g, 10 min, 4°C, Beckman, JA 20 25). Der Überstand wird zur Gewinnung der löslichen Proteine des Zell-extraktes erneut zentrifugiert (18600 g, 30 min, 4°C, Beckman, JA 20 25). Das Sediment wird in einem Volumen Lysispuffer resuspendiert, das dem Volumen des Überstandes entsprach. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration werden Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Hierzu wird ein Aliquot des Überstands (ca. 10 µl) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt (Endkonz. 1 µg/µl). Für die Sediment-Probe wird eine dem Überstand äquivalente Probe entnommen und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt.

#### **2.4.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration von Proteinen wird mit BioRad Reagenz (1:5 in H<sub>2</sub>O) nach dem Prinzip der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Das Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Blau, der an basische und aromatische Aminosäurereste bindet. Die dadurch verursachte Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm wird photometrisch bestimmt und zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Es werden 900 µl BioRad Reagenz mit 1 µl der Proteinprobe gut vermischt und nach 5 min Inkubation die Absorption bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung werden die gemessenen Absorptionen mit einem Faktor multipliziert, der mittels einer Eichkurve mit BSA-Eichstandard unterschiedlicher Konzentrationen (0,25 - 2 µg/µl) ermittelt wird.

#### **2.4.3. Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli***

Soweit nicht anders erwähnt, werden für Überproduktion und Reinigung von Proteinen BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Diese Zellen sind lysogen für den DE3-Phagen und enthalten dadurch eine Kopie des T7A1-Gens, das für die T7-RNA-Polymerase kodiert und seinerseits unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren lacUV S-Promotors steht. BL21 enthält zusätzlich das pLysS-Plasmid, welches die konstitutive Expression geringer Mengen von T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, bewirkt.

Gene zur rekombinanten Expression unter der Kontrolle des T7-Promotors werden nur dann transkribiert, wenn die relative Menge an T7-RNA-Polymerase innerhalb der Zelle durch IPTG-vermittelte Expression die Menge an T7-Lysozym übersteigt.

#### **2.4.3.1. Induktion von Genen und Ernte von Bakterienzellen**

In der Regel werden Kulturen mit einem Volumen von 20 ml oder 800 ml für Testversuche verwendet. Diese werden mit einer 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur inokuliert. Soweit nicht anders erwähnt wird bei einer  $OD_{600}$  von ca. 0,5-0,6 die Expression durch IPTG-Zugabe (0,5 mM Endkonz.) bei 37°C induziert. Es werden Proben vor und nach Induktion entnommen und auf ca.  $OD_{600}$  0,5 verdünnt. Für einen Induktionstest werden Proben im Abstand von 2, 4 und 6 Std nach Induktion entnommen. Die  $OD_{600}$  wird photometrisch bestimmt und äquivalente Zellmengen werden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, um anhand SDS-PAGE und Coomassie-Färbung die optimale Induktionszeit für die Expression bestimmen zu können.

Für die Reinigung werden die Zellen zentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C), in Puffer mit Protease Inhibitoren aufgenommen und in Trockeneis eingefroren. Die gefrorene Zellsuspension wird bei -20°C oder -80°C gelagert. Die Reinigung erfolgt anhand von Affinitätschromatographie mittels GST-tags oder 6His-Epitope der Fusionsproteine.

#### **2.4.3.2. Lyse von Bakterienzellen**

##### **2.4.3.2.1. Lyse von BL21(DE3)pLysS Zellen durch Einfrieren und Auftauen**

BL21(DE3)pLysS Zellen können aufgrund des Plasmid-kodierten Lysozyms durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert werden. Die durch Einfrieren gebildeten Kristalle zerstören die Zytoplasmamembran der BL21(DE3)pLysS Zellen. Hierdurch gelangt das zytoplasmatisch lokalisierte Lysozym in den periplasmatischen Raum, spaltet dort  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen von Peptidoglykan und begünstigt somit die Zelllyse. Die Bakterienkultur wird zentrifugiert (2.4.3.1.) und das Pellet in 1/50 Kulturvolumen in Lysepuffer + Protease-Inhibitor resuspendiert. Dreimaliges Auftauen und Einfrieren in Trockeneis führt in der Regel zur fast vollständigen Zelllyse, die sich in einer zunehmenden Zähflüssigkeit (hervorgerufen durch den Austritt chromosomaler DNS) widerspiegelt. Anschließend wird das Lysat für ca. 15 min mit DNaseI sowie RNaseA (Endkonz.: 5  $\mu$ l/ml; Stocklösung: 10 mg/ml),  $MgCl_2$  (Endkonz.: 10 mM), ATP (Endkonz.: 3 mM), Triton-X-100 (Endkonz.: 1%, v/v) und DTT (Endkonz. 5 mM) versetzt, für ca. 15-20 min bei 4°C schwenkend inkubiert. Das Lysat wird wie unter 2.4.3.3. beschrieben weiterbehandelt.

##### **2.4.3.2.2. Lyse von Bakterienzellen durch Ultraschallbehandlung**

Eine schnellere Variante des Zellaufschlusses wird durch Ultraschallbehandlung erreicht. Hierzu wird eine Bakterienkultur zentrifugiert (2.4.3.1.) und das Pellet wird in 1/50 Kulturvolumen in Lysepuffer + Protease-Inhibitor resuspendiert (Das Pellet einer 20 ml

Kultur wird in 1/20 des Kulturvolumens resuspendiert). Für die Lyse im Kleinmaßstab (ca. 1 ml Zellsuspension) wird der Sonifizierer von Misonix (kontinuierliche Beschallung; Stufe 2), für die größere Volumina (ca. 20 ml) wird der Sonifizierer von Brandson (kontinuierliche Beschallung bei ca. 7 kHz) verwendet. Die Proben werden in ca. 10 x 20 s Intervallen mit der oben angegebenen Intensität beschallt. Während den Beschallungsintervallen werden die Proben auf Eis gekühlt. Das Lysat wird wie unter 2.4.3.3. beschrieben weiterbehandelt.

#### **2.4.3.3. Löslichkeitstest von Proteinen**

Die Reinigung von Fusionsproteinen unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen richtet sich nach der Löslichkeit des überproduzierten Proteins. Hierzu wird das Zellpellet einer 20 ml Bakterienkultur in 1/20 Volumenanteil Lysepuffer (z.B. PBS) + Protease Inhibitor resuspendiert und wie unter 2.4.3.2. beschrieben aufgeschlossen. Zur Abtrennung nicht-aufgeschlossener Zellen wird der Extrakt zentrifugiert (1000 g, 10 min, 4°C). Der resultierende Überstand wird erneut zentrifugiert, um lösliche und unlösliche Proteine voneinander zu separieren (20000 g, 15 min, 4°C). Im Anschluss an eine Proteinbestimmung wird ein Aliquot des Überstandes in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (Endkonz.: 1 µg/µl). Das Pellet wird im Ausgangsvolumen (PBS) resuspendiert und ein zum Überstand äquivalentes Aliquot (ca. 10 µl) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Löslichkeit des überproduzierten Fusionsproteins wird mittels SDS-PAGE (2.4.1.1.) und Coomassie-Färbung (2.4.1.6.1.) analysiert.

#### **2.4.3.4. Reinigung und Solubilisierung von GST-Fusionsproteinen**

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wird eine 1 l Bakterienkultur wie unter 2.4.3.1. beschrieben gezogen und für 4-6 Std mit IPTG induziert. Die Zellen werden lysiert (2.4.3.2.1) und wie unter 2.4.3.3. beschrieben behandelt. Das Sediment (nach Zentrifugation, 2.4.3.3.) enthält den Anteil unlöslicher Proteine einschließlich der hier verwendeten GST-Fusionsproteine, die im Folgenden unter mild-denaturierenden Bedingungen zur Reinigung solubilisiert werden. Hierzu wird das Sediment in 1/100 Kulturvolumen PBS + 2 M Harnstoff + 5 mM DTT gelöst. Um eine vollständige Denaturierung von GST zu vermeiden, und damit die GST-Bindung an das Säulenmaterial nicht zu beeinträchtigen, sollten nicht mehr als 2 M Harnstoff eingesetzt werden. Anschließend wird die Suspension 30 min mit 1,5 ml Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia) bei RT inkubiert. Die Sepharose wird in eine Säule (2 ml Volumen; Econo-Pac Säule BioRad, Hercules/USA) überführt und mit 4 x 10 Bett-Volumen PBS-Puffer (1 x PBS, 2 M Harnstoff, 5 mM DTT) gewaschen. Dem PBS-Waschpuffer werden für die ersten beiden Waschschriffe 0,1% Triton-X-100 zugesetzt. Die Matrix wird solange gespült, bis sich kein Protein mehr mittels Bradford-Reagenz nachweisen ließ. GST-Fusionsproteine werden in 1 ml Fraktionen mit 15 mM reduziertem Glutathion von der Glutathion-Sepharose eluiert (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl pH8, 2 M Harnstoff, 0,1 M NaCl, 0,1% Triton-100) und bei -20°C eingefroren. Proben sämtlicher Reinigungsschritte werden

entnommen, in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (2.4.1.1.) analysiert (Da alle Reinigungsschritte miteinander verglichen werden, wird das Volumen der Probenentnahme und der Verdünnungsfaktor mit Laemmli-Probenpuffer für Proben aller Reinigungsschritte aufeinander abgestimmt). Alternativ können Proteine mit N-Lauroylsarcosin (max. 2%) solubilisiert werden.

#### **2.4.3.5. Reinigung von 6His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen**

Für die Reinigung nicht-vollständig löslicher 6His-Fusionsproteine wird 1 l Bakterienkultur wie unter 2.4.3.1. beschrieben gezogen und für 4 Std mit IPTG induziert. Die Zellen werden lysiert (2.4.3.2.1 bzw. 2.4.3.2.2.) und wie unter 2.4.3.3. beschrieben weiterbehandelt. Unlösliche Proteine (nach Zentrifugation, 2.4.3.3.) inklusive der 6His-Fusionsproteine werden in 1/10 Kulturvolumen Harnstoffpuffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, pH8) resuspendiert. Da Harnstoff die Bindung zwischen 6His-Epitop und Säulenmatrix nicht beeinflusst, werden unlösliche Proteine mit 8 M Harnstoff solubilisiert. Die Zellsuspension wird für 30-60 min mit ca. 500  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose (ca. 5 mg/ml Matrix) schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Säule (2 ml Volumen; Econo-Pac Säule BioRad, Hercules/USA) überführt, der Durchfluss aufgefangen und zur Überprüfung der Bindungseffizienz eine Probe (siehe unten) des Säulenmaterials entnommen. Die Affinität bzw. der Ladungszustand des 6His-Epitops an  $\text{Ni}^{2+}$  ist vom pH-Wert abhängig: bei pH 8 hat das 6His-Epitop die höchste Affinität zur Matrix, je niedriger der pH-Wert ist, desto geringer ist auch die Affinität. Zur Elution gebundener Proteine werden 8 M Harnstoffpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 8; pH 7; pH 6,3; pH 5,9; pH 4,5) verwendet. Mit Harnstoffpuffern pH 8 bis pH 6,3 werden alle unspezifisch gebundenen Proteine entfernt. Mit Puffern pH 5,9 bis pH 4,5 werden spezifisch gebundene 6His-Fusionsproteine eluiert. Aliquots des Säulenmaterials, Durchlaufs sowie Wasch- und Elutionsschritte werden in äquivalenten Volumina (ca. 10  $\mu\text{l}$ ) in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (Da alle Reinigungsschritte miteinander verglichen werden, wird Volumen der Probenentnahme und Verdünnungsfaktor mit Laemmli-Probenpuffer für jeden Reinigungsschritt individuell bestimmt). Qualität bzw. Effizienz der Reinigung wird mittels SDS-PAGE (2.4.1.1.) und Coomassie-Färbung (2.4.1.6.1.) analysiert. Anschließend werden die eluierten Proteine bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.4.3.6. Reinigung von 6His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen (kleiner Ansatz)**

Für die Reinigung von 6His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen im Kleinmaßstab wird ein Kulturvolumen von 20 ml verwendet, wie unter 2.4.3.1. beschrieben gezogen und für 4 Std mit IPTG induziert. Das Zellpellet wird in 1/20 Kulturvolumen Lysepuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, Protease-Inhibitoren) aufgenommen. Die Zellen werden lysiert (2.4.3.2.2) und wie unter 2.4.3.3. beschrieben weiterbehandelt. Nach Zentrifugation (2.4.3.3.) wird die lösliche Fraktion mit 50  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose im

Reaktionsgefäß für 30 min bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Suspension in ein *spin column* (MoBiTec, Göttingen/BRD) überführt und zentrifugiert (1000 g, 1 min, 4°C). Zur Analyse wird jeweils eine Probe des Ausgangsmaterials (lösliche Proteine) des Durchlauf nach Inkubation mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose abgenommen und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Ni<sup>2+</sup>-Matrix wird mit je 400 µl Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gespült. Um die einzelnen Reinigungsschritte miteinander vergleichen zu können, werden Probenvolumina der Waschschriffe mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt und die einzelnen Reinigungsschritte aufeinander abgeglichen. Die Proteine werden in 100 µl Fraktionsschritten von der Matrix durch Zentrifugation mit Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert (1000 g, 1 min, 4°C; Effekt von Imidazol: siehe 2.1.10). Zur Analyse werden Aliquots der Eluate (ca. 10 µl) sowie Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose nach Elution mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Anhand der Coomassie-Färbung werden Elutionsfraktionen vereint und anschließend werden die gereinigten Proteine in dem 20fachen Volumen Puffer ohne Imidazol verdünnt (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerin). Auf diese Weise wird die Imidazolendkonzentration von 400 mM auf 20 mM reduziert, was im Fall der WD40-repeat Interaktoren für erneute Proteinbindungen an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose erforderlich ist (2.4.11.2.2.). Das Volumen wird mittels Vivaspin Konzentrierern (Ausschlussvolumen 10 kDa) eingeeengt. Anschließend werden Proteine in Aliquots im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.4.3.7. Reinigung von TEV-6His-Protease unter nativen Bedingungen**

BL21(DE3)pLysS wird mit pET-TEV-6His transformiert (2.2.1.2.). Die Zellen werden in einem 3 l Kulturvolumen wie unter 2.4.3.1. beschrieben gezogen und für 6 Std mit IPTG induziert. Das Zellpellet wird in 1/50 Kulturvolumen Lysepuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, Protease-Inhibitoren) aufgenommen. Die Zellen werden lysiert (2.4.3.2.1) und wie unter 2.4.3.3. beschrieben weiterbehandelt. Nach Zentrifugation wird die lösliche Fraktion mit 2 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose 1 Std bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Säule (10 ml; Econo-Pac Säule BioRad, Hercules/USA) überführt. Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose wird mit insgesamt 40 Bett-Volumen Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gespült. Im Durchlauf sollten mittels des Bradfordreagenz keine Proteine mehr nachweisbar sein. TEV-6His wird in 1 ml Fraktionen mit Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) von der Matrix eluiert. Anhand von Proteinbestimmungen (2.4.2.3.) und Coomassie-Gel Analyse werden Fraktionen mit hohem Reinheitsgrad vereint.

##### **2.4.3.7.1. Dialyse gereinigter TEV-Protease**

Die vereinten Fraktionen werden mittels Dialyse einem Pufferwechsel unterzogen. Die TEV-Probe wird in Dialyseschläuche mit 10 kDa Ausschlussvolumen überführt. Die Dialyse erfolgte 2 x für 3 Std und 1 x über Nacht in jeweils 5 l TEV-Puffer zur Lagerung

(50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% (w/v) Glycerin, 0,1% Triton-X-100). Anschließend werden 1-2 µg/µl Aliquots TEV-Protease bei -80°C gelagert. Eine 4 l Kultur liefert ca. 15 mg TEV-Protease.

#### 2.4.3.8. Reinigung von Ssb1p-TEV-6His unter nativen Bedingungen

Basierend auf einem in der Abt. Hartl bereits etablierten Protokoll wird Ssb1p-TEV-6His aus BL21(DE3) RIL Zellen gereinigt. Dieser *E. coli* Stamm wird speziell für die Synthese eukaryotischer Proteine verwendet. Ein Mangel an tRNAs kann dazu führen, dass rekombinate, eukaryotische Genprodukte nur ineffizient vom *E. coli*-Wirt synthetisiert werden. Daher beinhaltet der Stamm zusätzliche Kopien von *argU*, *ileY* und *leuW* eukaryotischen tRNA Genen, deren Genprodukte die Kodons AGA/AGG, AUA und CUA erkennen. Zur Expression von Ssb1p-TEV-6His wird pProEX-HTb-SSB1(Andreas Bracher) verwendet. Eine 4 l Hauptkultur wird bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,6 gezogen und anschließend mit 0,5 mM IPTG für 6 Std induziert. Während der Induktion werden die Zellen bei 25°C kultiviert. Anschließend werden die Zellen geerntet (s. 2.4.3.1.), in 1/40 Kulturvolumen Ssb-Puffer + 20 mM Imidazol + Protease-Inhibitor aufgenommen und lysiert (2.4.3.2.2.; 2.4.4.2).

**Ssb-Puffer:** 20 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>

##### 2.4.3.8.1. Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung von Ssb1p-TEV-6His aus *E. coli* Lysat, werden 14 ml Ni<sup>2+</sup>-chelating Sepharose in eine Säule (20 ml; Econo-Pac Säule BioRad, Hercules/USA) überführt und mit 4 Säulenvolumen Ssb-Puffer + 20 mM Imidazol äquilibriert. Anschließend wird die lösliche Fraktion des Lysats auf die Säule geladen (Gravitationsfluss). Ein Aliquot des Durchlaufs wird mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Säule wird mit je 2 Volumen Ssb-Puffer mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen (20 mM, 50 mM und 100 mM) gewaschen. Aliquots werden mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer versetzt. Anschließend wird Ssb1p-TEV-6His mit 5 x 1/2 Bett-Volumen Ssb-Puffer mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert (Gravitationsfluss). Aliquots (ca. 10 µl) werden mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer versetzt, und 10 µl werden zur Analyse auf ein 10% SDS-Gel geladen. Fraktionen, die Ssb1p-TEV-6His mit hohem Reinheitsgrad beinhalteten, werden vereint (ca. 24 mg Gesamtprotein).

##### 2.4.3.8.2. Abspaltung des 6His-Epitops mittels TEV-Protease

Zur Abspaltung des TEV-6His-tags wird die Ssb1p-TEV-6His-Probe mit DTT (Endkonz. 1 mM), EDTA (Endkonz. 0,25 mM) und TEV-Protease (1:100 Verdünnung von ca. 1 µg/µl Protease; 2.4.3.7.) über Nacht inkubiert. Anschließend wird der Ansatz in Vivaspin Konzentrierer (30 kD Ausschlussvolumen) überführt und eingengt (2.1.11.). Durch Verdünnen in Ssb-Puffer und erneutes Einengen wird die Imidazolkonzentration von 250 mM auf 20 mM reduziert., um die nachfolgende Filtersäule zu ermöglichen (2.1.12.).

#### **2.4.3.8.3. Affinitätschromatographie nach Abspaltung von TEV-6His (Filtersäule)**

Eine 14 ml Ni<sup>2+</sup>-chelating Sepharose Säule (Filtersäule, Econo-Pac Säule) wird mit Ssb-Puffer + 20 mM Imidazol äquilibriert (Gravitationsfluss). Verunreinigungen aus der ersten Affinitätschromatographie binden im Gegensatz zu Ssb1p nach Abspaltung des 6His-tags erneut an die Ni<sup>2+</sup>-Matrix (da die Probe zuvor eingeeengt wird, können Verunreinigungen leichter bei der Coomassie-Gel Analyse erkannt werden). Hierzu wird die Ssb1p-Probe auf die Säule geladen. Der Durchlauf wird in 1,5 ml Fraktionen gesammelt, und die Säule wird mit 1 Volumen Ssb-Puffer + 20 mM Imidazol gespült. Zur Analyse mittels Coomassie-Färbung werden Aliquots der Fraktionen (ca. 10 µl) mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Fraktionen, die einen hohen Reinheitsgrad an Ssb1p aufweisen, werden vereint und mit Vivaspin Konzentrierern (Vivascience; Hannover/BRD) auf 1 ml eingeeengt (2.1.11.; ca. 11 mg Gesamtprotein).

#### **2.4.3.8.4. Gelfiltrationschromatographie**

Zur Größenfraktionierung wird eine Superdex 200 HR10/30 Säule (2.1.10.) verwendet. Die Säule wird mit 2 je Volumen H<sub>2</sub>O und Puffer gespült. Ein Markerlauf mit Protein-Standard (s. 2.1.9.2.) diente zur Größenbestimmung der Ssb1p-enthaltenden Probe. Hierzu werden 4 mg Eichproteine über einen 1 ml *loop* auf die Säule geladen und einer Chromatographie unterzogen (Ssb-Puffer).

##### **FPLC-Programm:**

Flussrate: 0,2 ml/min

Maximaler Druck: 0,5 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Beginn der Fraktionierung: nach 7 ml

Volumen zum Loop-Spülen: 1 ml

Puffer: 26 ml

Anzahl der Fraktionen: 38

Fraktionsgröße: 0,5 ml

Empfindlichkeit: 0,002 AU

Anschließend wird die Ssb1p-Probe chromatographisch aufgetrennt. Aliquots der Fraktionen werden mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer versetzt, 10 µl werden zur Coomassie-Gel Analyse eingesetzt. Ssb1p-Fraktionen werden vereint und mit Vivaspin Konzentrierern (Vivascience; Hannover/BRD) eingeeengt (12-14 µg/µg, ca. 6 mg Gesamtprotein).

#### **2.4.4. Reinigung von Proteinen aus *S. cerevisiae***

##### **2.4.4.1. Reinigung von TRiC mit TEV-linker-6His-tag zur Analyse**

Um die Zugänglichkeit des an eine TRiC-Untereinheit fusionierten TEV-linker-6His-tags an die Ni<sup>2+</sup>-Matrix zu überprüfen, wird im analytischen Maßstab eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Eine 100 ml Kultur von UBY40 (YPH499 *TCP5*-TEV-linker-6His) wird bei einer OD<sub>600</sub> 0,5 geerntet, mechanisch aufgeschlossen und zentrifugiert (2.4.2.2.1.). Als Lysepuffer wird 20 mM HEPES/KOH pH 7, 100 mM KOAc, 5 mM MgOAc<sub>2</sub>,

5 mM Imidazol, Protease-Inhibitoren verwendet. Die lösliche Fraktion des Lysats wird mit 100  $\mu$ l Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose für 1 Std schwenkend inkubiert, anschließend in Mobicol (MoBiTec, Göttingen/BRD) überführt und zentrifugiert (1000 g, 1 min, 4°C). Die Ni<sup>2+</sup>-Matrix wird mit 3 x mit 7 Bett-Volumen Lysepuffer + 0,1% Nonidet P-40 gespült. Zur Western-Blot Analyse werden 25  $\mu$ l Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (Bett-Volumen) entnommen und diesen 80  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer zugefügt. Gebundene Proteine werden mit 250 mM Imidazol-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7, 100 mM KOAc, 5 mM MgOAc<sub>2</sub>, 400 mM Imidazol, 0,1% Nonidet P-40) in 50  $\mu$ l Fraktionen eluiert und hiervon 40  $\mu$ l mit je 50  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer verdünnt. Zur Analyse werden je 10  $\mu$ l Probe auf ein 10% SDS-Gel geladen.

#### 2.4.4.2. Reinigung von überproduziertem TRiC mit TEV-linker-6His-tag

Zur Reinigung von TRiC im großen Ansatz werden 300 g gefrorene Zellen des *TCP/CCT*-Überexpressionsstammes (2.2.2.3.) in TRiC-Puffer A + Protease-Inhibitoren) aufgetaut, mechanisch aufgeschlossen (*Bead Beater*) und zentrifugiert (2.4.2.2.). Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung werden nach der Proteinbestimmung (2.4.2.3.) Aliquots des Gesamtextrakts und Überstands (lösliche Proteine) entnommen und mit Laemmli-Probenpuffer auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt. Die unlösliche Fraktion wird in einem dem Überstand äquivalenten Volumen (ca. 10  $\mu$ l) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben werden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

##### 2.4.4.2.1. Affinitätschromatographie

Der überproduzierte Chaperonin-Komplex wird mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Hierzu wird eine Säule (Durchmesser: 1,5 cm, Höhe: 11 cm, Werkstatt des Instituts) mit 80 ml Ni<sup>2+</sup>-chelating Sepharose (2.1.10.1.) gefüllt und mit 4 Säulenvolumina TRiC-Puffer A äquilibriert. Die lösliche Fraktion des Lysats (ca. 46 g/ml) wird mittels einer Peristaltikpumpe (4 ml/ min Fließgeschwindigkeit) auf die Ni<sup>2+</sup>-Säule geladen. Zur Analyse wird ein Aliquot (ca. 10  $\mu$ l) des Lysat-Durchlaufs entnommen, mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt (äquivalentes Volumen zum Ausgangsmaterial) und eingefroren. Anschließend wird die Säule an eine FPLC angeschlossen. Nach einem Waschschrift (TRiC-Puffer A, 300 ml) werden gebundene Proteine mittels eines Imidazolgradienten (20 mM-1 M, aus TRiC-Puffer A+B) von der Matrix eluiert (20 ml Fraktionen).

##### FPLC-Programm:

Flussrate: 4 ml/min

Maximaler Druck: 0,5 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Beginn der Fraktionierung: 300 ml TRiC-Puffer A

1. Gradient nach 300 ml: 20 mM -100 mM Imidazol (300 ml)

2. Gradient nach 600 ml: 100 mM -1 M Imidazol (300 ml)

Anzahl der Fraktionen: 30

Fraktionsgröße: 20 ml

Empfindlichkeit: 2V Leitfähigkeit, 0,5V AU

**TRiC-Puffer A:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 20 mM Imidazol

**TRiC-Puffer B:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 1 M Imidazol

Zur Analyse des Waschschrilles wird ein Aliquot mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Von den einzelnen Elutionsfraktionen werden Aliquots mit je 1/5 Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Jeweils 10 µl aller Proben werden mittels eines 10% SDS-Gels analysiert. Die Fraktionen 14-21 enthalten den vollständigen Chaperonin-Komplex (Elution bei 95-460 mM Imidazol; 109 mg Gesamtprotein). Diese werden vereint und mit Vivaspin Konzentrierern (Vivascience; Hannover/BRD; 100 kDa Ausschlussvolumen; 2000 g, 4°C, 3-4 Std; 2.1.11.) 16fach eingengt.

#### **2.4.4.2.2. Gelfiltrationschromatographie**

Für die Gelfiltration wird eine Sephacryl S400-Säule (1,2 l; XK50-Säule von Pharmacia; Durchmesser: 5 cm, Höhe: 55 cm) verwendet (2.1.10.). Zur Größenbestimmung wird zuvor ein Markerlauf mit einem Protein-Standard vollzogen (2.1.9.2) Hierzu werden 16 mg des Protein-Standards zentrifugiert (20800 g, 10 min, 4°C), mit TRiC-Puffer C auf 10 ml aufgefüllt (das Volumen wird auf das Volumen der TRiC-enthaltenden Probe angeglichen) und über einen 10 ml *super loop* (Amersham Pharmacia; Freiburg/BRD) auf die Säule geladen.

##### **FPLC-Programm:**

Flussrate: 4 ml/min

Maximaler Druck: 0,5 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Beginn der Fraktionierung: sofort

Volumen zum Loop spülen: 10 ml

TRiC-Puffer C: 1,2 l

Anzahl der Fraktionen: 60

Fraktionsgröße: 20 ml

Empfindlichkeit: 2V Leitfähigkeit, 0,1-0,5V AU

**TRiC-Puffer C:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, 0,2 mM EDTA

Nach Gelfiltration mit Protein-Standard wird die Säule mit 2 Volumen TRiC-Puffer C gespült. Um zu vermeiden, dass Präzipitat auf die Säule geladen werden, wird die TRiC-enthaltende Probe (10 ml mit ca. 280 mM Imidazolkonz.) filtriert (2.1.12.). Anschließend wird die Probe über den 10 ml *super loop* (Amersham Pharmacia; Freiburg/BRD) auf die Säule geladen, und einer Größenfraktionierung unterzogen (s. oben). Zur Analyse werden Aliquots aller Fraktionen (ca. 10 µl) mit 1/5 Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, davon werden 10 µl auf Gel geladen. Fraktionen 28-33 enthalten vollständigen Chaperonin-Komplex. Diese werden vereint und mittels Vivaspin Konzentrierern (Vivascience, Hannover/BRD; 100 kDa Ausschlussvolumen) 12fach eingengt (2.1.11.).

#### **2.4.4.2.3. Abspaltung des TEV-linker-6His-tags mittels TEV-Protease**

Zur Abspaltung des TEV-linker-6His-tags wird TRiC-Probe (18,1 mg Gesamtprotein) für mindestens 4 Std mit TEV-Protease (1:100 Verdünnung von ca. 1 µg/µl Protease; 2.4.3.7.) inkubiert. Alternativ werden vereinte Fraktionen der Gelfiltration (vor Einengung) mit TEV-Protease über Nacht inkubiert, und anschließend 12fach eingengt (2.1.11.). Vor und nach Inkubation mit TEV-Protease werden Aliquots (äquivalente Volumen) entnommen und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt.

#### 2.4.4.2.4. Affinitätschromatographie nach Abspaltung des TEV-linker-6His-tags

Nach Abspaltung des TEV-linker-6His-tags von TRiC, wird die 10 ml Probe (ca. 1,8 mg/ml Gesamtprotein) auf eine 20 ml Säule (Econo-Pac Säule BioRad; Hercules/USA) mit 10 ml Ni<sup>2+</sup>-chelating Sepharose (Amersham Bioscience; Freiburg/BRD) geladen (Gravitationsfluss). Auf diese Weise wird TRiC (ohne 6His-Epitop) von Verunreinigungen, die an die Säulenmatrix binden, separiert. Die Säule wird mit 3 x 10 ml TRiC-Puffer C gewaschen. Aliquots von Durchlauf und Waschsritten werden mit einem äquivalenten Volumen (ca. 10 µl) Laemmli-Probenpuffer versetzt. Analysiert werden je 10 µl aller Laemmli-Proben mittels eines 10% SDS-Gels. Durchlauf und Waschsritte werden vereint und mit Vivaspin Konzentrierern (100 kDa Ausschlussvolumen) um ca. das 20fache (ca. 5-10 µg/µl) eingengt.

#### 2.4.4.2.5. Ionenaustauschchromatographie

Unter Verwendung einer 8 ml MonoQ HR 10/10 Säule (2.1.10.) wird TRiC mittels eines 50-500 mM NaCl Gradienten von weiteren Kontaminationen separiert. Hierzu wird die TRiC-Probe mit dem 3fachen Volumen TRiC-Puffer D (ohne NaCl) verdünnt, um die NaCl Konzentration auf 50 mM zu reduzieren. Durch diesen Schritt wird die TRiC-Probe gleichzeitig mit ATP versetzt. Bindung und Hydrolyse von ATP lösen das Schließen der Faltungshöhle des Komplexes aus. Eine Inkubation von TRiC mit ATP (ca. 30 min) stellte sich als Vorteilhaft für die Komplexstabilität während der Ionenaustauschchromatographie heraus. Anschließend wird die Probe mittels Vivaspin Konzentrierern (Vivascience; Hannover/BRD) auf 2 ml eingengt. Die Säule wird zunächst mit 4 Säulenvolumen TRiC-Puffer E und anschließend mit 4 Säulenvolumen TRiC-Puffer D äquilibriert. Die Probe wird über einen 2 ml *loop* auf die Säule geladen und mittels eines NaCl Gradienten von der Säule eluiert.

##### **FPLC-Programm:**

Flussrate: 1 ml/min

Maximaler Druck: 3 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Beginn der Fraktionierung: sofort

Volumen zum Loop spülen: 2,5 ml

Gradient 50-500 mM NaCl: 80 ml

Anzahl der Fraktionen: 80

Fraktionsgröße: 1 ml

Empfindlichkeit: 2V Leitfähigkeit, 0,5V AU

**TRiC-Puffer D:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10% Glycerin/ 3 mM ATP

**TRiC-Puffer E:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10% (w/v) Glycerin, 3 mM ATP

Zur Analyse mittels Coomassie-Färbung und Western-Blot werden Aliquots aller Fraktionen (ca. 10 µl) mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer versetzt; hiervon werden 10 µl auf ein 10% SD-Gel geladen. Fraktionen, die den vollständigen Komplex (40-47; 275-314 mM NaCl) enthalten, werden vereint und mit Vivaspin Konzentrierern

(Vivascience; Hannover/BRD) auf eine Endkonz. von ca. 5 µg/µl eingestellt (2.4.2.3.). Für *in vitro* Experimente wird gereinigtes Chaperonin in RTS-Puffer umgepuffert (2.1.12.) und anschließend in 5-10 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **2.4.4.2.6. Dichtegradienten-Zentrifugation (Glyzerin-Gradient)**

Alternativ wird TRiC mittels eines 20-50% Glyzerin-Gradienten von Aggregaten und Kontaminationen separiert. Im Anschluss an die Filtersäule wird die TRiC-Probe mit Vivaspin Konzentrierern (Vivascience; Hannover/BRD) auf eine Konzentration von mind. 1 µg/µl eingengt. Der 20-50% Glyzerol-Gradienten wird in SW55 Ti-Zentrifugenröhrchen (3,5 ml; Beckman, Krefeld/BRD) mit einem Gradientenmischer (Gradient Master von Biocomp, Kanada) entsprechend der Hersteller-Angaben erzeugt. TRiC-Puffer F (20% Glyzerin) wird in Zentrifugegefäße des SW55 Ti-Rotors (Ultrazentrifuge; Beckman, Krefeld/BRD) gefüllt und mit dem gleichen Volumen mit TRiC-Puffer G (50% Glyzerin) unterschichtet. Der Gradient wird mit der Apparatur von Biocomp angelegt.

##### **Programm für SW55 Ti Gefäße:**

Zeit: 1:13 min

Winkel: 86°

Umdrehungen: 16 rpm

**Puffer F:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 20% Glyzerin

**Puffer G:** 50 mM HEPES/KOH pH7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 50% Glyzerin

Nach Herstellung des Gradienten werden pro Zentrifugegefäß maximal 100 µl TRiC-enthaltende Probe (nicht mehr als 100 µg Gesamtprotein) vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Anschließend werden die Gradient zentrifugiert (SW55 Ti Rotor; 54000 rpm für 75 min bei 4°C). Der Gradient wird von oben nach unten in 15 Fraktionen (je 15 Tropfen) gesammelt (*gradient collector*). Aliquots der einzelnen Fraktionen (ca. 10 µl) werden mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt und mittels Coomassie-Färbung analysiert (10 µl Probe wird geladen). TRiC fraktioniert in Fraktionen 4-6.

#### **2.4.4.2.7. Analytische Gelfiltration mittels des SMART-Systems**

Zur Qualitätskontrolle wird gereinigtes TRiC einer analytischen Gelfiltrationschromatographie mittels des SMART Systems (Amersham Bioscience) unterzogen. Hierzu wird eine Superose 6 PC3.2 Säule mit Puffer (TRiC-Puffer A, oder 1 x PBS) äquilibriert (2.1.10.). Zur Größenbestimmung der TRiC-Probe wird ein Protein-Standard (100 µg) geladen (2.1.9.2.). Die Säule wird mit 2 Volumen Puffer gespült und 50 µg TRiC werden mittels eines 50 µl *loops* geladen.

##### **SMART-Programm:**

Flussrate: 40 µl/min

Maximaler Druck: 2,5 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Laden der Probe: nach 400 µl

Beginn der Fraktionierung: nach 600 µl

Volumen zum Loop spülen: 200 µl

Puffer: 3 ml

Fraktionsgröße: 50 µl

Zur Western-Blot Analyse werden Aliquots der Fraktionen (ca. 10  $\mu$ l) mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt (10  $\mu$ l werden aufs 10% SDS-Gel geladen).

#### 2.4.4.3. Reinigung von überproduziertem GimC mittels eines TEV-6His-tags

In Anlehnung an das im Labor entwickelte Protokoll wird GimC mittels des TEV-6His-tags aus Hefezellen gereinigt. Hierzu wird zunächst in 20 l SC-His/-Leu/-Trp Medium UZY10-Zellen (Kupfer-induzierbarer *GIM1-6*-Überexpressionsstamm) bis zu einer  $OD_{600}$  0,7 gezogen und mit  $CuSO_4$  (Endkonz.: 100  $\mu$ M) für 6 Std induziert. Die Zellen werden geerntet, mit 15% Glycerin-Lösung vermischt und tröpfchenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Reinigung von überproduziertem GimC werden 60 g Zellen aufgetaut und mit einem äquivalenten Volumen Lysispuffer + Protease-Inhibitoren versetzt. Anschließend werden die Zellen im Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex-C5; Avestin, Ottawa/Kannada) lysiert (ca. 45 min, 4°C). Danach wird das Lysat zentrifugiert (1000 g, 15 min, 4°C), um nicht lysierte Zellen und Zellwandreste zu sedimentieren. Der resultierende Überstand wird erneut zentrifugiert (18600 g, 30 min, 4°C), um lösliche und unlösliche Fraktionen zu separieren. Die löslichen Fraktion wird mit Laemmli-Probenpuffer auf eine Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt, die unlösliche Fraktion wird in Puffer resuspendiert und ein Aliquot (ca. 10  $\mu$ l) wird mit Laemmli-Probenpuffer versetzt (äquivalentes Volumen zum Überstand).

**GimC-Lysispuffer:** 50 mM HEPES/KOH pH8, 300 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerin

##### 2.4.4.3.1. Affinitätschromatographie

Die lösliche Fraktion (2,4 mg/ml) wird mit 10 ml  $Ni^{2+}$ -chelating Sepharose 1 Std bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Säule (20 ml; Econo-Pac Säule BioRad, Hercules/USA) überführt (Gravitationsfluss). Äquivalent zur Probenentnahme des Überstands wird ein Aliquot des Durchlaufs mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Matrix wird mit 6 Säulenvolumen GimC-Lysispuffer ohne Protease-Inhibitoren und anschließend mit 4 Säulenvolumen Waschpuffer (GimC-Lysepuffer + 20 mM Imidazol) gewaschen (Gravitationsfluss). An Affinitätsmatrix gebundene Proteine werden über einen Imidazol-Stufengradienten eluiert. Die Proteine werden in 3 x 10 ml Fraktionen jeweils mit 100 mM, 200 mM, 400 mM und 800 mM Imidazol-Puffer eluiert. Von allen Wasch- und Elutionsschritten sowie  $Ni^{2+}$ -Matrix vor und nach Elution werden Aliquots (ca. 10  $\mu$ l) entnommen, mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer verdünnt und hiervon werden 10  $\mu$ l für die Analyse im 15% SDS-Gel herangezogen. Fraktionen, die den Gim-Komplex enthalten, werden vereint (100 mM Imidazol 2-3, 200 mM Imidazol 1-3, 400 mM Imidazol 1) und mit Vivaspin Konzentrierern (10 kDa Ausschlussvolumen) 6 bzw. 12fach eingeeengt (2.1.11.).

#### **2.4.4.3.2. Gelfiltrationschromatographie**

Um den gereinigten Gim-Komplex von Kontaminationen zu separieren, wird eine Gelfiltration mit einer Superdex 200 16/60 Säule durchgeführt. Die Säule wird mit GimC-Puffer B (50 mM HEPES/KOH pH8, 300 mM NaCl) äquilibriert. Zur Größenbestimmung der GimC-Probe werden 4 mg Protein-Standard über einen *super loop* (10 ml; Amersham Pharmacia; Freiburg/USA) geladen (2.4.9.2.) und chromatographisch aufgetrennt.

##### **FPLC-Programm:**

Flussrate: 1 ml/min

Maximaler Druck: 0,5 MPa

Wellenlänge: 280 nm

Beginn der Fraktionierung: nach 25 ml

Volumen zum Loop spülen: 5 ml

Puffer: 120 ml

Anzahl der Fraktionen: 39

Fraktionsgröße: 2,5 ml

Empfindlichkeit: 0,1V Leitfähigkeit, 0,05V AU

Nach erneutem Spülen der Säule (2.1.10.) wird GimC-enthaltende Probe (Lysepuffer + 200 mM Imidazol) über einen 10 ml *super loop* auf die Säule geladen und chromatographisch aufgetrennt. Zur Analyse mittels Coomassie-Färbung werden Aliquots aller Fraktionen (ca. 10 µl) mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer verdünnt (10 µl werden geladen). Fraktionen (17-21; 13 mg/ml), die den vollständigem Komplex enthalten, werden vereint.

#### **2.4.4.3.3. Abspaltung den 6His-Epitops mittels TEV-Protease**

Zur Abspaltung des 6His-Epitop-*tags* werden die vereinten Fraktionen 4 Std mit TEV-Protease (1:50 Verdünnung von ca. 1 µg/µl Protease) inkubiert. Vor und nach TEV-Inkubation werden Aliquots mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer inkubiert (10 µl werden im SDS-Gel analysiert).

#### **2.4.4.3.4. Affinitätschromatographie nach Abspaltung von TEV-6His (Filtersäule)**

Nach erfolgter Abspaltung des 6His-Epitops wird GimC mittels einer Filtersäule von Verunreinigungen separiert. Hierzu wird 1 ml Ni<sup>2+</sup>-chelating Sepharose in eine Säule (2 ml; Econo-Pac Säule BioRad; Hercules/USA) überführt und mit GimC-Puffer B (50 mM HEPES/KOH pH8, 300 mM NaCl) äquilibriert (Gravitationsfluss). GimC-enthaltende Probe (12,5 ml) wird auf die Säule geladen. Die Säule wird anschließend mit einem 12,5fachen Säulenvolumen GimC-Puffer B gespült. Zur Analyse mittels Coomassie-Färbung werden Aliquots alle Proben (ca. 10 µl) mit äquivalenten Volumina Laemmli-Probenpuffer versetzt und mittels eines 15%SDS-Gels analysiert. Anschließend werden GimC-enthaltende Fraktionen (Durchlauf und Waschschrift) mit einem Vivaspin Konzentrierer (Vivascience; Hannover/BRD; 10 kDa Ausschlussvolumen) um das 50-100fache eingeeengt. Für *in vitro* Experimente wird der Komplex mit RTS-Puffer aufgepuffert (2.4.10.1.). GimC (Endkonz. 15 µg/µl) wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.4.3.5. Analytische Gelfiltration mit dem SMART-System

Zur Qualitätskontrolle werden geringe Mengen GimC (150 µg) einer analytischen Gelfiltration mit einer Superdex 200 PC3.2 (SMART-System; Amersham Bioscience, Upsala/Schweden) unterzogen (2.4.4.2.7.). Hierzu wurde GimC-Lysepuffer als Laufpuffer verwendet.

#### 2.4.5. Generierung von Antikörpern

Prinzipiell werden zur Herstellung von Antikörpern Kaninchen verwendet, deren Seren vor der Immunisierung kaum Kreuzreaktionen mit Proteinen aus *S. cerevisiae* aufweisen. Hierzu wird dem Kaninchen zunächst Präimmenserum entnommen, welches im Western Blot unter Verwendung von Hefeextrakt getestet wird (Beschreibung s. unten).

Zur Generierung Tcp-spezifischer Antikörper werden Kaninchen mit ca. 500 µg des gereinigten Proteins bzw. Fragments immunisiert. Für die Erstimmunisierung wird das Antigen mit komplettem Freundschens Adjuvants nach Hersteller-Anleitung (Sigma, Steinheim/BRD; enthält abgetötete *Microbacterium tuberculosis* zur Stimulierung der Immunantwort) bis zur vollständigen Homogenisierung mit dem Sonifizierer vermischt und subkutan injiziert. Zwei Wochen danach wird die Immunisierung im Abstand von 4 Wochen mit einem Gemisch aus Antigen und inkomplettem Freundschens Adjuvants (beinhaltet zur Verminderung unerwünschter Nebeneffekte, wie Entzündungen, keine Mycobacteria) fortgesetzt. Zwischen den 4wöchigen Immunisierungsintervallen wird Testblut entnommen (10-14 Tage nach Immunisierung erreicht der Antikörper-Titer sein Maximum). Das Blut wird bis zur vollständigen Gerinnung (ca. 2 Std.) bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 g, 15 min, 4°C) wird das Serum abgenommen. Zur Bestimmung des Antikörper-Titers im Serum werden serielle Verdünnungen des Serums mit 1 x TBS + 5% (w/v) Magermilchpulver hergestellt (niedrigste Verdünnung 1:100) und diese im Western-Blot getestet. Hierfür werden Extrakte (2.4.2.1.) aus Wildtypzellen (YPH499) sowie eines Hefestammes, der das entsprechende Antigen (z.B. Tcp2) als Epitop-markierte Variante produziert (z.B. Tcp2-3HA), verwendet. Im Vergleich zum WT-Protein zeichnet sich das Epitop-markierte Protein durch ein verändertes Migrationsverhalten im SDS-Gel aus. Bei der anschließenden Western-Blot Analyse wird dieser Umstand genutzt, um die Spezifität des Testserums auswerten zu können (Im Vergleich zum WT-Protein zeichnen sich Fusionsproteins durch ihr höheres Molekulargewicht aus, die Auftrennung erfolgt im SDS-Gel nach Größe). Hierzu wird ein SDS-Gel mit 2 großen Geltaschen mit den jeweiligen Hefeextrakten beladen und einer SDS-PAGE und Western-Blot Analyse unterzogen (2.4.1.1.; 2.4.1.3.). Die Transfermembran wird in eine „Streifenblot-Apparatur“ (Werkstatt) gespannt, welche gleichzeitige Inkubation der Membran mit je 7 verschiedenen Serumverdünnungen pro Hefeextrakt erlaubte. Nach Inkubation (2 Std, schüttelnd) erfolgten die Waschschriffe der Membran zunächst innerhalb der Streifenblot-Apparatur mit 1 x TBS und zuletzt außerhalb

der Apparatur 2 x 10 min mit 1 x TBS-Tween. Danach wird die Membran unter Verwendung eines HRP-gekoppelten, sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers (goat anti-rabbit) wie unter 2.4.1.4. beschrieben weiterbehandelt.

Da der Antikörper-Titer mit der Zahl erfolgreicher Immunisierungen ansteigt, werden die seriellen Verdünnungen der Testseren für die Analyse entsprechend angeglichen. Die Kaninchen werden ausgeblutet, wenn das Serum in einer Verdünnung von ca. 1:10000 im Western Blot eingesetzt werden konnte. Aus einem Kaninchen werden ca. 60 ml Serum gewonnen.

#### **2.4.6. Kopplung von Antikörpern an ProteinA-Sepharose**

Für die Immobilisierung monoklonaler HA-Antikörper, die gewöhnlich im Western Blot 1:50 verdünnt eingesetzt werden, werden 50 ml Hybridoma Überstand (2.1.8.1.) verwendet. Die Antikörper werden an 2 ml ProteinA-Sepharose (Fast Flow; Amersham Pharmacia, Freiburg/BRD) gekoppelt. Anhand der Bindungsspezifität (ProteinA-Sepharose/Antikörper) und des Antikörper-Titers werden die benötigten Volumina weiterer Antiseren berechnet. Serum und ProteinA-Sepharose werden über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Suspension zentrifugiert (2000 g, 5 min, 4°C; um vollständige Sedimentation zu gewährleisten, wird der Überstand stets ein 2. Mal zentrifugiert). Anschließend wird die Sepharose mind. 3 x mit 10 Bett-Volumen 0,2 M Na-Borat pH 9 gewaschen (2000 g, 5 min, 4°C). Die Sepharose wird in 10 Bett-Volumen Na-Borat Puffer aufgenommen. Zur späteren Bestimmung der Kopplungseffizienz werden ein Aliquot der Suspension entnommen und die Sepharose wird in einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Für den *cross link* zwischen Antikörpern und ProteinA-Sepharose wird 20 mM Endkonz. Dimethylpimelimidat als Pulver (Sigma) zur Suspension gegeben und für 1 Std bei RT schwenkend inkubiert. Das Stoppen der Reaktion wird durch Waschen mit 10 Bett-Volumen 0,2 M Ethanolamin pH 8 (nicht abgesättigte Bindestellen werden blockiert) eingeleitet. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wird erneut ein Aliquot Sepharose mit einem äquivalenten Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach erfolgter Zentrifugation wird die Sepharose erneut in 10 Bett-Volumen 0,2 M Ethanolamin pH8 aufgenommen, 2 Std bei RT schwenkend inkubiert und zentrifugiert (2000 g, 5 min). Die sedimentierte Sepharose wird 2 x mit 10 Bett-Volumen PBS gewaschen, anschließend in 1 Bett-Volumen PBS aufgenommen, mit Na-Azid (0,02% Endkonz.; hemmt Enzyme der Atmungskette und dient daher als Konservierungsmittel) versetzt und bei 4°C gelagert.

Die Kopplungseffizienz wird mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert. Um nicht kovalent gekoppelte Antikörper von der ProteinA-Sepharose zu entfernen (ineffizienter *cross link*), wird die Antikörper-Sepharose bei Bedarf erneut mit 100 mM Glyzin pH 3 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose durch mehrmaliges Waschen mit PBS wieder neutralisiert.

### 2.4.7. Kopplung von DNaseI an CNBr-aktivierte Sepharose

Für die Kopplung werden 3 mg DNaseI (Roche, Basel/Schweiz) und 1 ml Bett-Volumen gequollene CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia, Freiburg/BRD) verwendet. Zunächst wird DNaseI (lyophilisiert) in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH8, 0,5 M NaCl) aufgenommen. Zur Aktivierung reaktiver Gruppen wird 1 g gefriergetrocknete CNBr-Sepharose 4B mit 1 mM HCl versetzt und über eine Glasfritte mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen (Sepharose darf dabei nicht trocken werden). Anschließend wird die gequollene (1g = 3.5 ml), aktivierte CNBr-Sepharose zentrifugiert (1000 g, 5 min) und in 10 Volumen Kopplungspuffer aufgenommen. Nach sofortiger Zugabe von DNaseI (3 mg/ml Sepharose) wird die Suspension 2 Std bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend wird die CNBr-Sepharose sedimentiert (1000 g, 10 min) und mit 5 Volumen Kopplungspuffer erneut gewaschen. Freie Bindestellen der aktivierten CNBr-Sepharose werden durch Inkubation mit 0,1 M Tris/HCl pH8 + 1 M Ethanolamin pH 8 blockiert (2 Std, RT, schwenkend). Anschließend wird nicht-gekoppelte DNaseI durch mehrfaches alternierendes Waschen (mit 100 mM NaOAc pH 4, 0,5 M NaCl bzw. mit 0,1 M Tris/HCl pH 8, 0,5 M NaCl) entfernt. Die an CNBr-Sepharose gekoppelte DNaseI wird bei 4°C gelagert.

### 2.4.8. Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen (IP) von Proteinen aus Hefezellen, wird eine 200 ml Hefekultur bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5 bei 30°C gezogen, geerntet (2000 g, 5 min, 4°C) und lysiert (2.4.2.2.1.). Für die IP werden zwischen 0,5 mg – 1 mg der löslichen Fraktion (2.4.2.2.1.) mit den entsprechenden an ProteinA-Sepharose gekoppelten Antikörpern (s. unten) für 2 Std bei 4°C schwenkend inkubiert. Falls notwendig wird hierzu ein Endvolumen von 1 ml mit Lysepuffer + Protease Inhibitoren eingestellt. Anschließend wird die Suspension in Mobicol (MoBiTec, Göttingen/BRD) überführt und zentrifugiert (1000 g, 2 min, 4°C). Die Sepharose wird insgesamt 4 x mit je 500 µl Puffer (s. unten) gewaschen (1000 g, 2 min, 4°C). Anschließend wird die Sepharose mit 1 – 3 Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und zentrifugiert. Für die Analyse werden in der Regel 10 µg Gesamtprotein der löslichen Fraktion (Ausgangsmaterial für IP), 10 µg Gesamtprotein des Überstands nach der IP sowie 5-10 µl der Immunpräzipitation geladen. Für eine Western-Blot Analyse mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern wurde 1 µl Bett-Volumen der IP auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen.

#### IP von HA-Epitop markiertem TRiC mittels anti-HA ProteinA Sepharose

<b>Matrix Vol.:</b>	1 µl anti-HA ProteinA Sepharose pro 10 – 20 µg Lysat (z.B. UBY3, Tcp2p-3HA)
<b>Lysispuffer:</b>	1 x PBS, 5% (w/v) Glycerin, 5 mM EDTA, Protease Inhibitoren
<b>Waschpuffer A:</b>	50 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Triton-X-100
<b>Waschpuffer B:</b> (2 x)	50 mM Tris/HCl pH8, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton-X-100
<b>Waschpuffer C:</b>	1 x PBS

**IP von TRiC mittels TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper gekoppelt an ProteinA Sepharose**

<b>Matrix Vol.:</b>	1 µl anti-TRiC ProteinA Sepharose pro 50 – 56 µg Lysat (YPH499)
<b>Lysispuffer/</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P-40,
<b>Waschpuffer</b>	Protease-Inhibitoren

**2.4.10. *In vitro* Transkription/Translation im zellfreiem System**

Für *in vitro* Transkriptions-/Translationsexperimente werden Zellfreie Systeme verwendet, die Extrakte aus Kaninchen-Retikulozyten (*TNT Quick Coupled Transcription/Translationsystem*, Promega) oder S30-Lysat aus *E. coli* Zellen (*RTS 100 E. coli HY-Kit System*, Roche) enthalten. Die Rohextrakte beider Systeme enthalten keine Zelleigene DNS, aber alle makromolekularen Komponenten (z.B. 70S bzw. 80S Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA Synthetasen, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren), die zur Transkription und Translation exogener RNA benötigt werden. Zur effizienten Translation werden diese Systeme mit zusätzlichen Aminosäuren, Energiequellen (ATP, GTP), Komponenten zur Regenerierung dieser Energiequellen (Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase für das eukaryotische System bzw. Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase für das bakterielle System) und weiteren Ko-Faktoren (z.B. Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) ergänzt. Beide *in vitro* Transkriptions-/Translationssysteme beinhalten T7-Phagen RNA-Polymerase, welche die Transkription exogener DNS-Matrizen unter Kontrolle des T7-Promotors vermittelt. Für die *in vitro* Synthese von Proteinen werden korrespondierende Leseraster in geeignete Expressionsvektoren (z.B. pRSET6a oder pET17b) kloniert, die den starken T7-Promotor (Promotor des Gens 10 des T7-Phagen) und den T7-Transkriptionsterminator beinhalten.

**2.4.10.1. *In vitro* Transkription/Translation mittels des prokaryotischen Systems**

Für die *in vitro* Transkription/Translation von Genen mittels eines prokaryotischen Systems wird das *RTS 100 E. coli HY-Kit System* von Roche (*rapid translation system*) verwendet. Zur Herstellung des RTS-Translationsmixes wird der lyophilisierte Aminosäuremix (ohne Methionin) in 360 µl gekühltem Rekonstitutionspuffer (Roche, Basel/Schweiz), der Reaktionsmix in 300 µl Rekonstitutionspuffer und das *E. coli* Lysat in 240 µl Rekonstitutionspuffer vorsichtig resuspendiert (um die Funktionalität der Proteine nicht zu beeinträchtigen, ist Schaumbildung zu vermeiden). Anschließend werden alle drei Komponenten vereint, in 60 µl Aliquots im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei –20°C für ca. max. 1 Monat gelagert.

Gereinigte eukaryotische Chaperone, die dem RTS-Ansatz zugegeben werden, werden zuvor mit Vivaspin Konzentrieren in Rekonstitutionspuffer umgepuffert (2.1.12.). In der Regel werden die Proteine direkt im Anschluss an die Reinigung umgepuffert.

Da die Menge an Rekonstitutionspuffer im RTS-Kits begrenzt ist, wird eine eigens hergestellte Pufferkomposition (= RTS-Puffer) für den Pufferwechsel gereingter

Chaperone verwendet. Ebenso wird der Rekonstitutionspuffer (Roche) durch den RTS-Puffer im Reaktionsansatz ersetzt. Der RTS-Puffer ist unbegrenzt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  haltbar.

<b>4 x RTS-Puffer (ohne Glycerin):</b>	220 mM HEPES/KOH pH 7,5, 112 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 44 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$
<b>1 x RTS-Puffer:</b>	1 x RTS-Puffer (ohne Glycerin), 5% (v/v) Glycerin Endkonz.
<b>Pre-Mix:</b> (8 $\mu\text{l}$ Endvolumen)	2 $\mu\text{l}$ Plasmid-DNS (250 ng/ $\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}$ )
	1 $\mu\text{l}$ Methionin (3 mM, RTS-Kit)
	1 $\mu\text{l}$ RNasin (30U/ml, Promega)
	4 $\mu\text{l}$ [ $^{35}\text{S}$ ] Methionin (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , Amersham)

Für die folgenden Schritte werden aufgrund der eingesetzten Radioaktivität *safe lock* 1,5 ml Reaktionsgefäße und Filterspitzen (Biozym) zum Pipettieren verwendet. Für den Pre-Mix wird Plasmid-DNS (Säulchen-Mini-Präparation) auf eine Konzentration von 250 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Nach Zugabe aller Komponenten, wird der Pre-Mix durchmischt. Für die *in vitro* Transkriptions-/Translationsansätze werden die einzelnen Komponenten (siehe Tabellen) in Reaktionsgefäße pipettiert. Je nach Experiment wird gereinigtes GimC, Ssb1p bzw. TRiC der Reaktion zugegeben. Anschließend wird der Ansatz vorsichtig durchmischt und für 1 Std bei  $30^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert.

#### Ansätze für die *in vitro* Synthese

	- Chaperone	GimC	Ssb1p	TRiC	Ssb1p/TRiC	GimC/TRiC
RTS-Puffer	24 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Pre-Mix	8 $\mu\text{l}$					
TRiC (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , ca. 0,877 $\mu\text{M}$ )	-	-	-	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
GimC (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , ca. 10,4 $\mu\text{M}$ )	-	4 $\mu\text{l}$	-	-	-	4 $\mu\text{l}$
Ssb1p (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , ca. 14 $\mu\text{M}$ )	-	-	4 $\mu\text{l}$	-	4 $\mu\text{l}$	-
Translationsmix	28 $\mu\text{l}$					
Endvolumen	60 $\mu\text{l}$					

Anschließend werden die einzelnen Reaktionsansätze auf Eis gekühlt. Ein Aliquot wird dem Gesamtansatz (Total-Protein, T) entnommen, mit 27  $\mu\text{l}$  Laemmli-Probenpuffer 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zusätzlich wird ein 6  $\mu\text{l}$  Aliquot des Gesamtansatzes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (20800 g, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der daraus resultierende Überstand (lösliche Proteine, Ü) wird abgenommen, 3  $\mu\text{l}$  davon mit 27  $\mu\text{l}$  Laemmli-Probenpuffer versetzt (5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$ ) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Sediment (unlösliche Proteine, S) aus 6  $\mu\text{l}$  Gesamtansatz wird 1 x mit 50  $\mu\text{l}$  50 mM Tris/HCl pH7,5 gewaschen (20800 g, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), in 60  $\mu\text{l}$  Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$ ) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Analyse werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der Laemmli-Proben (T, Ü, S) einer SDS PAGE (12% SDS-Gel) unterzogen. Nach Trocknen des Gels und Exposition werden die Signale densitometrisch bestimmt (2.4.1.7.; 2.4.18.).

Gleichzeitig wird der restliche Ansatz (51  $\mu\text{l}$ ) zentrifugiert (20800 g, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und der resultierende Überstand wird für Bindungsexperimente (2.4.11.2.) verwendet.

### 2.4.10.2. Herstellung von denaturiertem, radioaktiv-markiertem Aktin (RTS)

Denaturiertes, radioaktiv-markiertes Aktin wird für Bindungstests (2.4.11.1.) mit gereinigtem TRiC mittels des RTS-Kits wie unter 2.4.10.1. beschrieben translatiert (120 µl Ansatz, - eukaryotische Chaperone). Der Ansatz wird insgesamt 3 Std bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden lösliche und unlösliche Proteine mittels Zentrifugation (20800 g, 30 min, 4°C) voneinander separiert. Das Sediment wird in 120 µl Harnstoffpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM DTT, 7,5 M Harnstoff) resuspendiert. Ein Aliquot des Überstandes und des gelösten Sediments (ca. 5 µl) werden jeweils mit dem 5fachen Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt. Zur Analyse werden 10 µl Probe mittels eines 12% SDS-Gels aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt, das Gel getrocknet und ein Phosphoimager Screen aufgelegt (2.4.1.7.). Anschließend werden 10 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

### 2.4.10.3. *In vitro* Transkription/Translation mittels des eukaryotischen Systems

Für *in vitro* Transkriptions-/Translationsexperimente mittels des eukaryotischen Systems wird das *TNT Quick Coupled Transcription/Translationsystem* von Promega verwendet. Vor Benutzung wird das Lysat (Promega) auf Eis aufgetaut, aliquotiert (je 50 µl) und für die Lagerung bei -80°C im flüssigen Stickstoff eingefroren. Entsprechend der Anleitung des Herstellers werden die einzelnen Komponenten (s. Tabelle) auf Eis aufgetaut, vereint und 1,5 Std bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

TNT-Puffer (Promega)	2 µl
Plasmid-DNS (250 ng/µl)	2 µl
Aminosäuremix ohne Methionin (Promega)	1 µl
steriles H <sub>2</sub> O	14 µl
RNasin (30U/ml, Promega)	1 µl
[ <sup>35</sup> S] Methionin (10 µCi/µl, Amersham)	4 µl
Lysat (Promega)	25 µl
T7 Polymerase (Promega)	1 µl
Endvolumen	50 µl

Zur Analyse der Löslichkeit synthetisierten Proteins bzw. für Bindungsexperimente werden Proben wie in 2.4.10.1. entnommen und 10fach mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt.

## 2.4.11. Bindungsstudien

### 2.4.11.1. Bindungstest von denaturiertem, radioaktiv-markiertem Aktin und TRiC

Denaturiertes, radioaktiv-markiertes Aktin wird wie unter 2.4.10.2. beschrieben hergestellt. Unmittelbar vor dem Bindungsexperiment wird Aktin 50fach in 1 x MOPS-Puffer (40 mM MOPS pH7,4/ 2 mM EGTA/ 5 mM MgCl<sub>2</sub>/ 2 mM DTT) verdünnt. Von dieser Verdünnung wird 1 µl Aktin für das Bindungsexperiment mit gereinigten Chaperoninen eingesetzt. Hierzu werden 1 µl verdünntes Aktin mit 10 µl 2 x MOPS-Puffer sowie mit 10 µl gereinigtem TRiC (5 µg/µl, 20 µl Ansatz, ca. 1,3 µM) für 6 min bei 30°C inkubiert. Analog

werden 10 µl gereinigtes GroEL (Abt. Hartl; 5 µg/µl in 1 x MOPS-Puffer) mit Aktin inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit äquivalenten Volumina Auftragspuffer für native Gelelektrophorese (2.4.1.2) versetzt, 10 µl werden für die Analyse mittels eines 12,5% nativen Gels eingesetzt. Nach erfolgter Coomassie-Färbung wird das Gel getrocknet und über Nacht ein *Phosphoimager Screen* aufgelegt (s. 2.4.1.7.).

#### **2.4.11.2. Bindungsstudien mit *in vitro* translatierten Proteinen**

##### **2.4.11.2.1. Bindung von *in vitro* synthetisiertem Aktin an DNaseI**

Zur Überprüfung des Faltungszustandes von *in vitro* synthetisiertem Aktin wird ein 15 µl Aliquot der löslichen Fraktion eines Transkriptions-/Translationsansatzes (2.4.10.1.) mit 370 µl Bindungspuffer (1 x PBS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton-X-100, Protease Inhibitoren) verdünnt und mit 15 µl DNaseI-Sepharose im Reaktionsgefäß inkubiert (2 Std, 4°C, schwenkend). Anschließend wird die Sepharose in Mobicol (MoBiTec, Göttingen/BRD) transferiert und zentrifugiert (1000 g, 1 min, 4°C). DNaseI-Sepharose wird 2 x mit je 400 µl Bindungspuffer und 1 x mit 400 µl 1 x PBS gewaschen (1000 g, 1 min, 4°C). Anschließend wird die Sepharose mit einem Bett-Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und zentrifugiert. Zur Analyse werden 10 µl auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen.

##### **2.4.11.2.2. Bindung *in vitro* synthetisierter *WD-repeat* Proteine an spezifische Interaktionspartner**

Zur Überprüfung des Faltungszustandes *in vitro* translatisierter *WD-repeat* Proteine werden zunächst deren spezifische Interaktionspartner an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose gebunden. Hierzu werden jeweils 200 µg Protein (s. 2.4.3.6.; in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerin; 10-50 µg/µl) auf Eis aufgetaut und in 400 µl Bindungspuffer (1 x PBS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton-X-100, Protease Inhibitoren) an 100 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose gebunden (30 min, 4°C, schwenkend). Anschließend wird die Agarose sedimentiert (500 g, 1 min, 4°C) und in 1 Bett-Volumen Bindungspuffer aufgenommen.

Als negativ Kontrolle für das Bindungsexperiment werden zusätzlich auch andere Proteine an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose immobilisiert. Dies können entweder immobilisierte Interaktionspartner anderer *WD-repeat* Proteine oder Calmodulin-6His (Abt. Hartl) bzw. *E. coli*-Lysat (200 µg/50 µl Ni<sup>2+</sup>-Matrix) sein.

Bindungsexperimente mit *WD-repeat* Proteinen erfolgt wie unter 2.4.11.2.1 für die Bindung von Aktin an DNaseI beschrieben. Davon abweichend ist die Komposition des Bindungspuffers (50 mM Tris/HCl pH7,5, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, Protease-Inhibitoren) und es wird 4 x mit PBS gewaschen. Zur Analyse werden 10% SDS-Gele verwendet.

### 2.4.11.3. Bindungsstudien mit *WD-repeat* Proteinen aus Hefelysat

Für Bindungsexperimente von *WD-repeat* Proteinen aus Hefelysat werden die gereinigten spezifischen Interaktionspartner wie unter 2.4.11.2.2. beschrieben an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose immobilisiert. Hefestämme, die chromosomal für das entsprechende *WD-repeat* Protein mit 3HA-Epitop-*tag* kodieren (Cdc20p-3HA, Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA), werden wie unter 2.4.2.2.1. beschrieben lysiert (Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7,5/ 100 mM NaCl/ 20 mM Imidazol/ Protease-Inhibitoren). Pro Stamm werden jeweils parallel ca. 350-500 µg der löslichen Fraktion mit 15 µl anti-HA ProteinA Sepharose (2.4.6.), mit 15 µl an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose immobilisierten Interaktionsproteinen (für Cdc20p = 6His-<sup>1</sup>Hsl1p; für Cdc55p = 6His-Tpd3p; für Pex7p = Pot1p-6His) bzw. mit 15 µl an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose immobilisierten Kontrollproteinen (s. 2.4.11.2.2.) für 60 min bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Suspension in Mobicol (MoBiTec, Göttingen/BRD) überführt und zentrifugiert (100 g, 2 min, 4°C). Die Matrix mit den gebundenen Proteinen wird 3 x mit je 400 µl Lysepuffer (ohne Protease-Inhibitoren) gespült und anschließend in je 25 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Hiervon werden 10 µl zur Analyse im anti-HA Western-Blot eingesetzt.

### 2.4.12. Depletion von GroEL aus dem RTS-Kit mittels Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von GroEL aus dem S30-Lysat des RTS-Kits (2.4.10.) werden 100 µl an ProteinA-Sepharose gekoppelte GroEL-Antikörper in einem *Spin column* (Mobiltech) mit 3 x 100 µl Rekonstitutionspuffer (Roche) äquilibriert (1000 g, 2 min, 4°C). Anschließend werden 240 µl des *E. coli* Lysats (Roche, Basel/Schweiz) zu den gekoppelten Antikörpern gegeben, vorsichtig durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird durch Zentrifugation (1000 g, 1 min, 4°C) des Mobicol das Lysat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die gekoppelten anti-GroEL Antikörper werden mit 3 x 10 µl Rekonstitutionspuffer-Puffer gewaschen (1000 g, 1 min, 4°C). Zur Überprüfung der Effizienz der GroEL-Depletion mittels SDS-PAGE und einem anti-GroEL Western-Blot werden Proben des Lysats vor und nach der Immunpräzipitation (IP) entnommen (Lysat 60fach mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt, davon wird 1/6 auf ein 12% Gel geladen). Zusätzlich wird eine Probe der immobilisierten Antikörpern nach IP und Waschschritten analysiert (anti-GroEL ProteinA-Sepharose mit 2fachem Volumen Laemmli-Probenpuffer versetzt, davon wird 1/6 auf ein 12% Gel geladen).

### 2.4.13. Pulse-Chase Faltungskinetiken von Aktin und Tubulin

#### 2.4.13.1. Sphäroplastieren von Hefezellen

Hefestämme werden in SC-Medium (falls erforderlich: SC-Selektionsmedium) bis ca. OD<sub>600</sub> 0,9 über Nacht bei 30°C kultiviert. Pro Stamm werden für das Experiment ca. 240 OD<sub>600</sub> benötigt. Die Zellen werden geerntet (2000 g, 5min, RT) und pro OD<sub>600</sub> 80 in 2 ml

Mangelmedium A (SC-Met/-Cys/1,2 M Sorbitol pH7,5) gewaschen. Der Mangel an Methionin und Cystein im Medium begünstigt die spätere Aufnahme der radioaktiven Aminosäuren (Aushungern der Zellen). Die Zellen ( $OD_{600}$  80) werden in 3 ml Mangelmedium A resuspendiert, in Kulturröhrchen überführt und mit DTT (Endkonz. 30 mM) 15min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Zur effizienten Sphäroplastenbildung wird in den folgenden Schritten die Sedimentbildung der Zellen durch wiederholtes vorsichtiges Aufwirbeln verhindert. Nach erneuter Zentrifugation (1000 g, 10 min, RT) wird die Zellsuspension vorsichtig in 5 ml Mangelmedium A mit 2,5 mg/ml Zymolyase 20T resuspendiert und 1 Std bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Sphäroplastensuspension wird sedimentiert (1000 g, 10 min, RT) und in 1 ml Mangelmedium B (SC-Met/-Cys/1,2 M Sorbitol pH5,5) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Um Zellwandbestandteile von den Sphäroplasten abzutrennen, wird die Suspension vorsichtig auf 3 ml 1,5 M Sorbitol (neues Kulturröhrchen) überschichtet. Aufgrund der hohen Dichte des Sorbitol-Kissens sedimentieren nur die Sphäroplasten während der Zentrifugation (1000 g, 10 min, RT). Die Sphäroplasten werden erneut mit 5 ml Mangelmedium B gewaschen (1000 g, 10 min, RT). Zur Regenerierung werden die Sphäroplasten in 3,75 ml Mangelmedium B ca. 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

#### 2.4.13.2. Radioaktivmarkierung von Sphäroplasten

Zur radioaktiven Markierung neusynthetisierter Proteine werden 80  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein (ProMix,  $N_0 = 14,3 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ; Amersham, Freiburg/BRD) zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 80 s wird der Einbau radioaktiver Aminosäuren in neusynthetisierte Polypeptidketten durch Zugabe von Zykloheximid (Hemmung der Proteinsynthese) und einem Überschuss an nicht-markiertem Methionin und Cystein gestoppt (Endkonzentration 0,1 mg/ml Zykloheximid, 1 mM Methionin, 1 mM Cystein). Nach Zugabe von [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein werden der Sphäroplastensuspension zu definierten Zeitpunkten (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,3; 2,6; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10; 15; 20 min) Aliquots entnommen, mit einem äquivalenten Volumen 2 x Lysepuffer + 2 x Protease Inhibitoren (2 x PBS, 10 mM EDTA, 1% Tween) versetzt (1,5 ml *safe lock* Reaktionsgefäße) und im flüssigen Stickstoff eingefroren.

#### 2.4.13.3. Bindungsexperimente für Faltungskinetiken

Proben aller Zeitwerte werden auf Eis aufgetaut, entlüftet und zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C). Zur Bestimmung der Markierungseffizienz werden von den löslichen Fraktionen Aliquots mit äquivalenten Volumina HU-Probenpuffer versetzt. Für das Bindungsexperiment werden 800  $\mu\text{l}$  der löslichen Fraktionen in Reaktionsgefäße mit 30  $\mu\text{l}$  DNaseI Protein A-Sepharose bzw. 30  $\mu\text{l}$  anti-HA-ProteinA Sepharose (je nach Experiment und verwendetem Hefestamm) überführt und für 1,5 Std bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend werden die Suspensionen in Mobicol (MoBiTec, Göttingen/BRD) überführt

und zentrifugiert (500 g, 2 min, 4°C). Die ProteinA Sepharose (in *spin columns*) wird mit je 500 µl Puffer (s. Tabellen) gewaschen (unter Vakuum abgesaugt).

**Waschschritte für Aktinfaltungskinetiken**

---

<b>Lyse-Puffer:</b> (1x)	1 x PBS, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Tween
<b>W1-Puffer:</b> (1x)	50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X-100
<b>W2-Puffer:</b> (2x)	50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X-100
<b>1 x PBS:</b> (1x)	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,7

---

**Waschschritte für Tubulinfaltungskinetiken**

---

<b>Lyse-Puffer:</b> (3x)	1 x PBS, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Tween
<b>1 x PBS:</b> (1x)	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,7

---

Nach erfolgten Waschschritten und Zentrifugation ohne Puffer, um Pufferreste vollständig zu entfernen, wird Protein A Sepharose mit einem äquivalenten Volumen HU-Puffer versetzt (10 µl werden für die Coomassie-Gel Analyse verwendet). Für Aktinfaltungskinetiken werden 12% SDS-Gele, für Tubulinfaltungskinetiken werden 7,5% SDS-Gele eingesetzt. Die gefärbten Gele werden wie unter 2.4.1.7. beschrieben weiterbehandelt und radioaktiv-markierte Proteine werden quantifiziert (2.4.1.8.). Für die Bestimmung der Kinetiken wird das Computerprogramm KaleidaGraph (Synergy Software) herangezogen und die Berechnung des Kurvenverlaufs (*curve fit*) erfolgte nach Vorgaben des Programms.

---

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1. Reinigung von TRiC aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur *in vitro* Charakterisierung von TRiC war es erforderlich, ein Protokoll für die Reinigung des Chaperonins aus *S. cerevisiae* zu entwickeln. Da die Konzentration von TRiC in Hefezellen äußerst niedrig ist, wurden verschiedene Reinigungsstrategien zur Anreicherung des Komplexes verfolgt. Hierzu wurden Antikörper gegen TRiC Untereinheiten zur Immunpräzipitation bzw. zum Nachweis des Komplexes im Anschluss an die Reinigung hergestellt. Zusätzlich wurden Hefestämme generiert, in denen das Chaperonin mit einer Epitop-markierten Untereinheit versehen ist, mit Hilfe derer der Komplex sich immunpräzipitieren bzw. über Affinitätschromatographie anreichern lässt. Die unterschiedlichen Anreicherungsmethoden wurden hinsichtlich ihrer Effizienz miteinander verglichen. Die geeignetste Methode wurde zur Entwicklung eines mehrstufigen Reinigungsprotokolls herangezogen. Um die Menge an gereinigtem TRiC zusätzlich zu erhöhen, wurde der Komplex in Hefe überproduziert. Das gereinigte Chaperonin wurde hinsichtlich Reinheit, Integrität und Funktionalität mittels verschiedener Qualitätskontrollen untersucht.

#### 3.1.1. Herstellung von Antikörpern und Hefestämmen zum Nachweis von TRiC in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Analyse des gereinigten Chaperonin-Komplexes wurden polyklonale Antikörper hergestellt, mit denen individuelle TRiC Untereinheiten nachgewiesen werden können. Zusätzlich wurden Hefestämme entwickelt, in denen einzelne Untereinheiten des Chaperonins mit einem Epitop-*tag* markiert wurden. Letzteres diente sowohl zum Nachweis des Komplexes mit kommerziellen, Epitop-spezifischen Antikörpern als auch zur Überprüfung der Spezifität der TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörper.

##### 3.1.1.1. Herstellung polyklonaler Antikörper zur Detektion von TRiC Untereinheiten

Zur Erzeugung spezifischer Antikörper wurden die Sequenzen einzelner TRiC Untereinheiten in Expressionsvektoren kloniert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der homologen *TCP/CCT*-Untereinheiten untereinander zeigte, dass zwischen den Sequenzen keine Übereinstimmungen vorliegen, die zur Ausbildung eines kontinuierlichen Antigen-Epitops ausreichen (Daten nicht gezeigt). Daher konnten für die einzelnen Antiseren mögliche Kreuzreaktionen mit anderen TRiC Untereinheiten ausgeschlossen werden. Je nach verwendetem Vektor wurden die *TCP/CCT*-Gene am 5'-Ende mit der kodierenden Sequenz für Hexahistidin (6His) bzw. Glutathion-S-Transferase (GST) versehen. Die Fusionsgene wurden in *E. coli* exprimiert (s. 2.4.3.4. und 2.4.3.5.). Auf diese Weise ließen sich Untereinheiten mit His-Anhang über Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose sowie GST-Fusionsproteine aufgrund ihrer hohen Affinität zu immobilisiertem Glutathion reinigen. Für die Immunisierung von Kaninchen (s. 2.4.5.) lagen die gereinigten Fusionsproteine

denaturiert vor. In Tabelle 3.1 sind Plasmide und Fusionsproteine für die Herstellung TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper gelistet.

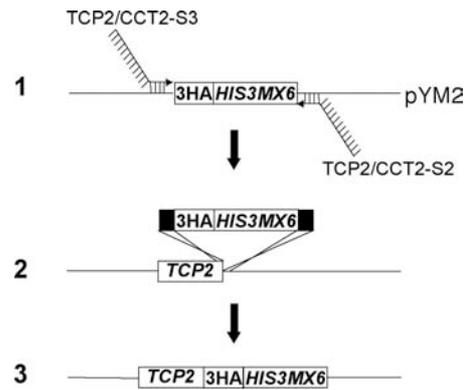
**Tabelle 3.1: Plasmide für die Generierung TRiC Untereinheiten-spezifischer, polyklonaler Antikörper**

Plasmid	Antikörper	Fusionsproteine	Beschreibung
pUB1	anti-Tcp1p	GST-Tcp1p	pGEX-5X-1/TCP1/CCT1 (TCP1/CCT1, 1-1979 Bp)
pUB3	anti-Tcp2p	GST-Tcp2p	pGEX-5X-1/TCP2/CCT2 (TCP2/CCT2, 1-1904 Bp)
pUB41	anti-Tcp3p	GST-'Tcp3p	pGEX-5X-1/TCP3/CCT3 (TCP3/CCT3, 1306-1605 Bp)
pUB42	"	6His-'Tcp3p'	pQE32/TCP3/CCT3 (TCP3/CCT3, 594-1121 Bp)
pUB52	anti-Tcp4p	6His-GST-Tcp4p'	pKM263-4T3-TEV/TCP4/CCT4 (TCP4/CCT4, 1-545 Bp)
pUB54	"	6His-GST-'Tcp4p'	pKM263-4T3-TEV/TCP4/CCT4 (TCP4/CCT4, 448-1109 Bp)
pUB9	anti-Tcp5p	GST-Tcp5p	pGEX-5X-1/TCP5/CCT5 (TCP5/CCT5, 1-1869 Bp)
pUB12	anti-Tcp6p	GST-Tcp6p	pGEX-4T-3/TCP6/CCT6 (TCP6/CCT6, 1-1863 Bp)
pUB13	anti-Tcp7p	GST-Tcp7p	pGEX-5X-1/TCP7/CCT7 (TCP7/CCT7, 1-1913 Bp)
pUB50	anti-Tcp8p	GST-'Tcp8p'	pGEX-5X-1/TCP8/CCT8 (TCP8/CCT8, 343-1190 Bp)
pSi314	"	6His-GST-'Tcp8p	pKM263/TCP8/CCT8 (TCP8/CCT8, 343-1707 Bp)
pSi315	"	6His-GST-Tcp8p'	pKM263/TCP8/CCT8 (TCP8/CCT8, 1-1219 Bp)

Für die Immunisierung wurden meist rekombinant hergestellte Volllänge-Untereinheiten verwendet. Da sich jedoch für die vollständigen Leserahmen von *TCP3*, *TCP4* und *TCP8* keine Expression nachweisen ließ, wurden Teilfragmente der jeweiligen Gene in Vektoren kloniert und in *E. coli* exprimiert. Für die Generierung des anti-Tcp3p Serums wurden 10 kDa des C-terminalen Bereiches (pUB41) und 18 kDa des mittleren Bereiches (pUB42) von Tcp3p eingesetzt. Für die Herstellung von anti-Tcp4p Antiseren wurden 18 kDa des N-terminalen (pUB52) sowie 20 kDa des mittleren Bereiches von Tcp4p verwendet. Zur Gewinnung von anti-Tcp8p Antiseren wurden 40 kDa des N-Terminus (pSi315), 28 kDa des mittleren Bereiches (pUB50) sowie 46 kDa des C-Terminus von Tcp8p verwendet. Die Spezifität der Antiseren wurde im Western-Blot überprüft (Abb. 3.2; s. 3.1.1.2.).

### 3.1.1.2. Chromosomale Integration eines Epitop-tags in ein *TCP/CCT*-Gen

Als Alternativmethode zum Nachweis individueller TRiC Untereinheiten aus Hefelysate sowie zur Überprüfung der generierten TRiC Untereinheiten-spezifischen Antiseren wurden Hefestämme hergestellt, welche das jeweilige *TCP/CCT*-Gen als Fusion mit dem Hämagglutinin (HA)- bzw. c-Myc-Epitop chromosomal kodieren (s. 2.2.2.5.). In Abb. 3.1 ist die chromosomale Integration einer 3HA Epitop-kodierenden Sequenz in den Genlokus von *TCP2/CCT2* veranschaulicht. Hierzu wurde eine PCR-Kassette amplifiziert, die neben der 3HA-Epitop Sequenz das offene Leseraster für *HIS5* aus *Schizosaccharomyces pombe* enthält, welches Wachstum von *his3Δ200 S. cerevisiae*-Stämmen in Histidin-Mangelmedium erlaubt. Das *HIS5*-Gen aus *S. pombe* ist homolog zu *HIS3* aus *S. cerevisiae* und weist eine 65%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf. Da jedoch zwischen beiden Genen im 5'-Bereich keine relevanten Sequenzhomologien bestehen, kann durch die Verwendung von *SpHIS5* eine mögliche Integration des PCR-Produktes in den *HIS3*-Lokus ausgeschlossen werden (Wach *et al.*, 1997).

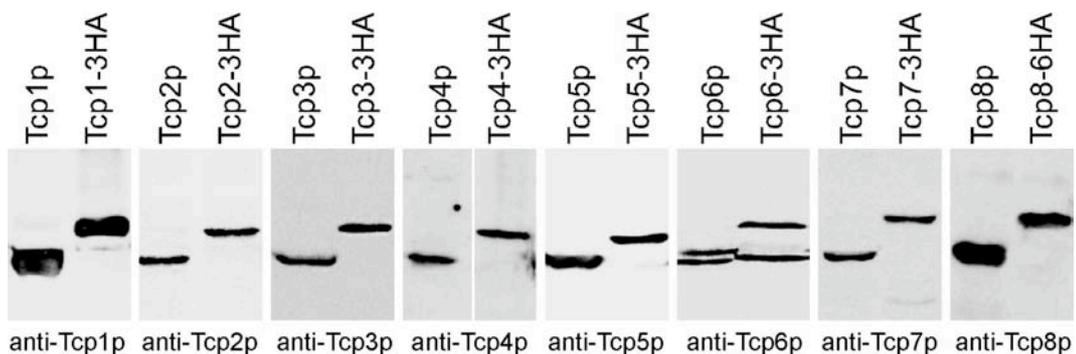


**Abb. 3.1: Generierung von Genfusionen am Beispiel von TCP2-3HA.**

(1) Zur Amplifizierung einer 3HA-HIS3MX6-Kassette (pYM2 als Matrize) wurden TCP2/CCT2-S2 und -S3 Oligonukleotide verwendet, die neben homologen Abschnitten zur Kassette zusätzliche Sequenzhomologien des TCP2-Leserahmens enthalten und somit 5' und 3' des TCP2 Stopp-Kodons binden können. (2+3) Mittels homologer Rekombination wird die PCR-Kassette 3' von TCP2 in das Genom integriert.

Die PCR erfolgte mit Gen-spezifischen Primern, die komplementär zu Sequenzabschnitten 5' bzw. 3' vom Stopp-Kodon von TCP2/CCT2 sind (s. 2.2.2.5.). Nach Transformation der Hefezellen wird das PCR-Produkt über homologe Rekombination integriert und das TCP2/CCT2 Stopp-Kodon hierdurch ersetzt. Folglich wird anstelle von TCP2/CCT2 das Fusionsgen TCP2/CCT2-3HA sowie SpHIS5 exprimiert.

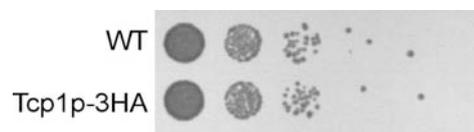
Der Nachweis synthetisierter Fusionsproteine erfolgte immunologisch im Western-Blot mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antisera sowie HA- bzw. myc-Epitop-spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse der z.B. HA-markierten TRiC Untereinheiten wurden TCA-Extrakte (2.4.2.4.1.) von Stämmen verwendet, die für das Fusionsprotein bzw. das Wildtyp-Protein kodieren. Die erfolgreiche Integration der Epitop-Sequenz wurde durch ein verändertes Migrationverhalten des Fusionsproteins im SDS-Gel gegenüber dem Wildtyp-Protein deutlich (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Epitop-Markierung von TRiC Untereinheiten.** Individuelle TCP/CCT-Gene wurden jeweils in Hefezellen chromosomal am 3'-Ende mit einer Sequenz für HA-Epitope versehen. Die Expression der Fusionsgene wurde im Western-Blot mit entsprechenden TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern überprüft.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für myc-Epitop-markierte TRiC Untereinheiten erzielt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich demonstriert Abb. 3.2, dass die Antiseren die jeweilige TRiC Untereinheit spezifisch detektieren. Das anti-Tcp6p-Serum detektiert ein zusätzliches Signal neben der eigentlichen Tcp6p Bande, welches unterhalb von Tcp6p bzw. Tcp6p-3HA migriert. Möglicherweise handelt es sich hierbei entweder um ein Abbauprodukt von Tcp6p oder um eine Kreuzreaktivität des anti-Tcp6p-Serums mit einem anderen Protein. Eine Kreuzreaktivität des Antiserums mit anderen TRiC Untereinheiten kann jedoch ausgeschlossen werden, da diese Bande in Western-Blots mit gereinigtem Chaperonin nicht detektiert wird (s. Abb. 3.22).

Hefezellen, die für C-terminal Epitop-markierte Untereinheiten kodieren, zeigen keine Wachstumsdefekte (Abb. 3.3).

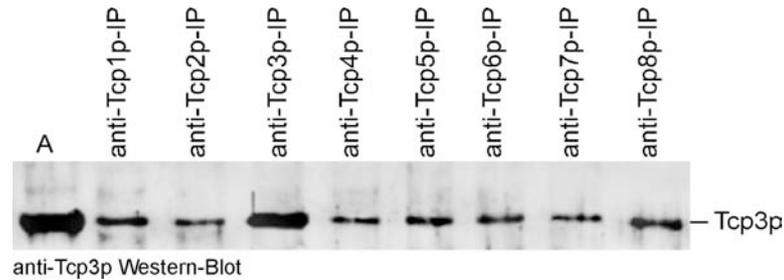


**Abb. 3.3: Modifikation von Tcp1p am C-Terminus beeinträchtigt nicht das Wachstum von Hefezellen.** *TCP1/CCT1* wurde chromosomal mit einer 3HA-Epitop-Fusion versehen. Hefezellen wurden im Flüssigmedium bis zur stationären Dichte herangezogen, anschließend auf  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt, in seriellen 1:10 Verdünnungen auf YPD Platten plattiert und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Daraus kann geschlossen werden, dass der Epitop-*tag* nicht die Funktionalität von TRiC beeinträchtigt und folglich nicht mit der Struktur bzw. Assemblierung des Chaperonins interferiert, da alle TRiC Untereinheiten essentiell sind. Sequenzabgleiche mit bereits kristallisierten Chaperoninen, wie z.B. dem Thermosom aus *T. acidophilum* (Ditzel *et al.*, 1998), lassen vermuten, dass die C-Termini der TRiC Untereinheiten ähnlich, d.h. im äquatorialen Bereich des Chaperonin-Komplexes, lokalisiert sind. Demzufolge kann angenommen werden, dass der Epitop-*tag* in das Innere der Faltungshöhle ragt.

### 3.1.2. Immunpräzipitation von TRiC mittels Untereinheiten-spezifischer Antikörper

Sämtliche TRiC Untereinheiten-spezifische Antiseren wurden dahingehend getestet, den vollständigen Chaperonin-Komplex unter nativen Bedingungen aus Hefelysat anzureichern (s. 2.4.8.). Hierzu wurden die verschiedenen Antiseren separat an ProteinA-Sepharose gekoppelt (s. 2.4.6.) und die immobilisierten Antikörper in parallelen Ansätzen mit Wildtyp-Hefelysat unter nativen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Immunpräzipitation des Chaperonin-Komplexes mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch anhand eines anti-Tcp3p Western-Blots, dass sich mit jedem der 8 unterschiedlichen Antikörper die Tcp3p- Untereinheit ko-immunpräzipitieren ließ.

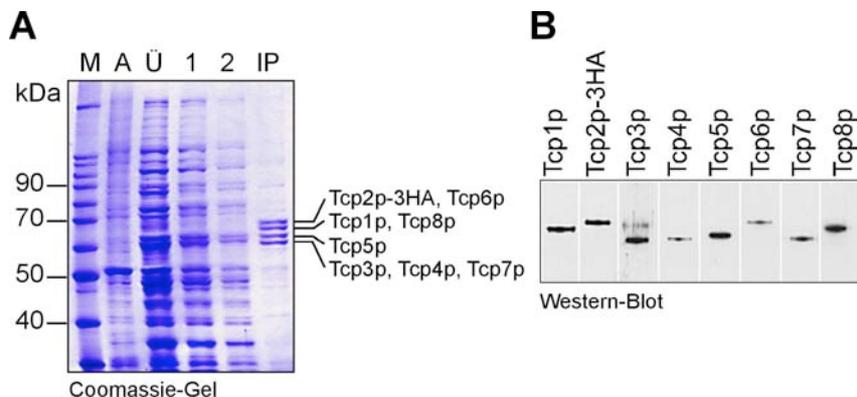


**Abb. 3.4: TRiC wird mittels TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper immunpräzipitiert.** Die Anreicherung eines vollständig assemblierten Chaperonin-Komplexes mittels individueller TRiC-Antikörper wurde in Immunpräzipitationsexperimenten untersucht. Hierzu wurde in separaten Ansätzen Wildtyp-Hefelysate mit immobilisierten TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern inkubiert. (A) 10 µg Ausgangsmaterial, (anti-Tcp1p-IP bis anti-Tcp8p-IP) 1/5 Volumenanteil der unterschiedlichen Immunpräzipitationen wurde im anti-Tcp3p Western-Blot analysiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Bindung der jeweiligen Antikörper an ihre korrespondierenden TRiC Untereinheiten auch unter nativen Bedingungen möglich ist, d.h. wenn diese als assemblierter Chaperonin-Komplex vorliegen. Unter den Versuchsbedingungen wurden mittels der immunpräzipitierten Tcp3p-Untereinheit (IP: 2,5% des Ausgangsmaterials) ca. 1/5 der Gesamtmenge an Chaperonin ko-immunpräzipitiert (Ko-IP: 0,5% des Ausgangsmaterials). Da diese Mengen jedoch nicht für *in vitro* Studien ausreichen, wurden Alternativstrategien zur Anreicherung von TRiC entwickelt.

### 3.1.3. Immunpräzipitation von TRiC mittels HA-spezifischer Antikörper

Eine weitere Methode zur Anreicherung von TRiC basiert auf der Verwendung von Hefestämmen, die chromosomal für eine Epitop-markierte TRiC Untereinheit kodieren (s. 3.1.1.2). Abb. 3.5 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes am Beispiel eines Stammes, der chromosomal *Tcp2p-3HA* kodiert (UBY3).



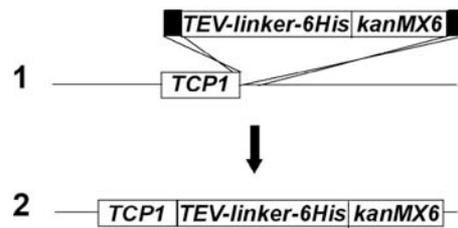
**Abb. 3.5: TRiC wird mittels Immunpräzipitation von *Tcp2p-3HA* angereichert.** Hefezellen, die *TCP2-3HA* exprimieren, wurden einer Immunpräzipitation mit immobilisierten anti-HA Antikörpern unterzogen. (A) Coomassie-Gel: (M) Marker, (A) 1/120 Volumenanteil des Ausgangsmaterials, (Ü) 1/60 Volumenanteil des Überstands nach der IP, (1+2) 1/50 Volumenanteil von 2 Waschschritten mit Lysepuffer, (IP) 1/6 Volumenanteil der Immunpräzipitation. (B) Die Integrität von immunpräzipitiertem TRiC wird im Western-Blot mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern bestätigt.

Die lösliche Fraktion des Zelllysats wurde mit anti-HA ProteinA-Sepharose (s. 2.4.6.) inkubiert. Die Immunpräzipitation der HA-markierten Tcp2p-Untereinheit resultierte in einer starken Anreicherung des Chaperonin-Komplexes (s. 2.4.8). Das für TRiC typische Bandenmuster lässt auf ein stöchiometrisches Mengenverhältnis der einzelnen Untereinheiten im angereicherten Komplex schließen. Des Weiteren konnten anhand von Western-Blots, bei denen die Transfermembranen mit Antikörpern gegen individuelle TRiC Untereinheiten inkubiert wurden, alle 8 Untereinheiten im ko-immunpräzipitierten Komplex nachgewiesen werden.

Unter diesen Versuchsbedingungen ließen sich über 50% Tcp2p-3HA (bezogen auf das Ausgangsmaterial) immunpräzipitieren. Diese Methode ermöglichte also im Vergleich zu Immunpräzipitationen mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern eine wesentlich effizientere Anreicherung des Komplexes, was vermutlich auf die hohe Affinität der monoklonalen anti-HA Antikörper zurückzuführen ist. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass TRiC unter diesen experimentellen Bedingungen in vollständig assemblierter Form angereichert werden kann und die Modifikation einer Untereinheit die Komplexstabilität nicht beeinflusst. Jedoch war es nicht möglich, ausreichende Mengen Chaperonin von immobilisierten Antikörpern durch Competition mit freien 6HA-Peptiden bzw. pH-Wert-Erniedrigung (Glyzin-haltiger Puffer, pH 3) zu eluieren, ohne TRiC in seiner nativen Form zu beeinträchtigen. Daher wurde eine weitere, alternative Strategie zur Reinigung von TRiC entwickelt, die eine Aufreinigung des Komplexes in großen Mengen ermöglicht.

#### **3.1.4. Reinigung von TRiC mittels eines TEV-linker-6His-tags**

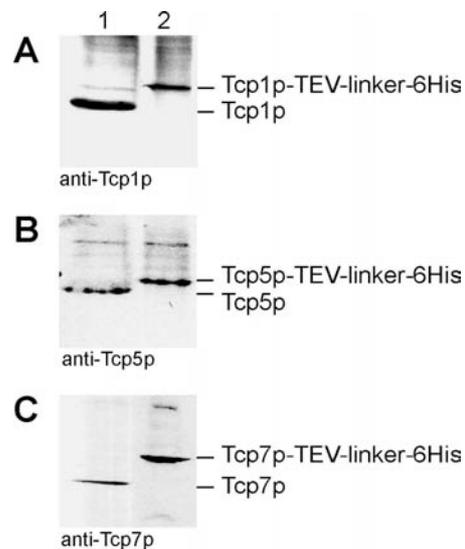
Die Entwicklung eines Protokolls zur Reinigung großer Mengen TRiC basierte auf Verwendung einer mit einem Histidin-*tag* modifizierten Chaperonin-Untereinheit, mit deren Hilfe sich der gesamte Komplex an eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätssäule binden und effizient eluieren lässt. Die Effektivität des 6His-Epitops zur Reinigung von TRiC wurde für mehrere TRiC Untereinheiten getestet. Hierzu wurden verschiedene haploide Hefestämme generiert, die für Fusionsproteine unterschiedlicher TRiC Untereinheiten mit Histidin-*tag* kodieren (Liste 2.1.5.2.). Für die chromosomale Integration des 6His-Epitops wurden PCR-Kassetten der Plasmide pYM24 oder pYM25 mit Gen-spezifischen Primern für die jeweilige Untereinheit amplifiziert und anschließend haploide Wildtyp-Hefezellen mit dem PCR-Produkt transformiert (s. 2.2.2.5.). Die PCR-Kassetten enthalten 5' von der 6His-kodierenden Sequenz zusätzliche DNS-Abschnitte, die für die TEV-Protease-Erkennungsschnittstelle sowie für eine alpha-helikale Verbindung (*linker*) von 37 Aminosäuren kodieren (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Schematische Darstellung einer *TCP1*-TEV-linker-6His Genfusion.**

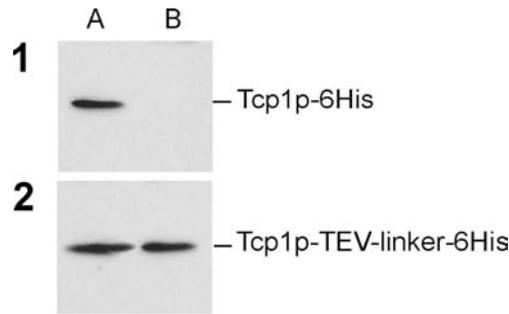
Mittles homologer Rekombination (1) wird TEV-linker-6His 3' von *TCP1/CCT1* in das Genom integriert (2).

Die Integration der Kassetten erfolgte am 3'-Ende des jeweiligen *TCP/CCT*-Gens. Die mittels homologer Rekombination generierten Genfusionen repräsentieren die einzige Kopie des jeweiligen *TCP/CCT*-Gens in haploiden Hefestämmen. Demzufolge beeinträchtigt die Modifikation einer Untereinheit mit dem TEV-linker-6His-*tag* nicht die essentielle Funktion von TRiC. Um die Integration zu überprüfen, wurden TCA-Extrakte von Wildtyp-Hefezellen sowie von Stämmen mit Fusionsproteinen im Western-Blot mit Antikörpern gegen die jeweilige Untereinheit analysiert. Abb. 3.7 zeigt exemplarisch für *Tcp1p*, *Tcp5p* sowie *Tcp7p* die korrekte Integration des TEV-linker-6His-*tags*. Verglichen mit Wildtyp-Proteine migrieren Fusionsproteine aufgrund ihrer Größe im SDS-Gel langsamer.



**Abb. 3.7: Chromosomale Genfusion von TEV-linker-6His-*tag* mit *TCP/CCT*-Genen.** Bei Hefestämmen mit chromosomaler Genfusion von (A) *TCP1*, (B) *TCP5* oder (C) *TCP7* mit TEV-linker-6His wurde die Synthese des jeweiligen Fusionsproteins im Western-Blot mit entsprechenden TRiC Untereinheitenspezifischen Antikörpern überprüft. (1) TCA-Extrakt von Wildtyp-Hefezellen und (2) Fusionsproteine unterschiedlicher TRiC Untereinheiten. Im SDS-Gel migrieren Fusionsproteine mit TEV-linker-6His-*tag* aufgrund ihrer Größe langsamer als Wildtyp-Proteine.

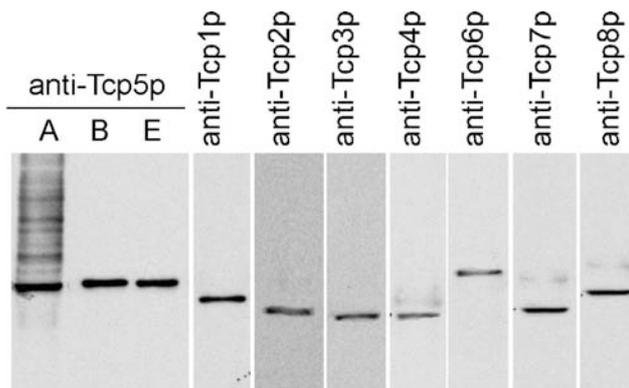
Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass ein C-terminaler 6His-Anhang ohne Zusatzverbindung keine Anreicherung des Komplexes an die Affinitätsmatrix erlaubt (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Zugänglichkeit C-terminaler 6His-Fusionen von Tcp1p-Untereinheiten an die Ni<sup>2+</sup>-Matrix.** Hefezellen, die für Tcp1p-6His (1) bzw. Tcp1p-TEV-linker-6His (2) kodieren, wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 gezogen und geerntet. Die lösliche Fraktion von Gesamt-Zellysate wurde einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie unterzogen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anti-Tcp1p-Western-Blots. (A) Ausgangsmaterial, 10 µg Gesamtprotein (B) 1/50 Volumenanteil Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose. Im Gegensatz zum 6His-tag ermöglicht der TEV-linker-6His-tag die Bindung von Tcp1p an die Matrix.

Da der C-Terminus jeder TRiC Untereinheit vermutlich im Inneren des Faltungskompartiments lokalisiert ist (Dietzel *et al.*, 1998), wird durch die Insertion der langen, alpha-helikalen Verbindung die Zugänglichkeit der Histidine an die Affinitätsmatrix womöglich erst gewährleistet (alpha-Helix aus 37 Aminosäuren entspricht ca. 55,5 Å; Das Innere einer Faltungshöhle/Ring des Thermosoms nimmt eine Höhe von ca. 45 Å in Anspruch, Dietzel *et al.*, 1998). Die zusätzliche Erkennungssequenz für die TEV-Protease bietet außerdem die Möglichkeit, den TEV-linker-6His-tag nach der Reinigungsprozedur zu entfernen.

Die Anreicherung vollständig assemblierter Komplexe mittels des TEV-linker-6His-tags wurde am Beispiel eines Hefestamms, der *TCP5*-TEV-linker-6His exprimiert, überprüft (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Anreicherung des Chaperonin-Komplexes mittels Affinitätschromatographie von Tcp5p-TEV-linker-6His.** Um zu überprüfen, ob TRiC sich mittels des TEV-linker-6His-tags anreichern lässt, wurde die lösliche Fraktion von Hefezellen, die *TCP5*-TEV-linker-6His exprimieren, einer Affinitätschromatographie unterzogen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot. (A) Ausgangsmaterial, 15 µg Gesamtprotein aus Hefe-Lysat, (B) 1/42 Volumenanteil Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose vor Elution mit Imidazol, (E) 1/10 Volumenanteil Elution mit 400 mM Imidazol, (anti-Tcp1 - anti-Tcp8p) entspricht Spur "E", die Transfermembranen wurden mit allen weiteren individuellen TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Hierzu wurden 4,5 mg Gesamtprotein der löslichen Fraktion des Hefe-Zelllysats mit 100  $\mu$ l  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose inkubiert. Gebundenes TRiC wurde mit 400 mM Imidazol von der Matrix eluiert (s. 2.4.4.1.). Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot. Die einzelnen Transfermembranen wurden mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern inkubiert. Dieses Experiment belegt, dass sich mittels einer TEV-linker-6His-Fusion der vollständige assemblierte Chaperonin-Komplex anreichern lässt.

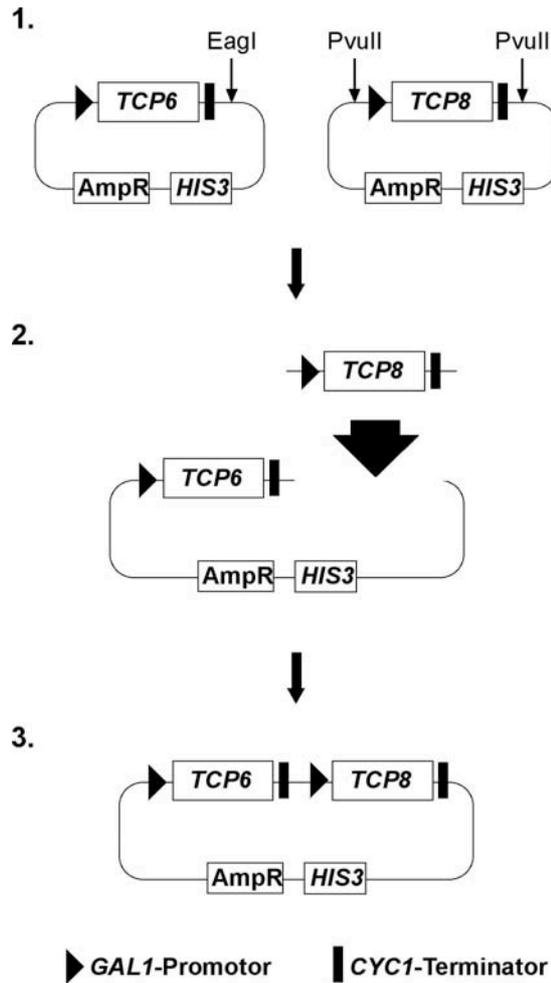
### 3.1.4.1. Hefestamm zur Überproduktion von TRiC

#### 3.1.4.1.1. Herstellung von Überexpressionsplasmiden für TRiC Untereinheiten

Um die zelluläre Konzentration von TRiC in den Hefen zu erhöhen, wurden alle 8 individuellen *TCP/CCT*-Gene überexprimiert. Hierzu wurden Überexpressionsvektoren mit Galaktose-induzierbaren Promotoren verwendet, die den  $2\mu$  Replikationsursprung von *S. cerevisiae* enthalten und in der Zelle in zahlreichen Kopien vorliegen. Jedes *TCP/CCT*-Gen wurde zunächst separat in einen Expressionsvektor unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors und des *CYC1*-Terminators kloniert (s. Tabelle 3.2). Die Galaktose-vermittelte Überexpression des jeweiligen *TCP/CCT*-Gens wurde in einem Induktionstest für alle Plasmide in Wildtyp-Hefezellen getestet (Daten nicht gezeigt). In einem 2. Klonierungsschritt wurden paarweise individuelle *TCP/CCT*-Gene mit den flankierenden *GAL1*-Promotor- und *CYC1*-Terminator-Sequenzen in jeweils einen Überexpressionsvektor kloniert (Abb. 3.10, s. folgende Seite). Auf diese Weise wurden 4 Vektoren zur Überproduktion von TRiC generiert (Tab. 3.2), die ebenfalls einem Induktionstest unterzogen wurden. Da alle 8 *TCP/CCT*-Gene unter Kontrolle derselben Promotorsequenz stehen, wird somit eine gleichstarke Genexpression begünstigt.

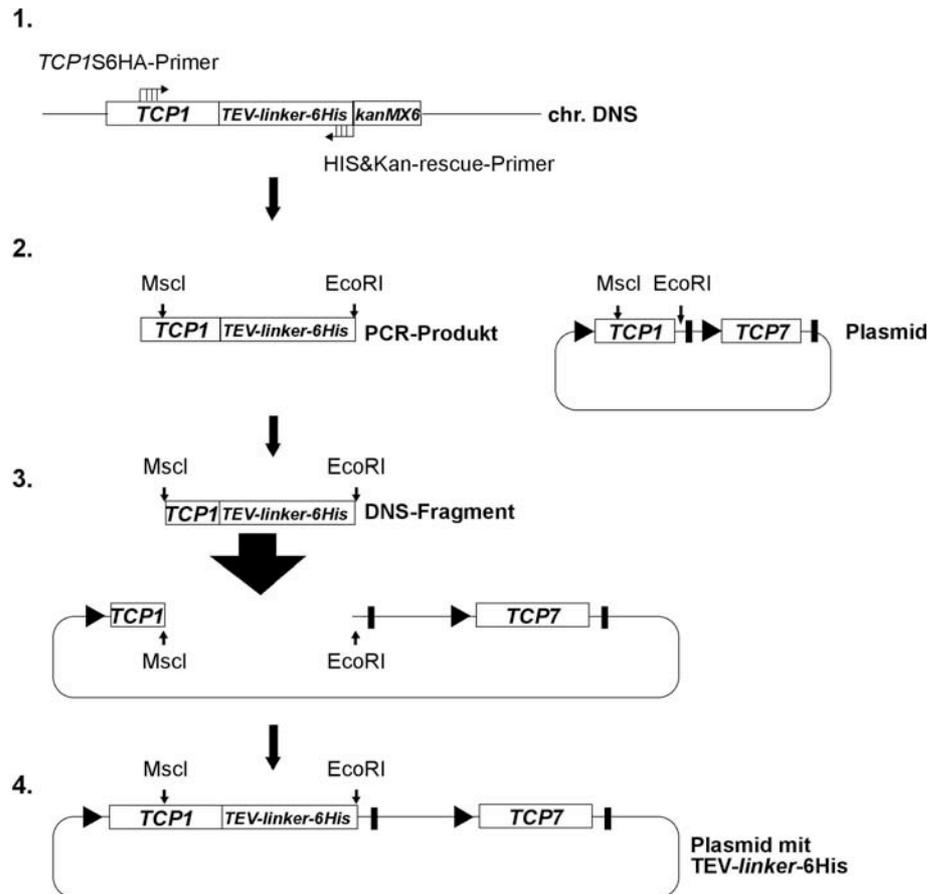
**Tabelle 3.2: Plasmide zur Überproduktion von TRiC**

Plasmid	Beschreibung	Marker	Quelle
pSi240	p424 <i>GAL1-TCP1/CCT1</i>	<i>TRP1</i>	Katja Siegers
pUB28	p426 <i>GAL1-TCP2/CCT2</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
pSi250	p424 <i>GAL1-TCP3/CCT3</i>	<i>TRP1</i>	„
pUB31	p425 <i>GAL1-TCP4/CCT4</i>	<i>LEU2</i>	„
pUB32	p425 <i>GAL1-TCP5/CCT5</i>	<i>LEU2</i>	„
pSi239	p424 <i>GAL1-TCP7/CCT7</i>	<i>TRP1</i>	„
pUB45	p423 <i>GAL1-TCP8/CCT8</i>	<i>HIS3</i>	„
pSi231	p425 <i>GAL1-TCP4/CCT4-GAL1-TCP5/CCT5</i>	<i>LEU2</i>	Katja Siegers
pSi241	p424 <i>GAL1-TCP1/CCT1-GAL1-TCP7/CCT7</i>	<i>TRP1</i>	„
pUB43	p426 <i>GAL1-TCP3/CCT3-GAL1-TCP2/CCT2</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
pUB46	p423 <i>GAL1-TCP6/CCT6-GAL1-TCP8/CCT8</i>	<i>HIS3</i>	„
pSi341	p424 <i>GAL1-TCP1/CCT1-TEV-linker-6His-GAL1-TCP7/CCT7</i>	<i>TRP1</i>	Katja Siegers
pSi349	p425 <i>GAL1-TCP4/CCT4-GAL1-TCP5/CCT5-TEV-linker-6His</i>	<i>LEU2</i>	„



**Abb. 3.10: Klonierung des *TCP6/TCP8*-Überexpressionsplasmids.** *TCP6/CCT6* und *TCP8/CCT8* stehen jeweils unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors und des *CYC1*-Terminators. (*AmpR*) Ampizillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*, (*HIS3*) Auxotrophiemarker zur Selektion in *S. cerevisiae*. **(1)** *TCP6*-Überexpressionsplasmid wurde mit *EagI* linearisiert, 5'-Überhänge mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt; *GAL1-TCP8-CYC1* Fragment wurde mit *PvuII* aus dem *TCP8*-Überexpressionsplasmid isoliert. **(2)** Ligation. **(3)** *TCP6/CCT8*-Überexpressionsplasmid.

Zu Anreicherung des überproduzierten Chaperonin-Komplexes wurde die *Tcp1p*-Untereinheit C-terminal mit einem TEV-linker-6His-Anhang versehen. Hierzu wurde genomische DNS eines Hefestammes, der für *TCP1-TEV-linker-6His* kodiert, als Matrize verwendet und hiermit ein Teilbereich von *TCP1/CCT1* sowie der kompletten TEV-linker 6His-Sequenz mittels PCR amplifiziert (s. 3.1.4.). Dieses Fragment wurde in das *TCP1/TCP7*-Überexpressionsplasmid (pSi241) kloniert, wodurch der ursprüngliche Leserahmen von *TCP1/CCT1* durch den TEV-linker-6His-tag erweitert wurde (pSi341; Abb. 3.11). Diese Klonierungsstrategie wurde analog für *TCP5/CCT5* angewendet (pSi349). Anschließend wurden die neu generierten Expressionsplasmide Überexpressionstests unterzogen.

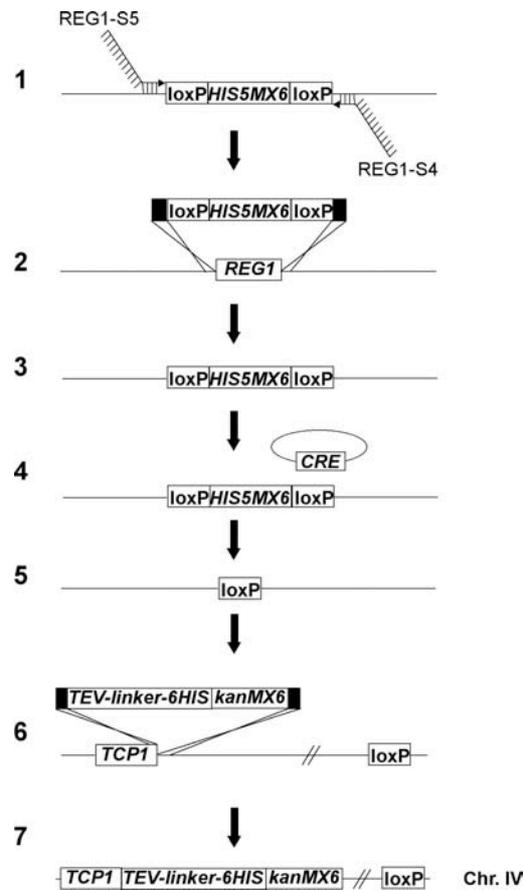


**Abb. 3.11: Klonierung des *TCP1*-TEV-linker-6His Fragments in den *TCP1/CCT1*-Leserahmen eines *TCP1/TCP7*-Überexpressionsplasmids. (1) Amplifizierung eines *TCP1*-TEV-linker-6His Fragments mit chromosomaler DNS eines *TCP1*-TEV-linker-6His Hefestammes als Matrize. (2) *MscI*/*EcoRI* Restriktionsverdau des *TCP1*-TEV-linker-6His PCR-Fragments sowie des Überexpressionsplasmids. (3) Ligation des *TCP1*-TEV-linker-6His Fragments mit dem linearisierten Überexpressionsplasmid. (4) Überexpressionsplasmid für *TCP1*-TEV-linker-6His und *TCP7*.**

### 3.1.4.1.2. Herstellung eines Hefestammes zur Überproduktion von TRiC

Eine Optimierung der Galaktose-vermittelten Expression wurde durch chromosomale Deletion des *REG1*-Gens erzielt (2.2.2.6.). In Gegenwart von Glukose ist die Expression Galaktose-regulierter Gene reprimiert. *REG1* kodiert für die regulatorische Reg1p-Untereinheit des Glc7p-Proteinphosphatase-Komplexes (Tu *et al.*, 1995). In Anwesenheit von Glukose vermittelt Glc7p-Reg1p Dephosphorylierung des transkriptionellen Repressors Mig1p, worauf dieser in den Zellkern transloziert und die Transkription Galaktose-induzierbarer Gene reprimiert (Schüller *et al.*, 2003). Durch Deletion von *REG1* wird die Mig1p-vermittelte Glukoserepression aufgehoben. Dadurch lässt sich Galaktose-vermittelte Expression von TRiC Untereinheiten in Anwesenheit von Glukose erreichen. Da Glukose im Vergleich zu Galaktose schneller metabolisiert wird, stellt es gleichzeitig eine optimale und kostengünstige Kohlenstoffquelle für Überexpression im großen Ansatz dar.

In Abb. 3.12 ist die Deletion des *REG1*-Gens schematisch dargestellt:



**Abb. 3.12: Generierung eines Hefestammes mit *REG1*-Deletion und chromosomaler *TCP1*-TEV-linker-6His-tag Genfusion.** Für Galaktose-induzierbare Überexpression von *TCP/CCT*-Genen wurde *REG1* (Chromosom IV) deletiert. Zur Entwicklung einer Reinigungsstrategie für TRiC wurde auf Chromosom IV die Sequenz für TEV-linker-6His-tag 3' an *TCP1* fusioniert. **(1)** Amplifizierung einer loxP-*HIS5*-loxP Disruptionskassette mit spezifischen *REG1*-S4-, *REG1*-S5 Oligonukleotiden **(2+3)** Homologe Rekombination und *REG1*-Disruption. **(4)** Transformation von Hefezellen mit einem für Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid. **(5)** Cre-vermittelte Rekombination zwischen 2 loxP Abschnitten führt zum *HIS5*-Marker Verlust. **(6+7)** Insertion und Fusion der TEV-linker-6His-*kanMX6*-Kassette an *TCP1* (siehe Abb. 3.6).

Hierzu wurde eine *REG1*-Disruptionskassette verwendet, bei der der *SpHIS5*-Marker von zwei Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP) flankiert ist. An diese schließen jeweils Sequenzen an, die komplementär zu den angrenzenden Genomabschnitten von *REG1* sind und der Insertion dienen. Die Deletion erfolgte über homologe Rekombination der Disruptionskassette am chromosomalen *REG1* Locus (s. 2.2.2.6.). Im Anschluss an die *REG1*-Deletion wurde durch Expression der Cre-Rekombinase das inserierte, von loxP-Sequenzen flankierte *SpHIS5*-Gen herausgeschnitten, so dass lediglich eine loxP-Sequenz an dieser Genomstelle verbleibt (s. 2.2.2.6.1.). Durch den Verlust des *SpHIS5* Selektionsmarkers wurde der Hefestamm erneut auxotroph für Histidin, was die Verwendung von Plasmid-kodiertem *SchIS3* Selektionsmarker für folgende Transformationen ermöglichte (siehe unten). Zusätzlich wurde im  $\Delta reg1$ -Stamm *TCP1/CCT1* chromosomal

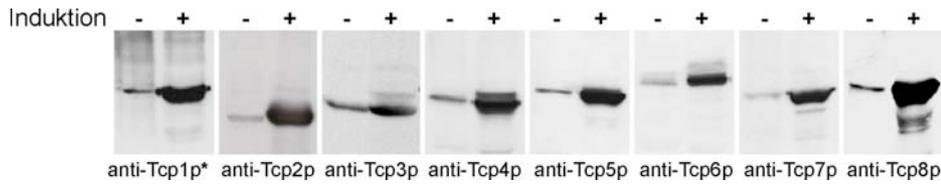
mit der TEV-linker-6His-Epitop-kodierenden Sequenz versehen (analog der Vorgehensweise in Kapitel 3.1.4.).

Auf diese Weise generierte  $\Delta reg1$  *TCP1/CCT1-TEV-linker-6His* Stämme lagen in beiden Paarungstypen ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ) vor und wurden für die Überproduktion von TRiC verwendet. Hierzu wurden Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps mit jeweils 2 verschiedenen *TCP/CCT*-Überexpressionsplasmiden, die je für 2 Untereinheiten kodieren, transformiert. Die Galaktose-vermittelte Expression der *TCP/CCT*-Gene wurde in Gegenwart von Glukose überprüft. Anschließend wurden beide Hefestämme miteinander gekreuzt (s. 2.2.2.7.), so dass der resultierende diploide Stamm alle vier verschiedene *TCP/CCT*-Überexpressionsplasmide enthält (pUB43, pUB46, pSi231, pSi341; siehe Tabelle 3.2). Da *TCP1/CCT1* sowohl extrachromosomal als auch chromosomal als Fusion mit TEV-linker-6His exprimiert wird, ist gewährleistet, dass kein TRiC ohne Epitop-Markierung in der Zelle vorliegt.

Analog wurde ein  $\Delta reg1$  Stamm mit *TCP5/CCT5-TEV-linker-6His* Fusion generiert. Demnach standen für die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für TRiC zwei verschiedene, diploide Überexpressionsstämme zur Verfügung, die sich lediglich in der Expression unterschiedlicher Genfusionen (*TCP1/CCT1* oder *TCP5/CCT5* mit TEV-linker-6His) unterschieden. Wie bereits in Kapitel 3.1.4. erwähnt, sind bei den einzelnen Hefestämmen, die verschiedene *TCP/CCT-TEV-linker-6His* Fusionsgene chromosomal exprimieren, keine Wachstumsunterschiede zu beobachten. Die Verwendung beider Hefestämmen ermöglichte eine vergleichbare Anreicherung von TRiC mittels des in Kapitel 3.1.4.2. beschriebenen Reinigungsprotokolls.

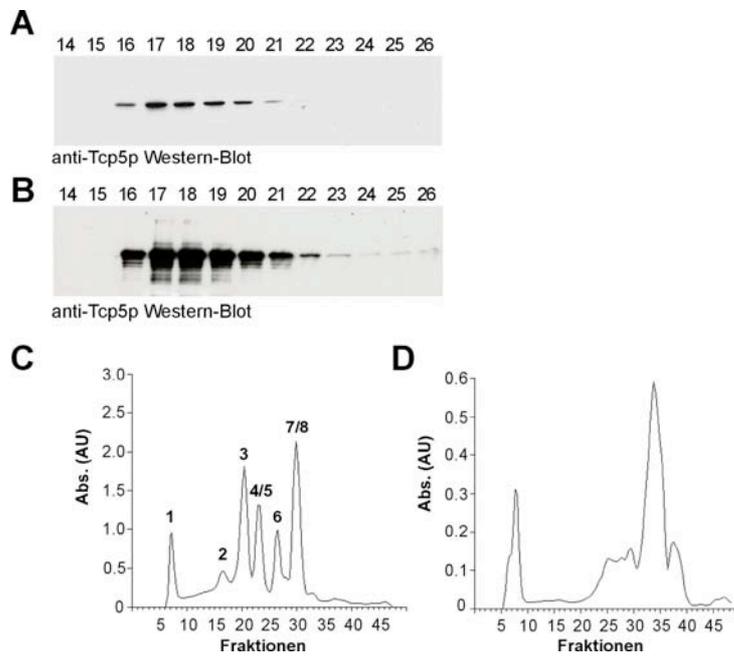
#### **3.1.4.1.3. Optimierung der TRiC Überproduktionsbedingungen im Großmaßstab**

Für die Reinigung von TRiC in großen Mengen wurde nach Bestimmung der Verdopplungszeit (204 min) der *TCP/CCT*-Überexpressionsstamm (UBY49) im Fermenter kultiviert (s. 2.2.2.3.). Die *reg1* Deletion erlaubte, neben Galaktose zur Genexpression der Untereinheiten auch die Verwendung von Glukose als optimale Kohlenstoffquelle im Medium. Beide Saccharide wurden durch Spaltung von Laktose mittels beta-Galaktosidase gewonnen und anschließend dem Medium zugefügt (s. 2.1.4.2.). Unter dem Aspekt, Kultivierung von Hefezellen zur Überproduktion von TRiC im Großmaßstab durchzuführen, stellt dies vor allem gegenüber der direkten Verwendung von Galaktose eine kostengünstige Methode dar. Testinduktionen mit unterschiedlichen Konzentrationen gespaltener Laktose ergaben eine Endkonzentration von 1% als optimalen Galaktose-Gehalt. Probe-Extrakte der Fermenterkultur vor und nach Galaktose-induzierter Genexpression wurden im Western-Blot miteinander verglichen. Für alle TRiC Untereinheiten konnte ein 20-50facher Anstieg der zellulären Menge durch die Galaktose-vermittelte Überexpression erzielt werden (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Galaktose-induzierte Überexpression von TCP/CCT-Genen.** Diploide  $\Delta reg1$  Zellen, die chromosomal für Tcp1p-TEV-linker-6His kodieren und zusätzlich TCP/CCT-Überexpressionsplasmide enthalten, wurden mit Galaktose inkubiert. Vor (-) und nach (+) Induktion wurden äquivalente Mengen Proben entnommen. Die Überproduktion einzelner TRiC Untereinheiten wurde über SDS-PAGE und Western-Blots mittels TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper analysiert. (Tcp1p\*) Da TCP1 chromosomal und extrachromosomal nur als Fusionsgen mit dem TEV-linker-6His-tag existiert, werden im Western-Blot auch keine Wildtyp-Tcp1p Signale detektiert.

Des Weiteren konnte anhand von Gelfiltrationschromatographie die Komplex-Assemblierung überproduzierter TRiC Untereinheiten gezeigt werden (Abb. 3.14). Hierzu wurde Lysat vom TCP/CCT-Überexpressionsstamm nach Induktion sowie von Wildtyphefen einer analytischen Gelfiltrationschromatographie unterzogen (SMART-System). Anhand eines anti-Tcp5p Western-Blots wurde ersichtlich, dass die Signalstärke der Fraktionen des Überexpressionsstammes gegenüber denen des Wildtypstammes um ca. das 50fache angestiegen war, sich beide Stämme in ihrem Elutionsprofil von TRiC aber nicht unterschieden (Fraktionen 16-20).



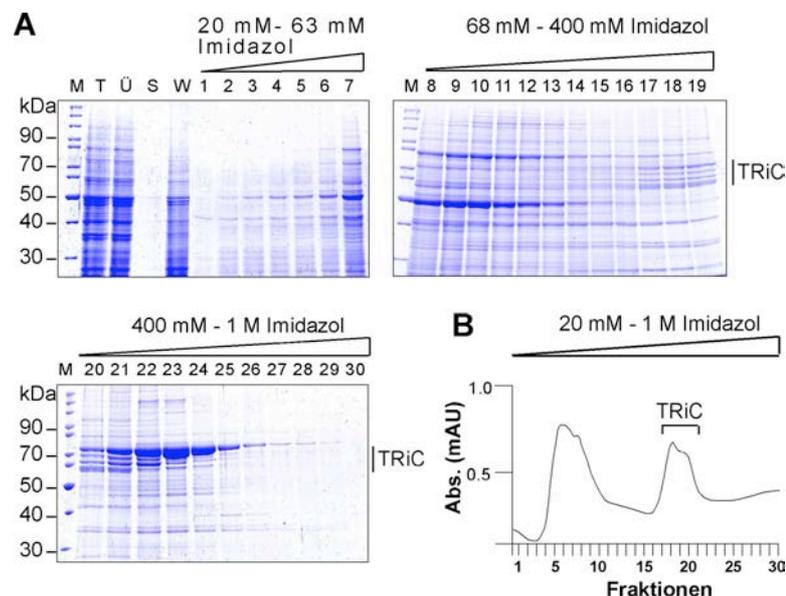
**Abb. 3.14: Gleichzeitige Überproduktion individueller TRiC Untereinheiten führt zur vollständigen Assemblierung des Chaperonin-Komplexes.** Lysat von Wildtyp-Hefezellen sowie TCP/CCT-Überexpressionsstamm wurde einer Gelfiltration (Superose 6) unterzogen und die Assemblierung überproduzierter TRiC Untereinheiten wurde im anti-Tcp5p Western-Blot analysiert. **(A)** Wildtyp-Zellysat, **(B)** TCP/CCT-Überexpressionsstamm. **(C)** Eichchromatogramm: (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) RibonukleaseA, 13 kDa. **(D)** Chromatogramm, TCP/CCT-Überexpressionsstamm (Lysat). TRiC fraktioniert in den Fraktionen 16-20 als vollständiger Komplex.

### 3.1.4.2. Entwicklung des Reinigungsprotokolls für TRiC

Das für die Anreicherung von TRiC aus *S. cerevisiae* entwickelte Protokoll umfasst im Wesentlichen folgende Reinigungsschritte (s. 2.4.4.2.):

- Lyse
- 1. Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie
- Gelfiltrationschromatographie
- Inkubation mit TEV-Protease
- 2. Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie (Filtersäule)
- Ionenaustauschchromatographie

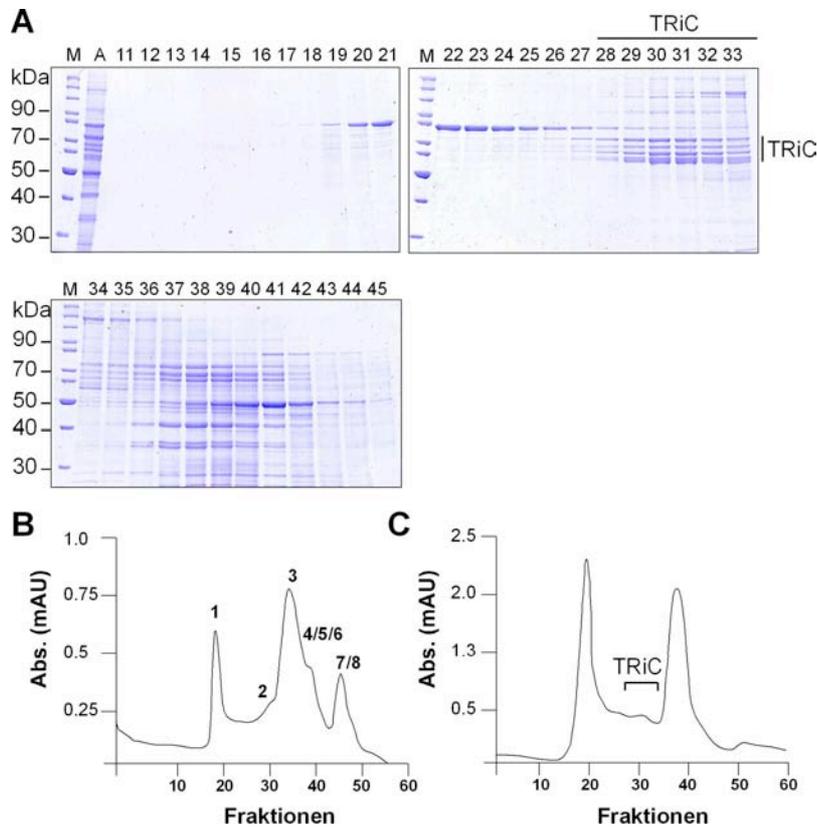
Für die Reinigung von TRiC in großen Mengen wurden 300 g Zellmaterial des *TCP/CCT*-Überexpressionsstammes mechanisch aufgeschlossen. Der Überstand wurde einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie unterzogen, und TRiC wurde mittels eines Imidazolgradienten eluiert (Abb. 3.15; s. 2.4.4.2.1.).



**Abb. 3.15: Anreicherung von TRiC mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie.** Die lösliche Fraktion (ca. 16 g Protein) des *TCP/CCT*-Überexpressionsstammes wurde einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie unterzogen, und gebundene Proteine wurden mittels eines Imidazolgradienten eluiert. **(A)** Coomassie-Gel: (M) Marker, (T) Total-Extrakt, 10 µg Protein, (Ü) Überstand, 10 µg Protein und (S) Sediment nach Zentrifugation (äquivalentes Volumen zu Ü), (W) 1/60000 Volumenanteil des Waschschruttes mit 20 mM Imidazol, (1-30) 1/2500 Volumenanteil aller Fraktionen des Imidazolgradienten. TRiC eluiert zwischen 95-460 mM Imidazol (Fraktion 14-21). **(B)** Chromatogramm der Affinitätschromatographie.

Im Coomassie-gefärbten Gel ließ sich bereits deutlich nach diesem ersten chromatographischen Reinigungsschritt das für TRiC typische Bandenmuster zwischen 55-70 kDa erkennen. Eine zusätzliche Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen zwei unterschiedliche Untereinheiten des Chaperonins grenzte den Elutionsbereich des Komplexes auf den Gradienten von ca. 95-460 mM Imidazol (Fraktionen 14-21) ein (Daten nicht gezeigt).

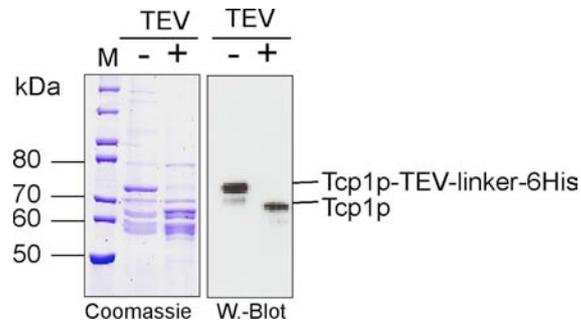
Nach Volumenreduktion TRiC-enhaltender Fraktionen durch Einengen (100 kDa Ausschlussvolumen) erfolgte im nächsten Schritt der Reinigung eine Größenfraktionierung und ein Pufferaustausch mittels Gelfiltrationschromatographie mit einer Sephacryl S400-Säule (Abb. 3.16; s. 2.4.4.2.2.).



**Abb. 3.16: Gelfiltrationschromatographie zur Größenfraktionierung von TRiC und Abtrennung von Verunreinigungen.** Um vollständig assemblierten Komplex von Verunreinigungen zu separieren, wurden TRiC-enhaltende Fraktionen im Anschluss an die Affinitätschromatographie einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen. **(A)** Coomassie-Gel: (M) Marker, (A) Ausgangsmaterial, 10  $\mu$ g Protein, (11-45) 1/2500 Volumenanteil der Fraktionen 11-45. TRiC (Fraktionen 28-33) wurde von Verunreinigungen (Fraktion 19-27, 34-44) separiert. **(B)** Chromatogramm der Eichproteine. 16 mg Eichmix wurden einer Gelfiltration unterzogen (8 Proteine, jeweils 2 mg/ml: (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) Ribonuklease A, 13 kDa). **(C)** Chromatogramm der TRiC-enhaltenden Probe.

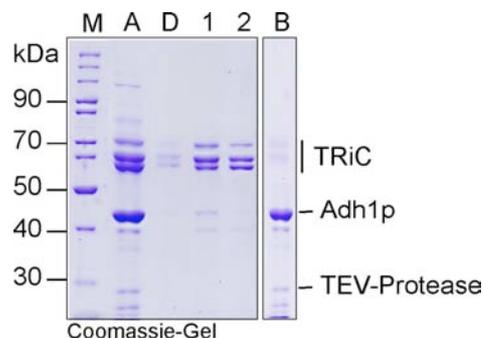
Wie auch im vorangegangenen Reinigungsschritt ließ sich hier im Coomassie-Gel das für das Chaperonin charakteristische Bandenmuster in den Fraktionen 28-33 erkennen. Eine Gelfiltration mit Eichproteinen ordnete diesen Bereich einem Molekulargewicht  $\geq$  669 kDa zu. Anhand der Coomassie-Gel Analyse wird die effektive Abtrennung von Kontaminationen, die früher (Fraktionen 19-27) bzw. später (Fraktionen 33-44) als TRiC von der Säule eluieren, verdeutlicht. Mit dem Pufferwechsel sollte vorrangig eine Verminderung der Glycerinkonzentration von 10% auf 5% erreicht werden, da sich ein erhöhter Glycerin-Gehalt im nachfolgenden Schritt nachteilig auf die Aktivität der TEV-Protease auswirkt, die zur proteolytischen Abspaltung des TEV-linker-6His-tags benötigt wird

(s. 2.4.4.2.3.). Die hohe Glycerinkonzentration diente während des Zellaufschlusses und der Affinitätschromatographie der Komplexstabilisierung, war aber in den folgenden Reinigungsschritten nicht mehr absolut erforderlich. Nach Inkubation mit TEV-Protease wurde die Abspaltung des TEV-linker-6His-tags von der Tcp1p-Untereinheit im Coomassie-Gel und anti-Tcp1p Western-Blot überprüft. Das Fusionsprotein migriert im SDS-Gel oberhalb von 70 kDa, während Tcp1p nach TEV-Inkubation bei ca. 65 kDa detektiert wird (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Abspalten des 6His-linker-TEV-tags von Tcp1p mittels TEV-Protease.** Nach der Gelfiltration wurden TRiC-enthaltende Fraktionen mit TEV-Protease inkubiert. Proben vor (-) und nach (+) Inkubation mit TEV-Protease wurden mittels Coomassie-Färbung bzw. anti-Tcp1p Western-Blot analysiert. Tcp1p-TEV-linker-6His migriert im SDS-Gel oberhalb von 70 kDa, während Tcp1p nach TEV-Verdau bei ca. 65 kDa detektiert wird.

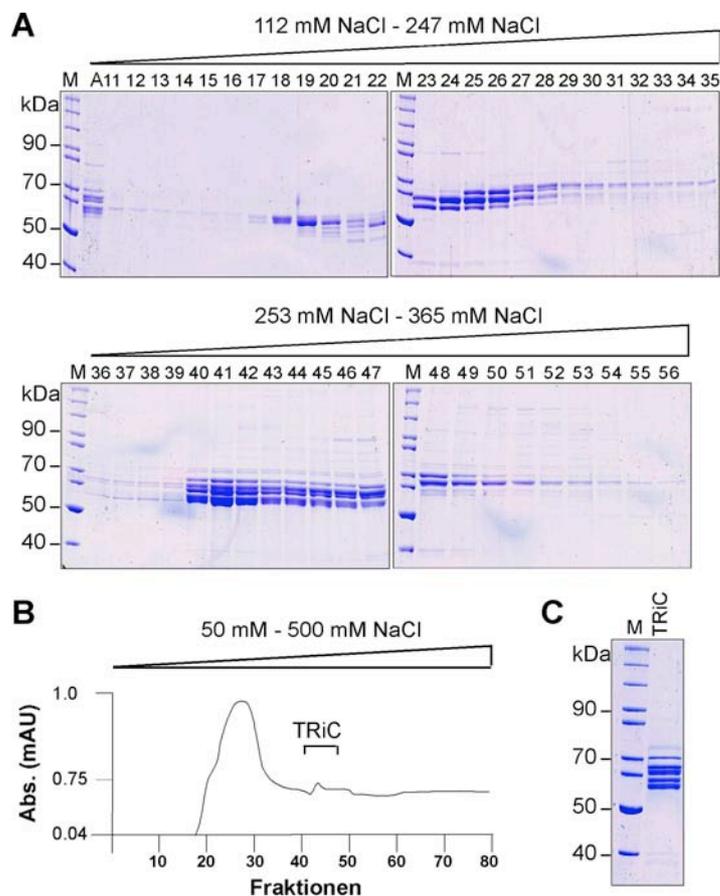
Ein weiterer Reinigungsschritt über eine 2.  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie (Filtersäule) diente dazu, Kontaminationen aus der TRiC-Präparation zu entfernen (s. 2.4.4.2.4.). Da in diesem Stadium der Reinigung der Chaperonin-Komplex keinen TEV-linker-6His-tag mehr enthält, wurde der abgespaltene TEV-linker-6His-tag, sowie die Histidin-markierte TEV-Protease und Proteine, die unspezifisch an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix gebunden hatten (wie beispielsweise die mittels Massenspektrometrie identifizierte Alkoholdehydrogenase I), gezielt aus der TRiC-Fraktion entfernt (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: TRiC wird mittels einer 2. Affinitätschromatographie von weiteren Kontaminationen separiert.** Nach Abspaltung des TEV-linker-6His-tags mittels TEV-Protease wurde TRiC-enthaltendes Konzentrat einer zweiten  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unterzogen. (M) Marker, (A) Ausgangsmaterial, 10  $\mu\text{g}$  Protein, (D) Durchfluss, (1-2) 1/2000 Volumenanteil von zwei 20 mM Imidazol-Waschschrritten, (B) 1/800 Volumenanteil der  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix nach den Waschschrritten. Adh1p (~42 kDa) und TEV-6His-Protease (~27 kDa) binden an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix und werden auf diese Weise von TRiC abgetrennt. Im Vergleich zu vorherigen Abbildungen ist die Auftrennung einzelner TRiC Untereinheiten aufgrund der Verwendung eines höher prozentigen SDS-Gels (12%) geringer.

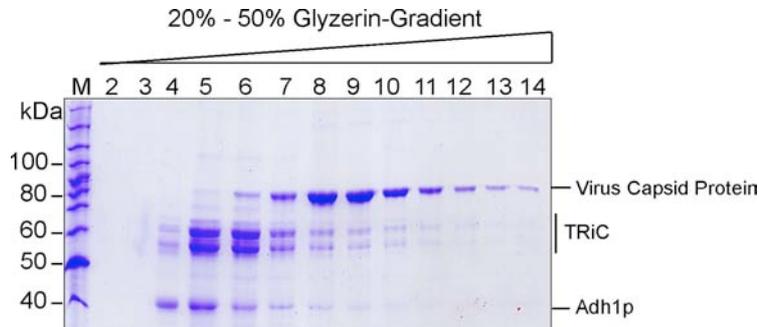
Restliche Kontaminationen bzw. unvollständig assemblierte Chaperonin-Komplexe wurden mittels Ionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule abgetrennt. Hierzu wurde TRiC zunächst für ca. 30 min mit ATP inkubiert (s. 2.4.4.2.5.), um die Dissoziation eventuell mitgereinigter Substrate vom Komplex zu begünstigen. Es hatte sich gezeigt, dass ein direkter Pufferwechsel zu hohen ATP-Konzentrationen während der Ionenaustauschchromatographie nachteilig für die Komplexstabilität ist (Daten nicht gezeigt). Durch Vorkinkubation mit ATP werden TRiC-Präzipitationen verhindert.

Die Coomassie-Gel Analyse zeigt das für TRiC typische Bandenmuster in den Fraktionen 40-47 (275 mM-314 mM NaCl; Abb. 3.19). Dieser Bereich des Gradienten, in dem intaktes Chaperonin eluiert, konnte ebenfalls anhand von Western-Blots mit Antikörpern gegen zwei verschiedene TRiC Untereinheiten als TRiC-Fraktion bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zerfallene oder unvollständige Komplexe eluieren bei anderen Salzkonzentrationen.



**Abb. 3.19: TRiC wird mittels Ionenaustauschchromatographie von weiteren Kontaminationen und Aggregaten separiert.** Im Anschluss an die 2. Affinitätssäule wurden TRiC-enthaltende Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen. **(A)** Coomassie-Gel: (M) Marker, (A) Ausgangsmaterial, 5  $\mu$ g Protein, (11- 56) jeweils 1/200 vom Fraktionsvolumen der Fraktionen 11-56. Vollständig assemblierter Komplex eluiert zwischen 275 und 314 mM NaCl (Fraktionen 40-47). **(B)** Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie. **(C)** TRiC-enthaltende Fraktionen wurden vereint, konzentriert und im Coomassie-Gel analysiert.

Parallel zur MonoQ-Säule kann ein 20–50%iger Glyzerol-Gradient verwendet werden, der zu ähnlichen Resultaten führt, in der Durchführung aber aufwendiger ist (exemplarisch in Abb. 3.20 gezeigt; s. 2.4.4.2.6.).



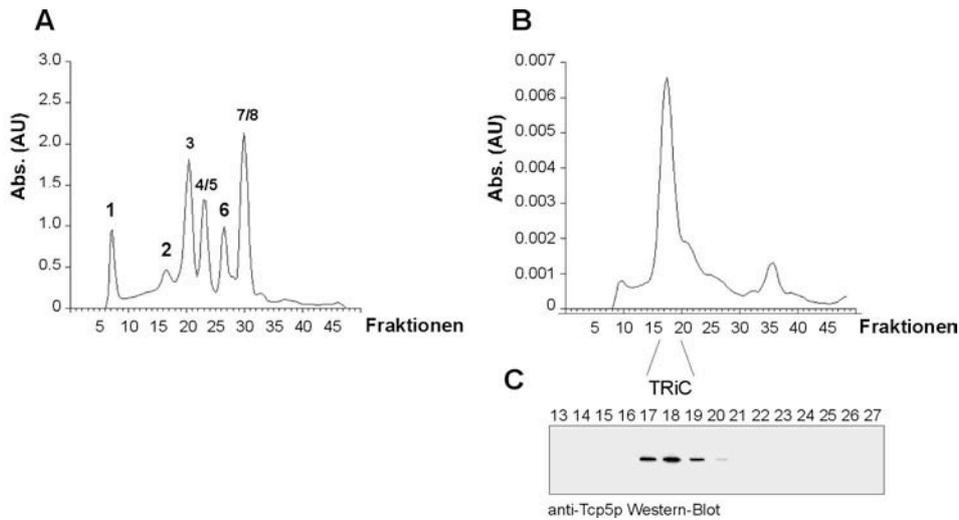
**Abb. 3.20: Glyzerin-Gradient zur Abtrennung von Verunreinigungen von TRiC.**

TRiC wurde durch einen 20% - 50% Glyzerin-Gradienten von Aggregaten und Kontaminationen separiert. Neben Adh1p lässt sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa erkennen, das anhand von Massenspektrometrie Daten als Capsid Protein des dsRNA L-A Viruses identifiziert wurde. Hefestämme tragen häufig Infektionen mit Hefeviren, die jedoch zu keiner phänotypischen Ausprägung führen.

Mit diesem Reinigungsprotokoll lassen sich aus 300 g Zellmaterial bis zu 3,6 mg TRiC isolieren. Im Anschluss an verschiedene Qualitätskontrollen, mit deren Hilfe die Integrität des gereinigten Komplexes überprüft wurde (s. 3.1.4.3.), wurde das Chaperonin in einer Konzentration von ca. 5 µg/µl in Gegenwart von 5% Glyzerin bei –80°C gelagert. Dieser Schritt beeinträchtigt weder die Assemblierung noch die Aktivität des Komplexes (s. 3.2.2.2.; 3.1.4.3.).

### 3.1.4.3. Qualitätskontrollen für gereinigtes TRiC

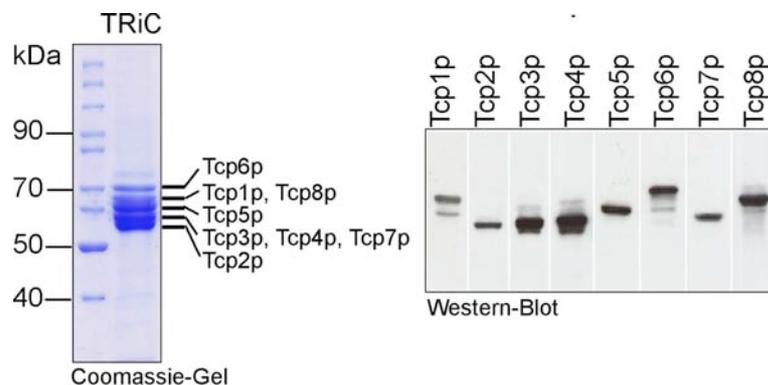
Die Stabilität des Komplexes wurde nach einem -80°C Gefrierschritt und anschließendem Auftauen auf Eis mittels analytischer Gelfiltrationschromatographie überprüft. Dazu wurden 50 µg gereinigter Komplex mittels einer Superose 6PC3.2-Säule (SMART-System) fraktioniert. Das Elutionsprofil zeigt ein einziges Maximum (Wellenlänge 280 nm), das sich durch Vergleich mit einer vorangegangenen Chromatographie mit Eichproteinen ca. 669 kDa zuordnen lässt (Abb. 3.21). Demzufolge liegt das gereinigte Chaperonin als hochmolekularer Komplex vor. Gleichzeitig zeigt eine Western-Blot Analyse, hier mit einem anti-Tcp5p Antikörper, dass TRiC-spezifische Signale mit dem Maximum (280 nm) des Elutionsprofils korrelieren. Demnach lassen sich stabile Chaperonin-Komplexe aus Hefe isolieren (Abb. 3.21 C).



**Abb. 3.21: Analyse von gereinigtem TRiC mittels analytischer Gelfiltration.**

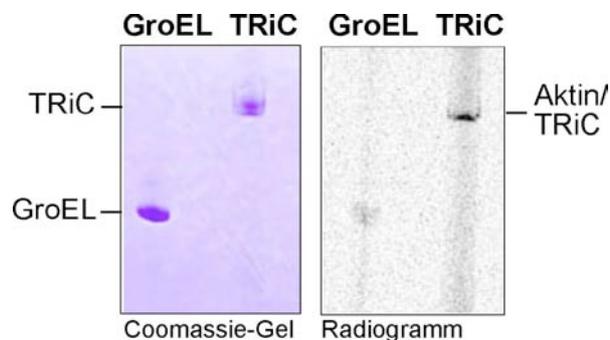
(A) 100 µg Eichmix (bestehend aus (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) RibonukleaseA, 13 kDa) bzw. (B) 50 µg gereinigtes TRiC wurde einer Gelfiltrationschromatographie (Superose 6; SMART) unterzogen. Fraktionen 17-20 beinhalten vollständig assemblierten Chaperonin-Komplex. (C) Western-Blot Analyse. Signale des Western-Blots decken sich mit dem Absorptionsmaximum (280 nm) des Elutionsprofils.

Des Weiteren zeigt sich anhand von Western-Blots mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern (Abb. 3.22), dass alle TRiC Untereinheiten im Komplex vertreten sind. Aufgrund der relativ hohen Konzentration an geladenem TRiC (0.25 µg) treten teilweise Kreuzreaktionen mit anderen TRiC Untereinheiten auf. Im Tcp1p Western-Blot entspricht das untere Signal schneller migrierendem – d.h. geringeres Molekulargewicht – Tcp7p und im Tcp6p Western-Blot entspricht das untere Signal Tcp5p.



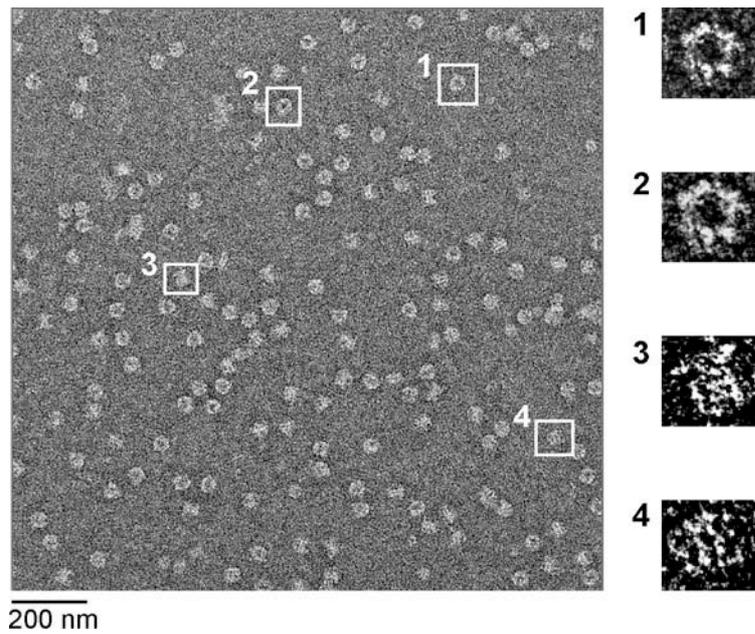
**Abb. 3.22: Western-Blot Analyse bestätigt die Integrität von gereinigtem TRiC.** Gereinigtes TRiC wurde im Coomassie-Gel sowie in Western-Blots mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antikörpern analysiert. Alle 8 verschiedenen TRiC Untereinheiten wurden im Western-Blot nachgewiesen. Aufgrund der hohen Konzentration an geladenem TRiC treten Kreuzreaktionen mit anderen TRiC Untereinheiten auf.

Einen weiteren Aufschluss über Qualität und Beschaffenheit des gereinigten multimeren Komplexes ergab eine Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen (Abb. 3.23; s. 2.4.1.2.). Für dieses Experiment wurde TRiC mit denaturiertem, radioaktiv-markiertem Aktin inkubiert (s. 2.4.11.1.) und anschließend mittels einer Nativ-Gelelektrophorese analysiert. In einem Kontrollansatz wurde das bakterielle Chaperonin GroEL mit Aktin inkubiert. Deutlich migrierte TRiC als einzelne Bande, was ein weiterer Beleg für die Integrität des Komplexes ist. Ein erstes Indiz für die Funktionalität des gereinigten Chaperonins ergab das Radiogramm. Der Vergleich zwischen Coomassie-Färbung und Autoradiogramm zeigt, dass radioaktiv-markiertes Aktin mit TRiC ko-migriert. Die Bindung von TRiC an eines seiner Hauptsubstrate ist ein erstes Indiz für die Funktionalität des gereinigten Komplexes.



**Abb. 3.23: Nativ-Gelelektrophorese bestätigt die Integrität von gereinigtem TRiC.** Denaturiertes, radioaktiv-markiertes Aktin wurde mit äquivalenten Mengen GroEL (Kontrolle) oder TRiC inkubiert. Im Nativ-Gel migrieren vollständig assemblierte Chaperonin-Komplexe als einzelne Bande. Die spezifische Bindung radioaktiv-markierten Aktins an TRiC wurde im Radiogramm belegt.

Die Homogenität der gereinigten Komplexe wurde mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegt (Abteilung Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried). In Abb. 3.24 sind ausschließlich regelmäßige Partikel zu erkennen, Bruchstücke oder Aggregate sind nicht vertreten. Darüber hinaus zeigen die globulären Strukturen einerseits ringförmige Aufsichten (ca. 15 nm im Durchmesser), oder tonnenförmige Seitenansichten (ca. 16 nm in der Länge) von Komplexen.



**Abb. 3.24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Homogenität der TRiC-Reinigung.** Zur Negativ-Kontrastierung wurden mit Uranylazetat beschichtete TRiC-Präparate hergestellt. (1+2) Aufsicht auf den Komplex mit typischer Ringstruktur, (3+4) Seitenansicht des tonnenförmigen Chaperonins.

### 3.2. *In vitro* Proteinfaltungsstudien mit gereinigtem TRiC im prokaryotischen Translationssystem

Mit der Entwicklung eines Protokolls zur quantitativen Reinigung eines intakten und funktionell aktiven Chaperonin-Komplexes waren *in vitro* Studien mit Wildtyp-Chaperonin, u.a. zur Substratvalidierung, möglich. Hierzu wurde die Faltung von TRiC-Substraten in Abhängigkeit von TRiC und anderen gereinigten Chaperonen, wie GimC und Ssb, mit Hilfe von *in vitro* Faltungsexperimenten untersucht. Im Gegensatz zu herkömmlichen Faltungsexperimenten, in denen die Rückfaltung eines potentiellen, denaturierten Substrats in Abhängigkeit von Chaperonen untersucht wird, wurde in dieser Arbeit die Faltung von neu synthetisierten Polypeptidketten analysiert. Dies liegt vor allem darin begründet, dass *in vivo* TRiC hauptsächlich an der *de novo* Proteinfaltung, nicht jedoch an der Rückfaltung denaturierter Proteine beteiligt ist (Frydman *et al.*, 1994).

Anhand von Bindungsexperimenten und Ko-Immünpräzipitationen konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Chaperone zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Proteinfaltung eine Rolle spielen (als Review siehe Young *et al.*, 2004). Während beispielsweise Ssb hauptsächlich ko-translational wirkt und vermutlich die naszente Polypeptidkette schützt (Pfund *et al.*, 1998), ist TRiC ko- und posttranslational an der Proteinfaltung beteiligt (McCallum *et al.*, 2000; Siegers *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde die Faltung *in vitro* synthetisierter Proteine in Abhängigkeit von eukaryotischen Chaperonen untersucht. Hierzu wurde ein prokaryotisches *in vitro* Translationssystem (RTS) gewählt, das über keine eukaryotischen Chaperone verfügt. Ein solches prokaryotisches System ermöglicht die gezielte Faltungsanalyse eines neu synthetisierten, eukaryotischen Proteins in Abhängigkeit von gereinigten, eukaryotischen Chaperonen. Mit Hilfe dieses Systems wurde zum einen die Faltung der Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin in Abhängigkeit von TRiC und GimC und zum anderen die Faltung von Proteinen mit *WD-repeats* in Abhängigkeit von TRiC und Ssb untersucht.

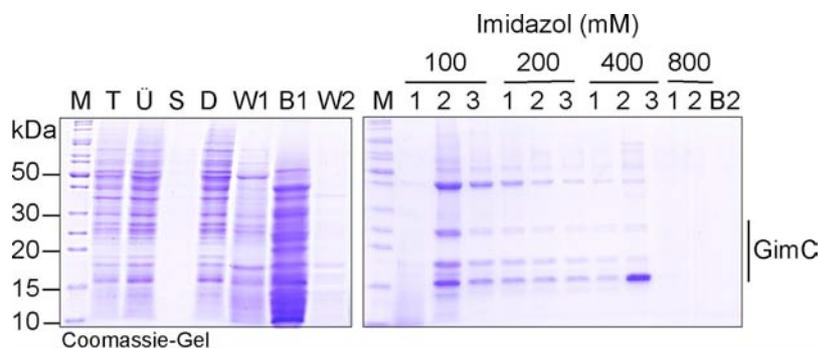
### 3.2.1. TRiC-vermittelte Proteinfaltung mit Hilfe akzessorischer Faktoren

Für die angestrebten Proteinfaltungsexperimente wurden zusätzlich anhand von bereits im Labor etablierten Protokollen GimC aus Hefe (Diplomarbeit Ute Zeidler) sowie Ssb1p aus *E. coli* (Andreas Bracher, Abteilung Hartl) gereinigt.

#### 3.2.1.1. Reinigung von GimC aus *S. cerevisiae*

##### 3.2.1.1.1. Optimierung des Reinigungsprotokolls

Zur Reinigung von GimC wurde ein bereits bestehendes Protokoll (Diplomarbeit Ute Zeidler) herangezogen und bezüglich der Reinigungsschritte (Pufferwahl, Säulenvolumina, Wasch- und Elutionsvolumina; s. 2.4.4.3.) optimiert. Für die Isolierung von GimC wurden die für die 6 individuellen Gim-Untereinheiten kodierenden Gene unter Kontrolle eines Kupfer-induzierbaren Promotors in Hefezellen überexprimiert. Analog zur Reinigung von TRiC wurde eine Untereinheit von GimC, Gim6p, mit einer TEV-6His Fusion versehen. Die Anreicherung des Komplexes erfolgte mittels eines Imidazol-Stufengradienten über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätssäule (Abb. 3.25; s. 2.4.4.3.1.).

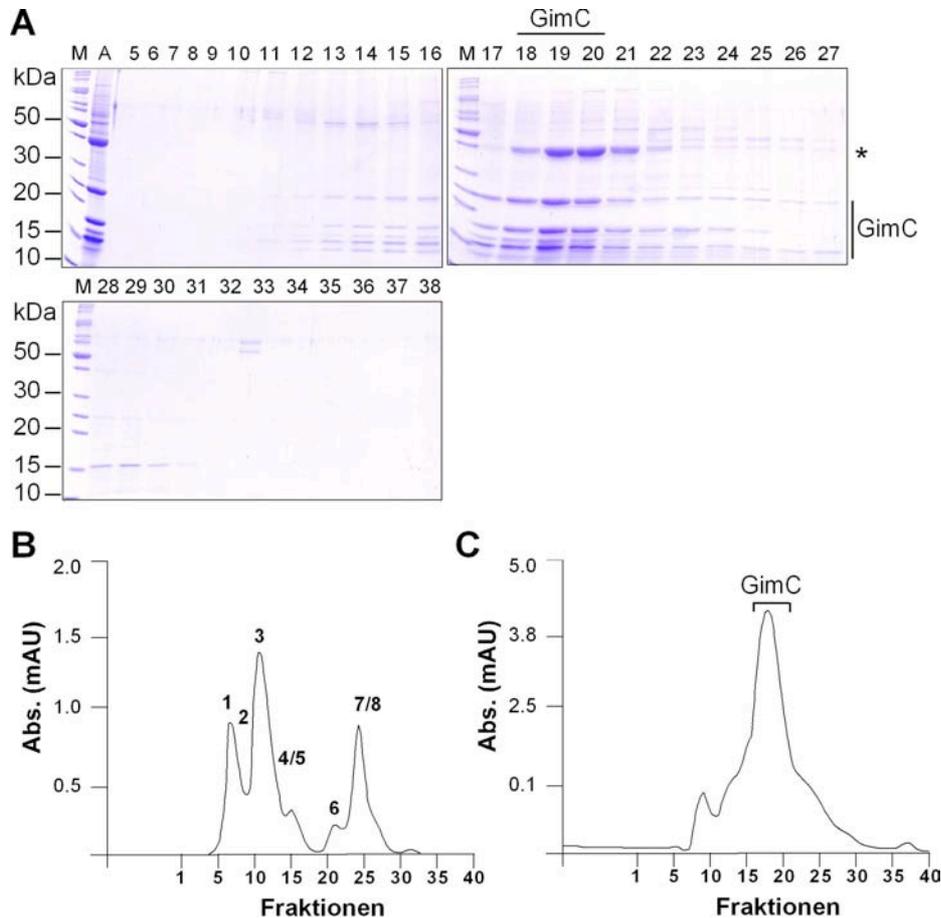


**Abb. 3.25: Anreicherung von GimC mittels  $\text{Ni}^{2+}$  Affinitätschromatographie.**

Die lösliche Fraktion des *GIM*-Expressionsstammes wurde einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unterzogen, und gebundene Proteine wurden mittels eines Imidazol-Stufengradienten eluiert (Gravitationsfluss). (M) Marker, (T) Total-Extrakt, 6  $\mu\text{g}$  Protein, (Ü) Überstand, 10  $\mu\text{g}$  Protein und (S) Sediment nach Zentrifugation, (D) Durchlauf, (W1) 1/12000 Volumenanteil vom Waschschrift (ohne Imidazol), (B1) 1/2000 Volumenanteil der  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix vor Elution mit Imidazol, (W2) 1/8000 Volumenanteil vom 20 mM Imidazol-Waschschrift, (20, 100, 200, 400, 800 mM) 1/6000 Volumenanteil jeweiliger Fraktionen des Imidazolgradienten, (B2) 1/2000 Volumenanteil der  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix nach Imidazol-Elution. Fraktion 2 bei 100 mM Imidazol bis einschließlich Fraktion 1 bei 400 mM Imidazol beinhalten GimC.

Nach diesem Reinigungsschritt ließ sich im Coomassie-gefärbten Gel bereits deutlich das für GimC typische Bandenmuster (12-24 kDa) in den Fraktionen mit einem Imidazol-Gehalt von 100-400 mM erkennen. Wie bereits bei der Reinigung von TRiC assoziierte auch bei der GimC-Reinigung Alkoholdehydrogenase 1 (Adh1p) unspezifisch mit der  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix (Western-Blot Analyse; Daten nicht gezeigt).

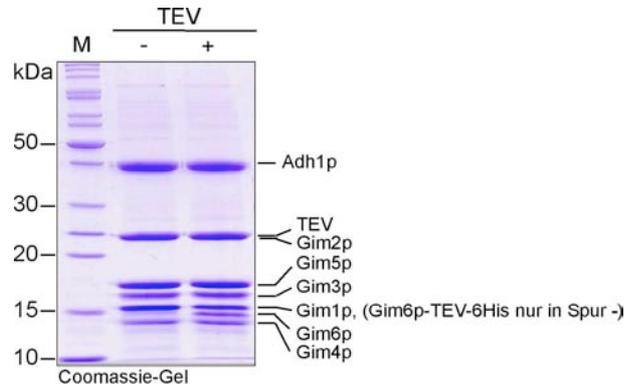
Zur Größenfraktionierung wurde die GimC-enthaltende Probe einer Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200 16/60-Säule unterzogen (Abb. 3.26; s. 2.4.4.3.2.).



**Abb. 3.26: Größenfraktionierung von GimC mittels Gelfiltrationschromatographie.** Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde GimC-enthaltende Probe einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen und im Coomassie-Gel analysiert. **(A)** (M) Marker, (A) 10 µg Ausgangsmaterial, (5-38) 1/500 Volumenanteil der Fraktionen 5-38, (\*) Adh1p-Kontamination. Fraktionen 17-21 beinhalten vollständig assembliertes GimC. **(B)** Chromatogramm der Eichproteine: (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) RibonukleaseA, 13 kDa. **(C)** Chromatogramm der GimC-enthaltenden Probe.

GimC fraktioniert als Komplex in Fraktionen 17-21. Obwohl die errechnete Größe von GimC einem Molekulargewicht von etwa 96 kDa entspricht, fraktioniert GimC im Vergleich mit dem Elutionsprofil der Eichproteine erfahrungsgemäß im Bereich von 158 kDa. Dieses Migrationsverhalten ist vermutlich auf die sterischen Eigenschaften des Komplexes zurückzuführen. Zusätzlich zeigte sich im Coomassie-Gel eine weitere Bande bei ca. 40 kDa, die als Adh1p identifiziert wurde und als tetramere Alkoholdehydrogenase (Buhner und Sund, 1969) mit GimC ko-fraktioniert.

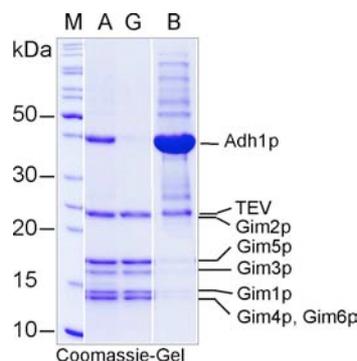
Im weiteren Verlauf der Reinigung wurde mittels TEV-Protease der Hexahistidin-Rest von der Gim6p-Untereinheit abgespalten (s. 2.4.4.3.3.). In Abb. 3.27 lässt sich deutlich das unterschiedliche Migrationsverhalten von Gim6p vor und nach Abtrennung des TEV-6His-tags erkennen (das Fusionsprotein ko-migriert mit Gim1p). Gim2p und TEV-Protease migrieren zusammen, und lassen sich daher im Coomassie-Gel nicht einzeln detektieren.



**Abb. 3.27: Abspalten des TEV-6His-tags von Gim6p mittels TEV-Protease.**

GimC-enthaltende Fraktionen wurden nach Gelfiltration mit TEV-Protease inkubiert. Proben vor (-) und nach (+) Inkubation mit TEV-Protease wurden im 17 % Polyacrylamidgel analysiert. TEV-6His-Protease komigriert mit Gim2p. Vor TEV-Inkubation migriert Gim6p-TEV-6His mit Gim1p (ca. 15 kDa), während nach TEV-Inkubation Gim6p ohne TEV-6His-tag etwas schneller migriert (ca. 14 kDa).

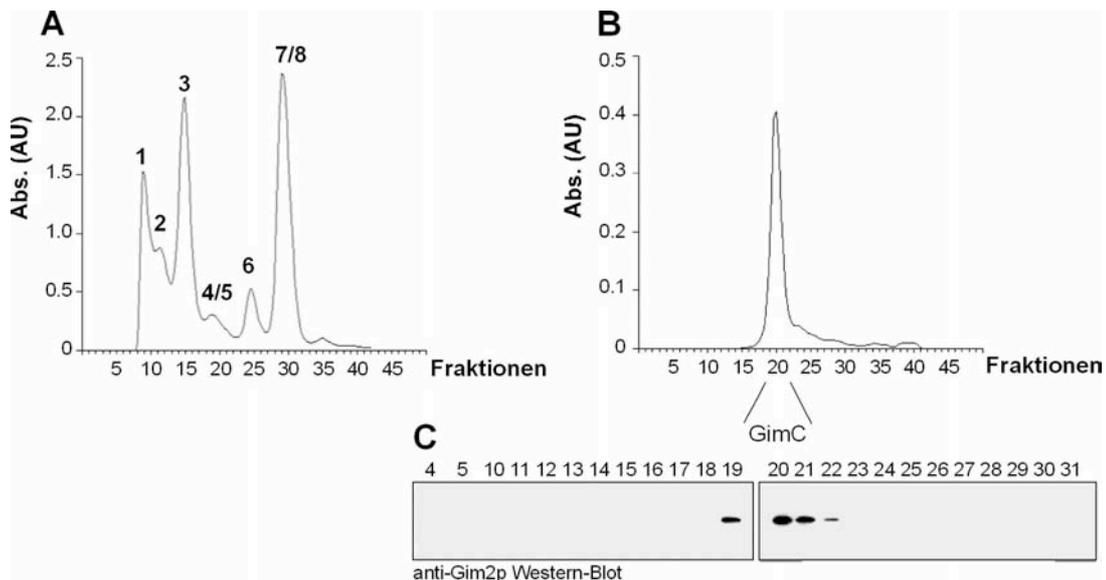
Im letzten Reinigungsschritt wurde GimC über eine zweite  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätssäule (s. 2.4.4.3.4.) von abgespaltenem TEV-6His-tag, His-markierter TEV-Protease sowie weiteren Proteinen, die unspezifisch an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätsmatrix binden, separiert (Abb. 3.28). Mit diesem Protokoll lassen sich aus 60 g Hefezellen bis zu 6,9 g GimC isolieren.



**Abb. 3.28: GimC wird mittels einer 2.  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie von weiteren Kontaminationen separiert.** Nach Abspaltung des TEV-6His-tags mittels TEV-Protease wurde GimC-enthaltende Probe einer zweiten  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unterzogen. (M) Marker, (A) 1/3250 Volumenanteil vom Ausgangsmaterial, (G) 1/3250 Volumenanteil GimC (Durchlauf und 20 mM Imidazol-Waschschrift vereint), (B) 1/200 Volumenanteil der  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix nach Inkubation mit GimC-enthaltender Probe. Adh1p (~42 kDa) und TEV-6His-Protease (~ 27 kDa) binden an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix und werden auf diese Weise von GimC abgetrennt.

### 3.2.1.1.2. Qualitätskontrollen für gereinigtes GimC

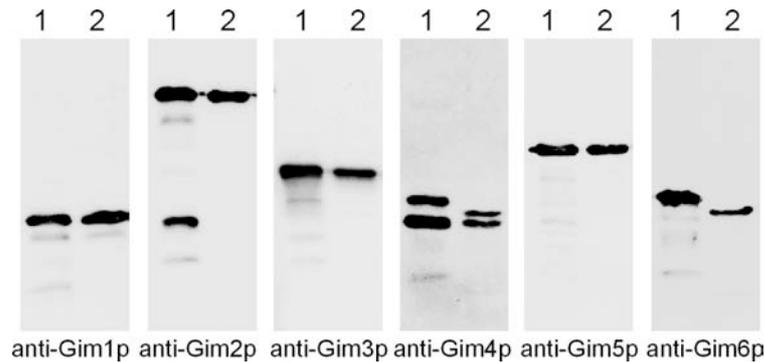
Die Stabilität des gereinigten Komplexes wurde mittels analytischer Gelfiltrationschromatographie überprüft (Abb. 3.29; s. 2.4.4.3.5.). Das Elutionsprofil zeigt ein einziges Maximum (Wellenlänge 280 nm), das sich mit den im Western-Blot detektierten Gim2p-Signalen in den Fraktionen 19-22 deckt.



**Abb. 3.29: Analyse von gereinigtem GimC mittels analytischer Gelfiltration.**

(A) 100 µg Eichmix (bestehend aus (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) RibonukleaseA, 3 kDa) bzw. (B) 150 µg gereinigtes GimC wurden zur Größenfraktionierung (Superose 6, SMART) eingesetzt. Fraktionen 19-22 beinhalten vollständigen Gim-Komplex. (C) Western-Blot Analyse. Signale decken sich mit dem Maximum (280 nm) des Chromatogramms.

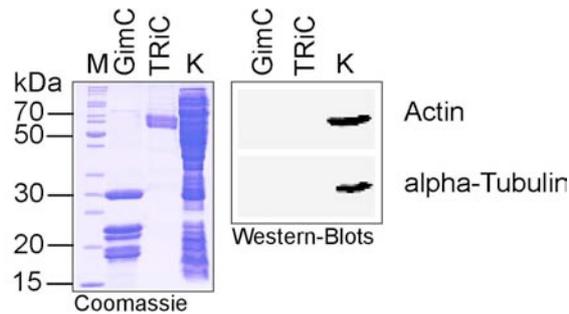
Die Integrität des Komplexes wurde anhand einer Western-Blot Analyse mit Antiseren gegen individuelle GimC-Untereinheiten überprüft (Abb. 3.30). Neben gereinigtem GimC (0.5 µg) wurde Total-Extrakt des *GIM*-Überexpressionsstamms als Kontrolle geladen. Die Western-Blot Analyse mit anti-Gim6p Antiserum zeigt deutlich das unterschiedliche Migrationsverhalten von Gim6p-TEV-6His (Spur 1) und Gim6p ohne TEV-6His-tag (Spur 2). Zusätzliche Signale im Gim4p Western-Blot lassen sich dadurch erklären, dass das anti-Gim4p Antiserum neben Gim4p auch Gim6p detektiert. Im anti-Gim2p Western-Blot tritt in der Spur mit Total-Extrakt (Spur 1), nicht aber mit gereinigtem Komplex (Spur 2) ein weiteres Signal auf, das sich vermutlich auf proteolytische Degradation von Gim2p zurückführen lässt.



**Abb. 3.30: Western-Blot Analyse bestätigt die Integrität von gereinigtem GimC.**

Aliquots von (1) je 10  $\mu\text{g}$  Protein des Total-Extraktes und (2) je 0.5  $\mu\text{g}$  GimC wurden mittels Western-Blots mit individuellen GimC-Antikörpern analysiert. Deutlich detektiert anti-Gim6p das unterschiedliche Migrationsverhalten von (1) Gim6p-TEV-6His und (2) Gim6p ohne TEV-6His-tag. Anti-Gim4p detektiert neben Gim4p auch Gim6p.

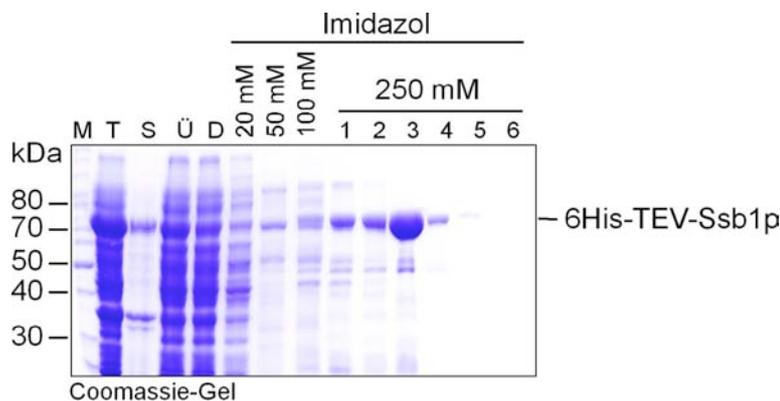
Der Reinheitsgrad von gereinigtem GimC und TRiC wurde im Western-Blot überprüft (Abb. 3.31). Selbst bei Analyse großer Mengen gereinigter Chaperone (15  $\mu\text{g}$  GimC, 8  $\mu\text{g}$  TRiC) wurden weder Aktin noch alpha-Tubulin, beides prominente Substrate von GimC und TRiC, immunologisch nachgewiesen. Diese Tatsache belegt den hohen Reinheitsgrad der gereinigten Chaperon-Komplexe und ermöglicht die Verwendung beider Komplexe für die folgenden *in vitro* Substratbindungsstudien.



**Abb. 3.31: Gereinigtes GimC und TRiC enthalten keine nachweisbaren Mengen von Substrat.** Zur Bestimmung des Reinheitsgrads gereinigter Proteinkomplexe wurden je 15  $\mu\text{g}$  GimC und 8  $\mu\text{g}$  TRiC einer SDS-PAGE unterzogen und im Coomassie-Gel sowie im Western-Blot mit anti-Aktin und anti-alpha-Tubulin Antikörpern analysiert. (M) Marker. Als Positiv-Kontrolle (K) wurde Hefe-Zelllysat geladen (15  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein). Die Western-Blot Analyse zeigt, dass die gereinigten Komplexe keine nachweisbaren Mengen der Substrate Aktin und alpha-Tubulin enthalten.

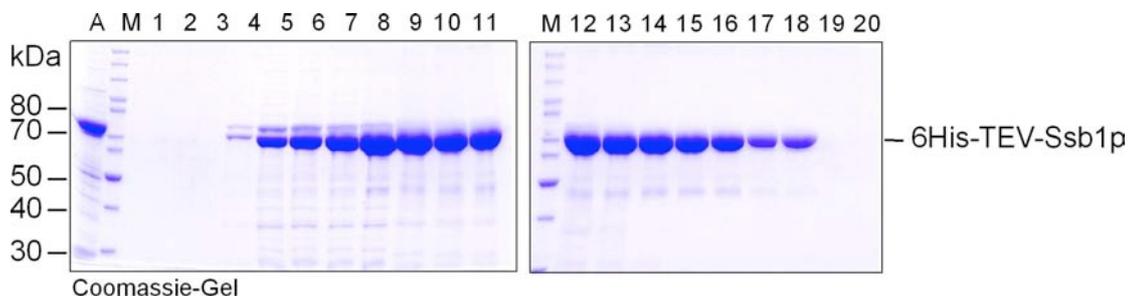
### 3.2.1.2. Reinigung von Ssb1p aus *E. coli*

*SSB1* wurde rekombinant in *E. coli* als Fusion mit der Sequenz für 6 Histidine und einer integrierten Erkennungssequenz für TEV-Protease exprimiert. Ähnlich wie TRiC und GimC wurde auch 6His-TEV-Ssb1p zunächst über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie angereichert (Abb. 3.32; s. 2.4.3.8.1.). 6His-TEV-Ssb1p eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM.



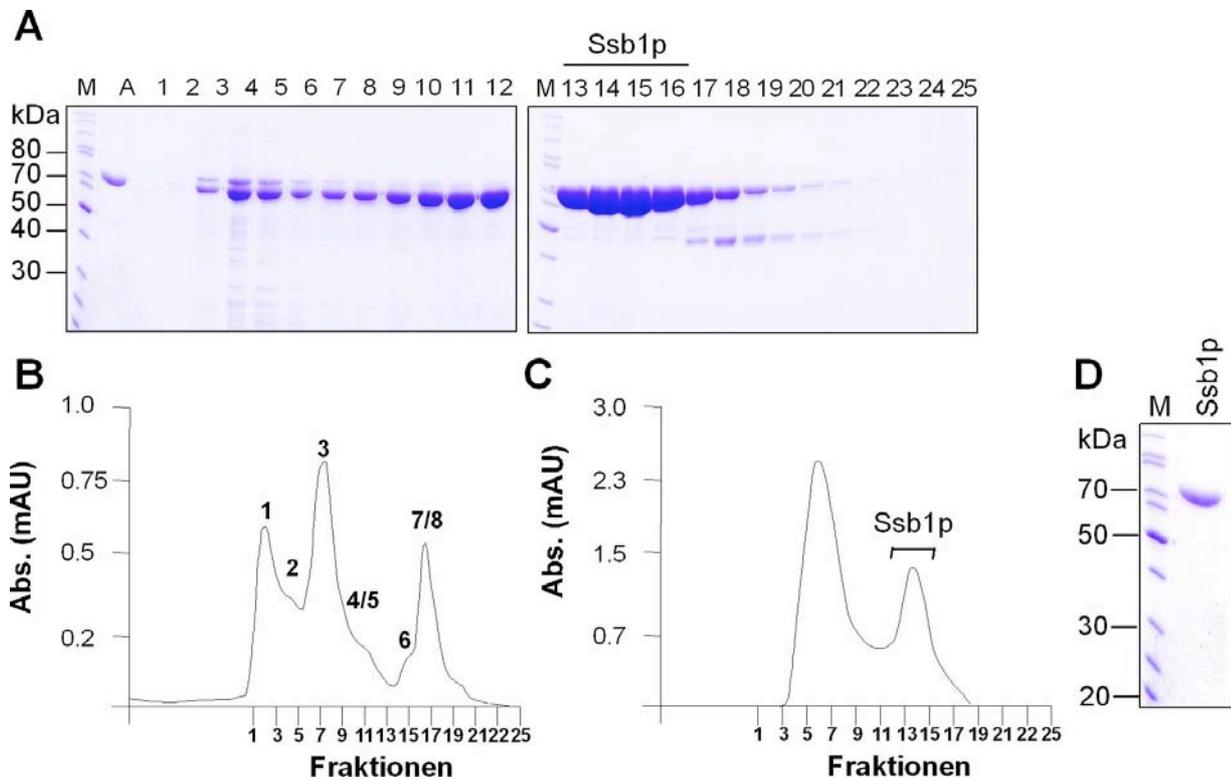
**Abb. 3.32: Anreicherung von 6His-TEV-Ssb1p mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie.** 6His-TEV-SSB1 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert, und die lösliche Fraktion wurde einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie (Gravitationsfluss) unterzogen. (M) Marker, (T) Total-Extrakt, 10  $\mu\text{g}$  Protein, (S) Sediment und (Ü) Überstand, 10  $\mu\text{g}$  Protein, nach Zentrifugation, (D) Durchlauf, (20 mM, 50 mM, 100 mM) 1/5000 Volumenanteil von Waschschritten mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen, (1-6) 1/100 Volumenanteil von 250 mM Imidazol-Elutionen.

Der 6His-TEV-*tag* wurde mittels TEV-Protease abgespalten und der *tag* sowie die Protease über eine zweite  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie (s. 2.4.3.8.3.) von Ssb1p separiert (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33: Ssb1p wird mittels einer zweiten  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie von Verunreinigungen separiert.** Nach Abspaltung des 6His-TEV-tags mittels TEV-6His-Protease wurde Ssb1p-enthaltende Probe auf eine zweite  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätssäule geladen und mit einem Säulenvolumen 20 mM Imidazol-Puffer gespült. (A) Ausgangsmaterial, 10  $\mu\text{g}$  Protein, (M) Marker, (1-20) jeweils 1/300 Volumenanteil gesammelter Fraktionen. Im Gegensatz zur TEV-6His-Protease und zum abgespaltenen 6His-TEV-*tag* bindet Ssb1p nicht an die Säule. Fraktionen mit höchstem Reinheitsgrad (9-18) wurden für weitere Reinigungsschritte von Ssb1p eingesetzt.

Abschließend erfolgte ein Gelfiltrationsschritt mit einer Superdex 200-Säule (Abb. 3.34; s. 2.4.3.8.4.). Die Fraktionen wurden einer SDS-Gelanalyse unterzogen (Abb. 3.34 A). Diejenigen Fraktionen wurden vereint, die im Vergleich mit Eichstandardproteinen (Abb. 3.34 B) einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa entsprachen und ein Maximum im Elutionsprofil bei 280 nm aufwiesen (Abb. 3.34 C). Ein weiteres Maximum, das sich im Elutionsprofil erkennen lässt (Fraktionen 2-12), ist vermutlich auf Nukleinsäuren zurückzuführen, weil in diesem Bereich nur geringe Proteinmengen im Coomassie-Gel nachgewiesen wurden. Geringe Mengen an Ssb1p, die in diesen Fraktionen höheren Molekulargewichts eluieren, lassen sich vermutlich durch Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren erklären (Fraktionen 3-9: hohe Absorption bei 280 nm und geringe Proteinmenge). Mit dieser Methode lassen sich 6 mg Ssb1p aus 4 Litern einer stationären *E. coli*-Kultur isolieren.



**Abb. 3.34: Größenfraktionierung von Ssb1p zur Separierung von Verunreinigungen mittels Gelfiltrationschromatographie.** Im Anschluss an die zweite Affinitätschromatographie wurde Ssb1p-enthaltende Probe einer Gelfiltrationschromatographie (Superdex200) unterzogen. **(A)** Coomassie-Gel: (M) Marker, (A) Ausgangsmaterial, 10 µg Protein, (1-25) 1/100 Volumenanteil der Fraktionen 1-25. **(B)** Chromatogramm der Eichproteine (bestehend aus (1) Dextran, 2000 kDa; (2) Thyroglobulin, 669 kDa; (3) Ferritin, 440 kDa; (4) Katalase, 232 kDa; (5) Aldolase, 158 kDa; (6) Ovalbumin, 43 kDa; (7) Chymotrypsinogen, 25 kDa; (8) Ribonuklease A, 13 kDa). **(C)** Chromatogramm der Ssb1p-enthaltenden Probe. **(D)** Coomassie-Gel von 2 µg gereinigtem Ssb1p (Fraktion 13-16).

### 3.2.2. Klassische TRiC Substrate: Aktin und Tubuline

Viele eukaryotische Proteine, die in prokaryotischen *in vitro* Transkriptions-/Translationssystemen synthetisiert wurden, erlangen nicht ihren Nativzustand aufgrund fehlender eukaryotischer Chaperone. Aus diesem Grunde eignen sich solche Systeme für Rekonstitutionsexperimente mit gereinigten, eukaryotischen Faktoren zur *in vitro* Faltungsanalyse eukaryotischer Proteine. Die Löslichkeit eines Proteins ist dabei ein Indiz für seinen Faltungszustand, da unvollständige oder missgefaltete Proteine zur Aggregation neigen, und dies häufig mit der Präzipitation von Proteinen einhergeht. Des Weiteren kann der Faltungszustand des Proteins zusätzlich in Bindungsexperimenten bestimmt werden, bei denen das synthetisierte Protein mit einem immobilisierten Partnerprotein eine Interaktion eingeht. Solch ein Experiment setzt zum einen voraus, dass nur korrekt gefaltetes Protein mit seinem Partner interagiert, und zum anderen, dass korrekte Faltung, d.h. der native Zustand, nur in Gegenwart von eukaryotischen Chaperonen erreicht wird.

#### 3.2.2.1. Löslichkeit von Aktin und Tubulinen in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren

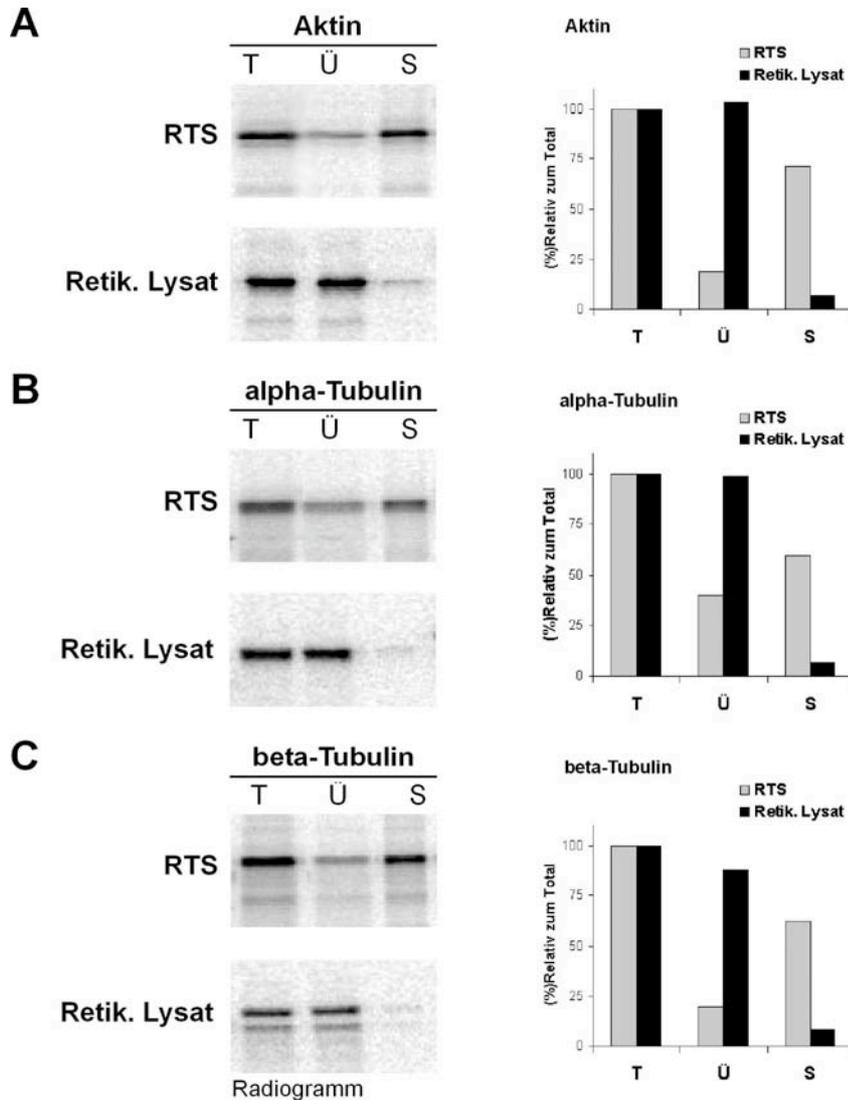
Um solch ein *in vitro* Translationsexperiment entwickeln zu können, wurde zunächst das Löslichkeitsverhalten der Hauptsubstrate von TRiC, Aktin, alpha- und beta-Tubulin, in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren bestimmt. Hierzu wurden die Zytoskelettproteine mittels eines prokaryotischen *in vitro* Translationssystems (RTS, Roche) und eines eukaryotischen *in vitro* Translationssystems (Retikulozyten Lysat) als Positiv-Kontrolle in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin synthetisiert. Bedingt durch die Klonierung weisen *in vitro* translatiertes alpha- und beta-Tubulin zusätzliche Extensionen (jeweils ca. 20 Aminosäuren der Vektorsequenz) am N-Terminus auf.

**Tabelle 3.3: Plasmide für *in vitro* Translationsexperimente mit Aktin und Tubulinen**

Plasmid	Beschreibung	Zytoskelettprotein	Quelle
pBB7	pRSETa- <i>ACT1</i>	6His-Act1p	Bettina Bölder
pGS25	pRSET6a- <i>TUB1</i>	alpha-Tubulin	Silke Grallath
pGS26	pET17b- <i>TUB2</i>	beta-Tubulin	„

Zur Analyse wurden beiden Ansätzen Proben entnommen und in lösliche und unlösliche Fraktion getrennt (s. 2.4.10.). Aliquots dieser Fraktionen sowie der Gesamtmenge synthetisierten Proteins wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anhand eines Radiogramms miteinander verglichen (Abb. 3.35; s. 2.4.18.). Die Signale des Radiogramms zeigen, dass sich mit beiden Translationssystemen alle drei Zytoskelettproteine *in vitro* synthetisieren lassen. Unter Verwendung des eukaryotischen Translationssystems (s. 2.4.10.3.) waren alle synthetisierten Proteine fast vollständig löslich, nur ein minimaler Anteil lag in der unlöslichen Fraktion vor. Die N-terminalen Extensionen von alpha- und beta-Tubulinen (siehe oben) führen zu keiner Aggregation der Proteine unter diesen

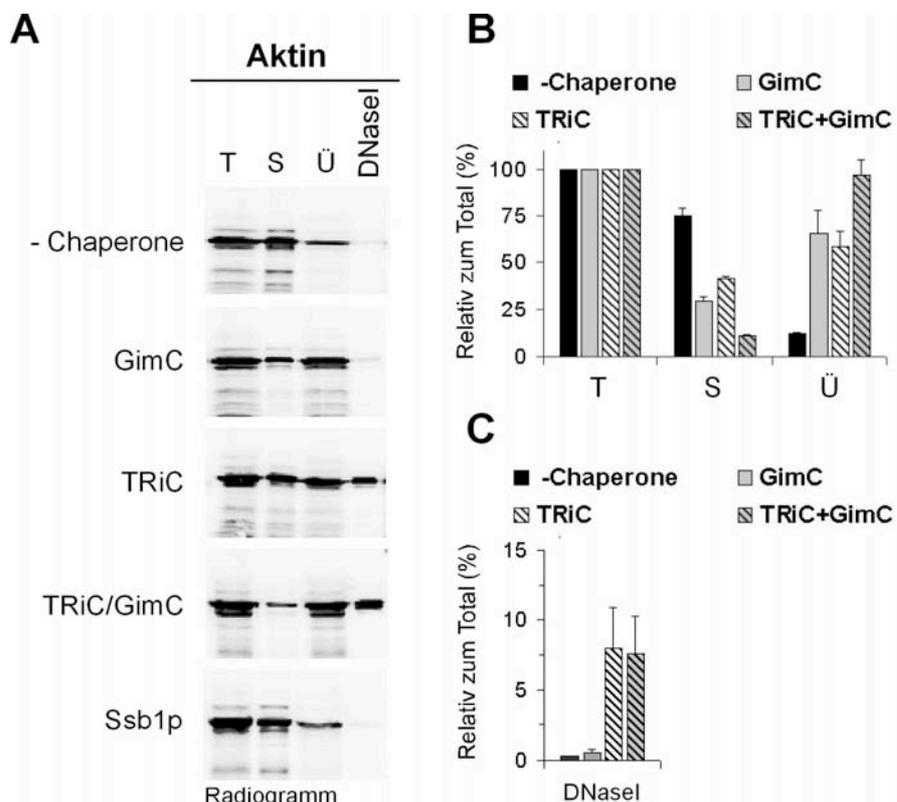
Versuchsbedingungen und wirken sich daher vermutlich nicht negativ auf die Faltung aus. Dagegen resultierte die Verwendung des prokaryotischen Systems (s. 2.4.10.1.) hauptsächlich in der Synthese nicht-löslicher Proteine. Die Tatsache, dass nur in Gegenwart eukaryotischer Faktoren die TRiC Substrate Aktin, alpha- und beta-Tubulin löslich sind, ist eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgenden Experimente.



**Abb. 3.35: Die Löslichkeit von *in vitro* synthetisierten Aktin und Tubulinen ist von eukaryotischen Faktoren abhängig.** Für die Entwicklung von *in vitro* Faltungsstudien war es notwendig, die Löslichkeit von Aktin und Tubulinen in Abhängigkeit von eukaryotischen Faktoren zu zeigen. Hierzu wurden (A) Aktin, (B) alpha- und (C) beta-Tubulin mittels des prokaryotischen (RTS) sowie des eukaryotischen (Retikulozyten Lysat) Translationssystems in Anwesenheit von radioaktiv-markiertem Methionin *in vitro* synthetisiert. Äquivalente Mengen einzelner Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Zur Quantifizierung wurden Signalstärken der Banden, die vollständig translatiertem Protein entsprechen, densitometrisch ermittelt. Angaben in % beziehen sich auf den Total-Ansatz (A).

### 3.2.2.2. Faltung von Aktin in Abhängigkeit von TRiC und GimC im prokaryotischen Translationssystem

Um den Effekt von eukaryotischen Chaperonen auf die Faltung neu synthetisierten Aktins analysieren zu können, wurde Aktin mittels des prokaryotischen Systems in Ab- oder Anwesenheit von gereinigtem GimC, TRiC oder einer Kombination beider synthetisiert und bezüglich der Löslichkeit analysiert (s. 2.4.10.1.). Zusätzlich wurde ein Aliquot der löslichen Fraktion im Anschluss an die Translation mit immobilisierter DNaseI inkubiert (s. 2.4.11.2.1.). Da nur korrekt gefaltete Aktinmonomere spezifisch an DNaseI binden (Lazarides und Lindberg, 1974), kann mit solch einem Bindungsexperiment eine Aussage über den Faltungszustand von Aktin getroffen werden. Abb. 3.36 zeigt das Radiogramm einzelner Reaktionsansätze nach SDS-PAGE sowie die Quantifizierung der Radiogramm-Signale mehrerer unabhängiger Experimente.



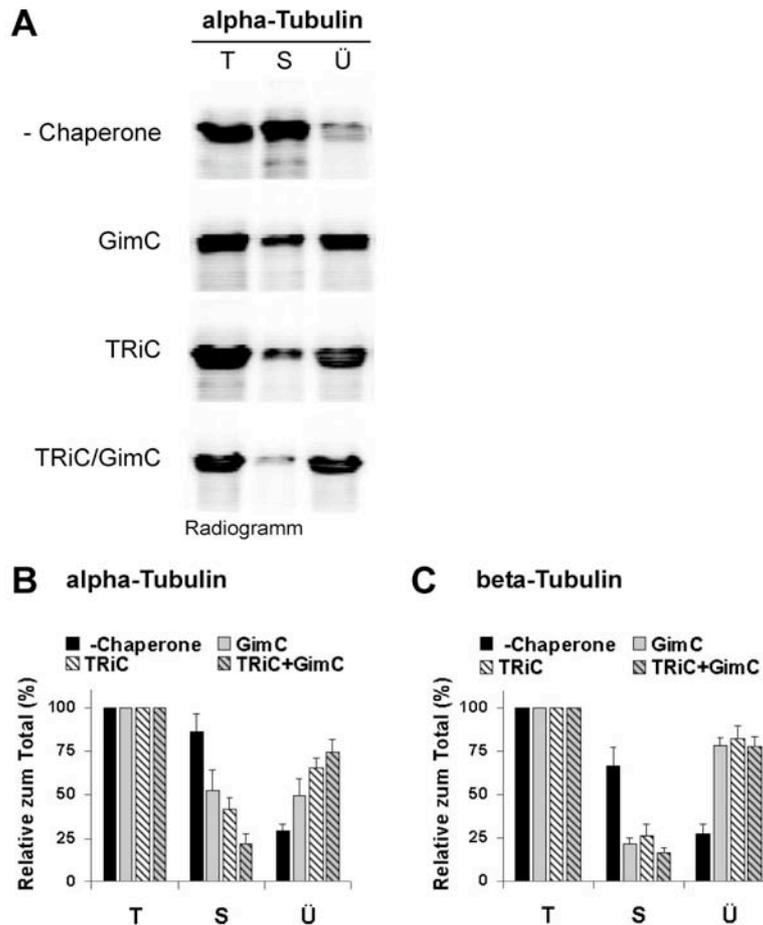
**Abb. 3.36: Das Löslichkeitsverhalten von *in vitro* synthetisiertem Aktin und dessen Interaktion mit immobilisierter DNaseI ist von GimC und TRiC abhängig.** Aktin wurde in Ab- und Anwesenheit gereinigter Chaperone (GimC, TRiC, TRiC/GimC) mittels eines prokaryotischen *in vitro* Translationssystems (RTS) synthetisiert und radioaktiv markiert. **(A)** Radiogramm: (T) 1/10 Volumenanteil Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Ein Aliquot der löslichen Fraktion wurde mit immobilisierter DNaseI inkubiert. (DNaseI) 1/3 Volumenanteil nach dem Bindungsexperiment. **(B)** Quantifizierung der Löslichkeit des synthetisierten Aktins. **(C)** Quantifizierung DNaseI-gebundenen Aktins. Zur Quantifizierung wurden Signalstärken der Banden, die vollständig synthetisiertem Aktin entsprechen, densitometrisch ermittelt und Mittelwerte 3 unabhängiger Experimente bestimmt (Fehlerbalken: Standardfehler). Die Angaben in % beziehen sich auf den Total-Ansatz (T). Aktin benötigt zum Erlangen seiner nativen Struktur TRiC. GimC trägt entscheidend zur Löslichkeit neu-synthetisierter, nicht nativer Aktinmoleküle bei.

Die Analyse des Kontrollansatzes von translatiertem Aktin in Abwesenheit eukaryotischer Chaperone bestätigte das Ergebnis des vorangegangenen Testexperiments in Abb. 3.35. Der größte Anteil an synthetisiertem Aktin lag in unlöslicher Form vor, während nur etwa 13% (bezogen auf den Gesamtanteil translatierten Aktins) in der löslichen Fraktion detektiert wurde. Inkubation dieses geringen Anteils löslichen Aktins mit DNaseI zeigte keine nachweisbare Bindung. Dagegen bewirkte die Zugabe von gereinigtem GimC (10  $\mu\text{M}$ ) zum *in vitro* Reaktionsansatz, dass der Hauptanteil translatierten Aktins (66%) in der löslichen Fraktion zu finden war. Trotz des hohen löslichen Anteils fand keine spezifische Bindung an DNaseI statt. In Übereinstimmung mit *in vivo* Daten (Sieggers *et al.*, 2003) hält GimC demzufolge das translatierte Protein in Lösung, vermittelt aber nicht dessen Faltung. Zugabe von gereinigtem TRiC (0,875  $\mu\text{M}$ ) bewirkte einen ähnlichen Effekt auf die Löslichkeit von Aktin (59%). Zusätzlich war aber auch eine spezifische Bindung von Aktin an DNaseI zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass Aktin im bakteriellen System in Gegenwart des eukaryotischen Chaperonins seine native Konformation erlangt hatte. Des Weiteren wurde die Löslichkeit synthetisierten Aktins gesteigert (97%), wenn beide Chaperone im Translationsansatz präsent waren. In Doppel-Deletionsmutanten von *SSB1/2* ließ sich *in vivo* kein Unterschied zu Wildtyp-Zellen bezüglich der Bindung von Aktin an DNaseI nachweisen (Sieggers *et al.*, 2003), was vermuten lässt, dass Ssb1/2p unter diesen Umständen für die Faltung benötigt wird. Wurde Aktin in Gegenwart von Ssb1p *in vitro* synthetisiert, glich das Ergebnis dem Kontrollansatz ohne eukaryotische Chaperone. Demnach haben GimC und TRiC einen spezifischen Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten von *in vitro* synthetisiertem Aktin.

Die Gesamtmenge an *in vitro* synthetisiertem Aktin wurde im Anschluss an die Translationreaktion nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung densitometrisch bestimmt und betrug ca. 14 pmol bzw. 0,23  $\mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt). Demzufolge waren sowohl GimC als auch TRiC während der gesamten Reaktionsdauer im Überschuss (10 bzw. 0,875  $\mu\text{M}$ ) vorhanden.

### **3.2.2.3 Löslichkeitsverhalten von alpha- und beta-Tubulinen in Abhängigkeit von TRiC und GimC**

Die Löslichkeit von alpha- und beta-Tubulin in Gegenwart eukaryotischer Chaperone wurde analog zu Aktin mittels des prokaryotischen *in vitro* Translationssystems (s. 2.4.10.1.) untersucht, in dem gereinigtes GimC bzw. TRiC im Überschuss gegenüber dem Substrat vorlagen. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden im Radiogramm - hier exemplarisch für alpha-Tubulin – analysiert; die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente wurden zur Quantifizierung herangezogen (Abb. 3.37).

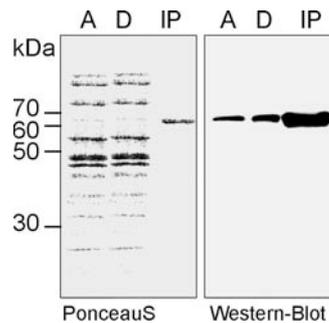


**Abb. 3.37: Die Löslichkeit *in vitro* synthetisierter Tubuline ist von GimC und TRiC abhängig.** Alpha- und beta-Tubulin wurden in Ab- und Anwesenheit gereinigter Chaperone (GimC, TRiC und TRiC/GimC) mittels eines prokaryotischen Translationssystems in Anwesenheit radioaktiv-markierten Methionins *in vitro* synthetisiert. **(A)** Repräsentatives Ergebnis für alpha-Tubulin (Radiogramm). (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Quantifizierung der Löslichkeitsverhältnisse von **(B)** alpha-Tubulin und **(C)** beta-Tubulin. Zur Quantifizierung der Radiogramme wurden Signalstärken der Banden, die vollständig synthetisierten Tubulinen entsprechen, densitometrisch ermittelt und Mittelwerte unabhängiger Experimente (alpha-Tubulin: 5 Experimente, beta-Tubulin: 4 Experimente) bestimmt. Angaben in % zum Gesamt-Ansatz (T); Fehlerbalken: Standardfehler. GimC und TRiC haben einen positiven Effekt auf die Löslichkeit von Tubulinen.

Die Ergebnisse der Tubulin-Experimente veranschaulichen den schon bei Aktin beobachteten positiven Effekt eukaryotischer Chaperone auf die Löslichkeit von Substratproteinen. Im Fall von alpha-Tubulin konnte im Vergleich zum Kontrollansatz (29%) Zugabe von GimC oder TRiC den löslichen Anteil des synthetisierten Proteins erhöhen (50% bzw. 65%). Durch Zugabe einer Kombination beider Chaperone steigerte sich der Anteil löslichen alpha-Tubulins auf 75%. Im Gegensatz dazu zeigte sich für beta-Tubulin in allen Reaktionsansätzen mit gereinigtem GimC oder TRiC bzw. der Kombination beider ein einheitlich positiver Effekt auf die Löslichkeit (ca. 80% gegenüber der Kontrolle 27%).

Unter Verwendung des prokaryotischen *in vitro* Translationssystems wurde sowohl für Aktin als auch für Tubuline eine Abhängigkeit von gereinigten eukaryotischen

Chaperonen beobachtet, die sich in einer gesteigerten Löslichkeit und speziell für Aktin auch in seinen Bindungseigenschaften an DNasel widerspiegelte. Unterschiede im Löslichkeitsverhalten und die Tatsache, dass ein gewisser Prozentsatz auch in Abwesenheit eukaryotischer Faktoren löslich ist, könnte u.a. auf Gegenwart des bakteriellen Chaperonins im prokaryotischen Translationssystem zurückgeführt werden. Abb. 3.38 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation von GroEL S30-Lysat des RTS-Translation-Kits (s. 2.4.12.).



**Abb. 3.38: Partielle Depletion von GroEL aus dem prokaryotischen *in vitro* Translationssystem (RTS).** Um unspezifische Interaktionen mit *in vitro* synthetisierten Proteinen zu reduzieren, wurde GroEL aus dem RTS-Lysat mit anti-GroEL-IgG's immunpräzipitiert (IP). Für den anti-GroEL Western-Blot wurden (A) 1/2400 Volumenanteil vom Ausgangsmaterial, (D) 1/2400 Volumenanteil Durchlauf, (IP) 1/3 Volumenanteil der Immunpräzipitation analysiert.

Neben den anti-GroEL-spezifischen Signalen im Western-Blot ließ sich immunpräzipitiertes GroEL auch bereits auf der PonceauS-gefärbten Transfermembran nachweisen. Dennoch konnte GroEL aus dem Lysat nicht vollständig depletiert werden, wie aus dem Vergleich von Ausgangsmaterial und Durchlauf ersichtlich wird. Dies deutet auf einen hohen Gehalt des prokaryotischen Chaperonins in dem RTS-Translation-Kits hin und unterstützt demnach die These, dass GroEL unspezifisch an nicht-native Proteine bindet und diese damit partiell in Lösung hält.

### 3.2.3. Neue Substratklasse von TRiC: Proteine mit *WD-repeat* Motiv

Anhand von *in vitro* Rekonstitutionsexperimenten mit gereinigten Chaperonen (3.2.2.) ließ sich die essentielle Funktion von TRiC (und GimC) bei der Faltung von Aktin direkt darstellen. Solche Faltungsstudien eignen sich auch zur näheren Charakterisierung neuer Substrate bzw. zur Validierung potentieller Substrate von TRiC. Analog zu den Aktin-DNasel-Faltungsstudien wurden daher funktionelle Tests für Mitglieder aus der Strukturklasse der *WD-repeat* Proteine entwickelt, die *in vivo* bereits als TRiC-Substrate identifiziert werden konnten (Camasses *et al.*, 2003; Siegers *et al.*, 2003).

Das *WD-repeat* Protein Cdc20p ist ein Substrat-Rekrutierungsfaktor des hochmolekularen APC/C- Komplexes (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), der als Ubiquitin-Ligase den selektiven Proteinabbau bestimmter Substrate steuert. Im Verlauf des

Zellzyklus werden durch den APC/C-Komplex die Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau unterschiedlicher Substrate, z.B. mitotischer Zykline, gesteuert. Cdc20p erkennt in Substratproteinen ein aus 9 Aminosäuren bestehendes Motiv, die so genannte D-Box (*destruction box*, RAALSDITN-Motiv), und vermittelt deren Rekrutierung zum APC/C (Glotzer *et al.*, 1991; Zachariae *et al.*, 1999). Bislang konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob Cdc20p über seinen N-Terminus oder die WD40-Domänen die D-Box Proteine zu binden vermag (Pfleger *et al.*, 2001; Hilioti *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2001).

Das *WD-repeat* Protein Cdc55p ist eine regulatorische B-Untereinheit der Protein-Serin/Threonin Phosphatase 2A, die ein breites Substratspektrum aufweist. Zusammen mit der katalytischen Untereinheit (Pph21p oder Pph22p) und der als Plattform fungierenden A-Untereinheit (Tpd3p) bildet Cdc55p einen hetero-trimeren Komplex (Jiang *et al.*, 1999). Von Cdc55p wird angenommen, dass es im Wesentlichen die Substratspezifität der Phosphatase bestimmt (alternativ existieren hetero-trimere Komplexe mit der regulatorischen Untereinheit Rts1p; Zabrocki *et al.*, 2002).

Bei dem *WD-repeat* Protein Pex7p handelt es sich um einen Importrezeptor für peroxisomale Proteine mit der spezifischen PTS2-Erkennungssequenz (*peroxisomal targeting sequence 2*, MSQRLQSIKDHLVLSA), die von Pex7p erkannt wird. Pex7p hat keine Membrandomäne und bindet im Zytoplasma als mobiler Rezeptor Substratproteine, die an Peroxisomen weitergeleitet werden. Es wurde gezeigt, dass für die Interaktion mit dem PTS2-Motiv die ersten 56 Aminosäuren vom N-Terminus von Pex7p essentiell sind (Zhang *et al.*, 1996).

Für Faltungsstudien wurden die Leserahmen von *CDC20*, *CDC55* und *PEX7* in bakterielle Expressionsvektoren mit T7 Promotor kloniert, welche die effiziente Transkription mittels T7-Polymerase in *in vitro* Transkriptions-/Translationssystemen erlauben (Tab. 3.4). Alle drei Leserahmen wurden als Fusion mit einem 3HA-Epitop exprimiert, um zusätzliche Analysen (z.B. anti-HA Western-Blot) zu ermöglichen. Für die Klonierung wurde genomische DNA von Hefestämmen verwendet, die chromosomal mit der 3HA-Epitop kodierenden Sequenz am 3'-Ende des jeweiligen Gens versehen worden waren (s. 2.2.2.5.).

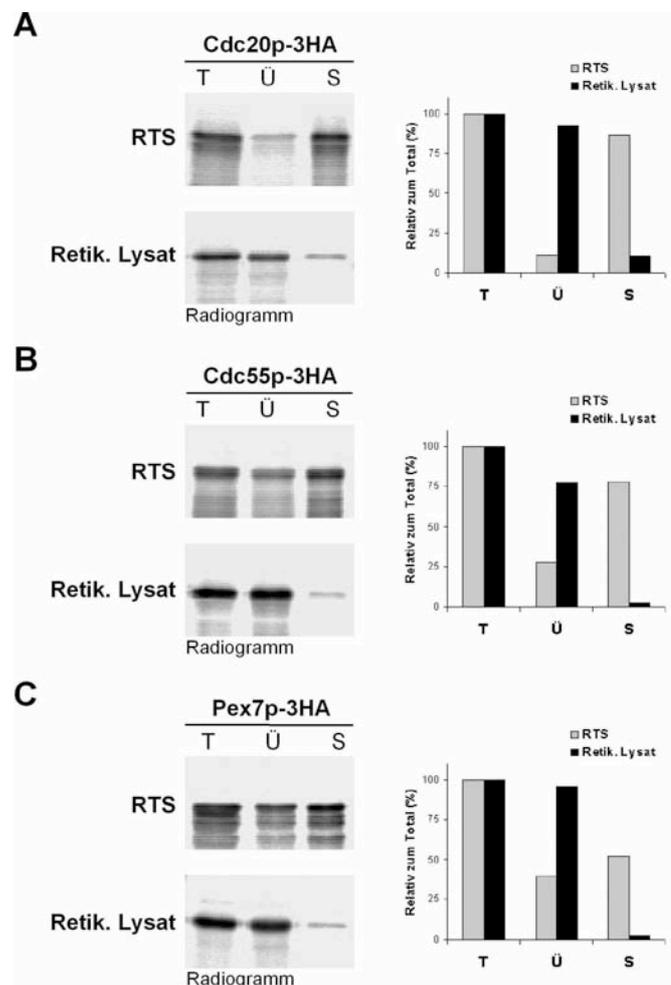
**Tabelle 3.4: Plasmide für *in vitro* Translationsexperimente mit *WD-repeat* Proteinen**

Plasmid	Beschreibung	Proteine mit <i>WD-repeat</i>	Quelle
pSi447	pRSET6a- <i>CDC20</i> -3HA	Cdc20p-3HA	Katja Siegers
pUB63	pET17b- <i>CDC55</i> -3HA	Cdc55p-3HA	diese Arbeit
pUB59	pRSET6a- <i>PEX7</i> -3HA	Pex7p-3HA	„

### 3.2.3.1. Löslichkeit von Cdc20p, Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren

Für die Entwicklung geeigneter *in vitro* Studien zur Untersuchung der Chaperon-vermittelten Faltung von Cdc20p, Cdc55p und Pex7p war es zunächst erforderlich - wie auch schon für Aktin und Tubuline - , die Löslichkeit der synthetisierten Proteine in Abhängigkeit

von eukaryotischen Faktoren zu zeigen. Hierzu wurden Cdc20p, Cdc55p und Pex7p mittels des prokaryotischen (RTS) und eukaryotischen (Retikulozyten Lysat) *in vitro* Translationssysteme synthetisiert. Zur Bestimmung der Löslichkeit wurden Aliquots von der Gesamtmenge synthetisierten Proteins sowie löslicher und unlöslicher Fraktion analysiert (s. 2.4.10.). Abb. 3.39 zeigt, dass im Gegensatz zum bakteriellen System (RTS; s. 2.4.10.1.) in Anwesenheit eukaryotischer Faktoren (Retik. Lysat; s. 2.4.10.3.) alle *in vitro* translatierten Proteine nahezu ausschließlich löslich waren. Mit dem Befund, dass die Löslichkeit dieser *WD-repeat* Proteine von eukaryotischen Faktoren abhängig ist, war bereits ein Kriterium zur Entwicklung geeigneter Faltungsexperimente erfüllt.



**Abb. 3.39: Die Löslichkeit *in vitro* synthetisierter *WD-repeat* Proteine ist von eukaryotischen Faktoren abhängig.** Für die Entwicklung von *in vitro* Faltungsstudien war es notwendig, die Löslichkeit von *WD-repeat* Proteinen in Abhängigkeit von eukaryotischen Faktoren zu zeigen. **(A)** Cdc20p-3HA, **(B)** Cdc55p-3HA und **(C)** Pex7p-3HA wurden mittels des prokaryotischen (RTS) und eukaryotischen (Retikulozyten Lysat) Translationssysteme *in vitro* synthetisiert und radioaktiv markiert. Äquivalente Mengen einzelner Fraktionen der Reaktionsansätze wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Zur Quantifizierung des Radiogramms wurden Signalstärken der Banden, die vollständig translatiertem Protein entsprechen, densitometrisch ermittelt. Angaben in % beziehen sich auf den Total-Ansatz (T).

### 3.2.3.2. Bindungspartner für TRiC Substrate mit *WD-repeats*

Im Folgenden wurde die Rolle eukaryotischer Chaperone bei der Faltung von *WD-repeat* Proteinen *in vitro* analysiert. Hierzu wurde in Anlehnung an Aktin-DNaseI Bindungsexperimente ein ähnlicher experimenteller Ansatz verfolgt, mit dessen Hilfe der Faltungszustand dieser drei TRiC Substrate überprüft werden konnte. Wie bei der Interaktion zwischen Aktin und DNaseI sollten *in vitro* translatierte *WD-repeat* Proteine nur nach Erreichen ihrer nativen Form in der Lage sein, eine Bindung mit einem potentiellen Partnerprotein eingehen zu können. Als Partnerprotein wurde für Cdc20p die Proteinkinase Hsl1p, ein Substrat des APC/C Komplexes, gewählt. Die spezifische Interaktion zwischen Cdc20p und der D-Box von Hsl1p konnte bereits anhand von *yeast two-hybrid* Studien, Ko-Immünpräzipitationen und *in vitro* Bindestudien mit Cdc20p, das heterolog in Baculovirus-infizierten Insektenzellen synthetisiert wurde, belegt werden (Burton *et al.*, 2000; Burton *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2005). Als Interaktionspartner für Cdc55p wurde Tpd3p gewählt. Die physikalische Interaktion beider regulatorischer Untereinheiten des Protein-Phosphatase 2A Komplexes war bereits mittels Ko-Immünpräzipitationen gezeigt worden (Roopchand *et al.*, 2001). Bislang existieren jedoch noch keine Daten darüber, welche Abschnitte beider Polypeptide miteinander interagieren. Für Pex7p wurde Pot1p, eine peroxisomale Thiolase, die mit Pex7p über ihre N-terminale *peroxisomal targeting sequence 2* (PTS2) interagiert, gewählt (Rehling *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996).

Gene bzw. Genabschnitte, die für die drei gewählten Interaktionspartner kodieren, wurden in bakterielle Expressionsvektoren mit T7-Promotor und His-*tag* kloniert (Tab. 3.5). *TPD3* und *POT1* wurden in voller Länge kloniert. Für *HSL1* umfasste der klonierte Bereich 519 Bp des offenen Leserasters (Bp 2097-2616). Dieser zentrale Bereich umfasst die für die Interaktion mit Cdc20p essentielle D-Box (Burton *et al.*, 2001). Die N-terminale Position des His-*tags* erwies sich für Hsl1p und Tpd3p nicht als kritisch bezüglich der Interaktion mit ihren Interaktionspartnern (s. Abb. 3.41). Für Pot1p wurde für die His-*tag* Fusion jedoch der C-Terminus gewählt, um eine mögliche Beeinträchtigung der N-terminalen PTS2-vermittelten Interaktion mit Pex7p auszuschließen.

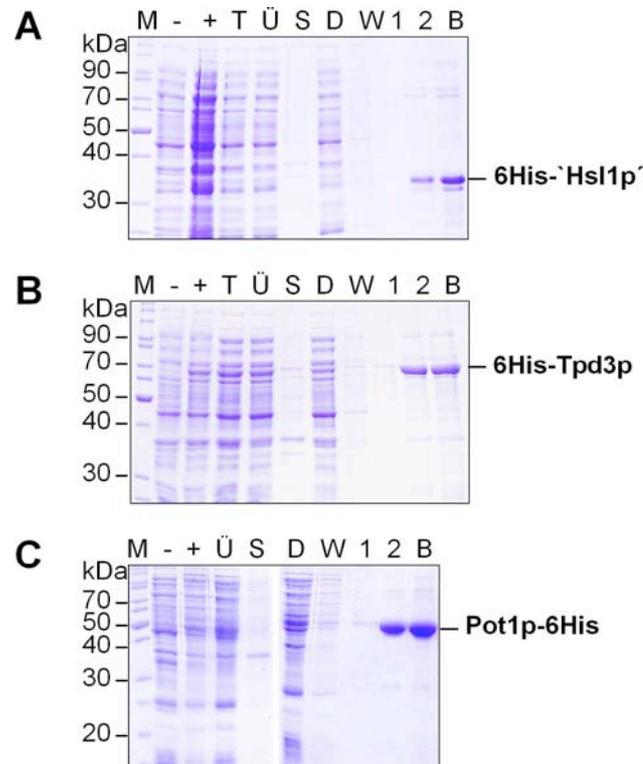
**Tabelle 3.5: Plasmide für die Produktion spezifischer Interaktorproteine für *WD-repeat* Proteine**

Plasmid	Beschreibung	Interaktionsprotein	Partnerprotein
pUB64	pRSETa- <i>HSL1</i> (2097-2616 Bp)	6His- <i>Hsl1p</i> (699-872 AS) *	Cdc20p
pUB65	pRSETa- <i>TPD3</i>	6His-Tpd3p	Cdc55p
pUB56	pET21a- <i>POT1</i>	Pot1p-6His	Pex7p

(\*): Aminosäuren 828-836 beinhalten die D-Box.

Der His-*tag* diente zur Reinigung dieser rekombinanten Proteine aus *E. coli* Lysat (s. 2.4.3.6.; Abb. 3.40). Darüber hinaus wurde er zur Immobilisierung der gereinigten Interaktionspartner an die Ni<sup>2+</sup>-Matrix für anschließenden Bindungsexperimente mit den korres-

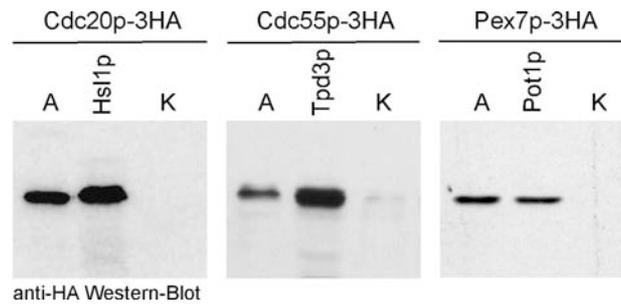
pondierenden *WD-repeat* Proteinen benötigt (s. 2.4.11.2.2.). Aus einer 20 ml Kultur wurden ca. 415 µg Pot1p-6His, 30 µg 6His-Tpd3p bzw. 210 µg 6His-`Hsl1p´ gereinigt.



**Abb. 3.40: Reinigung von Interaktionspartnern der *WD-repeat* Proteinen mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie.** Für die Entwicklung von *in vitro* Faltungsstudien für TRiC-Substrate mit *WD-repeats*, wurden Interaktionspartner aus *E. coli* gereinigt. Coomassie-Gel Analyse: **(A)** 6His-`Hsl1p´, **(B)** 6His-Tpd3p und **(C)** Pot1p-6His. (M) Marker, (-) vor und (+) nach Induktion, (T) 10 µg Total-Extrakt, (Ü) 10 µg Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation, (D) Durchlauf nach Inkubation mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose, (W) 20 mM Imidazol Waschschrift, (1-2) 1. und 2. Elutionsschritt mit 250 mM Imidazol, (B) an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose immobilisierte Proteine vor Imidazol-Elution. **(A)** In Spur (+) wurde im Vergleich zu Spur (-) die 10-fache Menge Protein-Extrakt geladen.

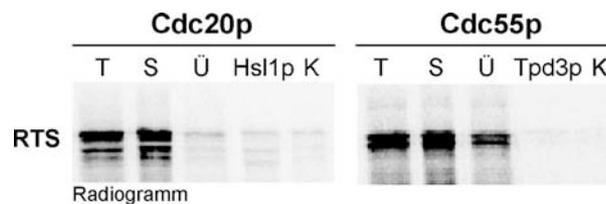
### 3.2.3.3. Faltung von *WD-repeat* Proteinen in Abhängigkeit eukaryotischer Faktoren

Die gereinigten Interaktionspartner (6His-`Hsl1p´, 6His-Tpd3p bzw. Pot1p-6His) wurden zunächst bezüglich ihrer Fähigkeit überprüft, mit *WD-repeat* Proteinen aus Hefelysat zu interagieren. Hierzu wurde die lösliche Fraktion von Lysat aus Hefestämmen, die *CDC20*, *CDC55* bzw. *PEX7* als Fusion mit einem 3 HA-Epitop chromosomal exprimieren, mit den korrespondierenden, immobilisierten Interaktionspartnern bzw. Kontrollproteinen inkubiert (s. 2.4.11.3.). Anhand von anti-HA Western-Blots ließ sich zeigen, dass alle drei *WD-repeat* Proteine aus Hefelysat spezifisch an ihre gereinigten Interaktionspartner gebunden hatten (Abb. 3.41).



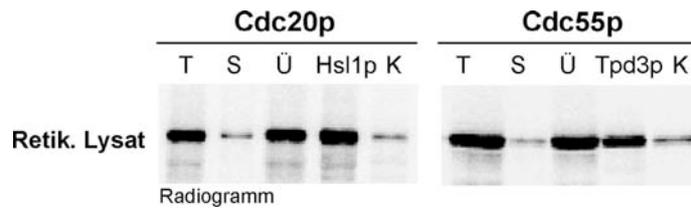
**Abb. 3.41: Bindung endogener *WD-repeat* Proteine aus *S. cerevisiae* an ihre Interaktionspartner.** Die spezifische Bindung von Proteinen mit *WD-repeat* Motiven aus Hefe an ihre jeweiligen rekombinanten Interaktionspartner wurde überprüft. Lysat aus Hefestämmen, die jeweils *CDC20-3HA*, *CDC55-3HA* oder *PEX7-3HA* chromosomal exprimieren, wurde mit den jeweiligen Interaktionspartnern inkubiert (6His-`Hsl1p`, 6His-Tpd3p oder Pot1p-6His). (K) Kontrollproteine (für Cdc20p-3HA K= *E. coli* Lysat; für Cdc55p-3HA K= Pot1p-6His; für Pex7p-3HA K= 6His-Tpd3p). Die Bindung wurde mittels eines anti-HA Western-Blots analysiert. (A) 1/150 Volumenanteil des Ausgangsmaterials, (6His-`Hsl1p`, 6His-Tpd3p, Pot1p-6His oder K) 1/3 Volumenanteil des jeweiligen Bindungsexperimentes.

Im Folgenden wurde untersucht, ob diese Bindung von eukaryotischen Faktoren abhängig ist. Hierzu wurden Cdc20p-3HA und Cdc55p-3HA in Ab- (RTS) bzw. Anwesenheit eukaryotischer Faktoren (Retikulozyten Lysat) *in vitro* synthetisiert und deren Löslichkeit bzw. deren Bindung an ihre gereinigten Interaktionspartner untersucht (s. 2.4.11.2.2.). Cdc20p-3HA, das mittels des bakteriellen Systems (RTS) synthetisiert wurde, lag fast ausschließlich in unlöslicher Form vor (Abb. 3.42) und zeigte keine spezifische Bindung an seinen Partner 6His-`Hsl1p`.



**Abb. 3.42: Mittels eines prokaryotischen *in vitro* Translationssystems (RTS) synthetisierte *WD-repeat* Proteine binden nicht an ihre Partnerproteine.** Die Entwicklung von *in vitro* Faltungsstudien von Proteinen mit *WD-repeats* erforderte, dass in Abwesenheit eukaryotischer Faktoren keine Bindung mit ihren jeweiligen immobilisierten Partnerproteine erfolgt. Cdc20p-3HA und Cdc55p-3HA wurden mittels des prokaryotischen *in vitro* Translationssystems synthetisiert und radioaktiv markiert. Geladen wurden jeweils 1/10 Volumenanteil vom (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Ein Aliquot des Überstandes wurde für Bindungsexperimente mit Interaktionspartnern bzw. Kontrollproteinen eingesetzt (6His-`Hsl1p`, 6His-Tpd3p oder K). Jeweils 1/3 Volumenanteil der immobilisierten Proteine wurde nach Inkubation mit translatiertem, löslichem Cdc20p-3HA bzw. Cdc55p-3HA mittels SDS-PAGE und Radiogramm analysiert.

Dagegen zeigte der Ansatz mit Retikulozyten Lysat, dass Cdc20p-3HA größtenteils in der löslichen Fraktion vorlag und im Bindungsexperiment spezifisch mit 6His-`Hsl1p` interagiert (Abb. 3.43). Vergleichbare Resultate wurden auch mit Cdc55p-3HA erzielt (Abb. 3.42 und Abb. 3.43).



**Abb. 3.43: Mittels des eukaryotischen *in vitro* Translationsystems (Retik. Lysat) synthetisierte *WD-repeat* Proteine binden spezifisch an ihre Partnerproteine.** Cdc20p-3HA und Cdc55p-3HA wurden mittels eines eukaryotischen *in vitro* Translationsystems synthetisiert und radioaktiv markiert. Geladen wurden jeweils 1/10 Volumenanteil vom (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. Ein Aliquot des Überstandes wurde für Bindungsexperimente mit Interaktionspartnern bzw. Kontrollproteinen eingesetzt (6His-`Hsl1p`, 6His-Tpd3p oder K). Jeweils 1/3 Volumenanteil der immobilisierten Proteine wurde nach Inkubation mit translatiertem, löslichem Cdc20p-3HA bzw. Cdc55p-3HA mittels SDS-PAGE und Radiogramm analysiert.

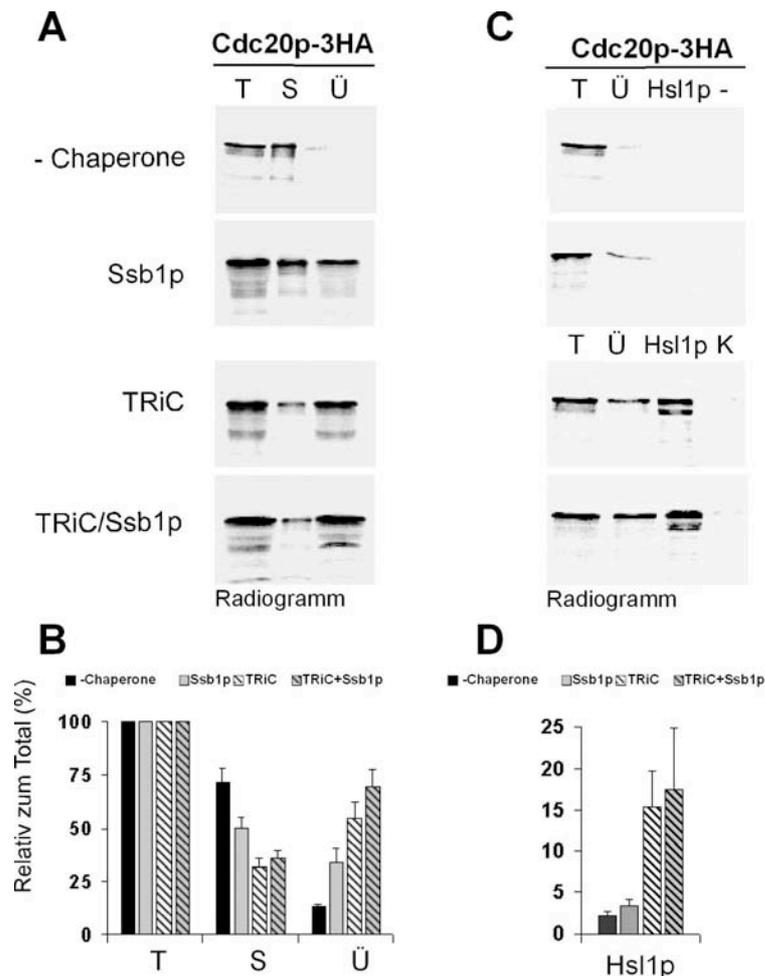
Obgleich ein substantieller Anteil von *in vitro* synthetisiertem Cdc55p-3HA auch unter Verwendung des prokaryotischen Systems in löslicher Form vorlag, zeigte dieser keine spezifische Bindung an Tpd3p. Dies deutet darauf hin, dass Cdc55p-3HA seinen nativen Faltungszustand unter diesen Bedingungen nicht erreicht hatte. Analoge Experimente wurden mit Pex7p-3HA durchgeführt. Wurde Pex7p-3HA mittels des Retikulozyten Lysats synthetisiert, lag erwartungsgemäß der größte Proteinanteil in löslicher Form vor. Allerdings zeigte sich unter diesen Bedingungen für lösliches Pex7p-3HA nur eine schwache Bindung an seinen Partner Pot1p-6His, was keine eindeutige Aussage über die Spezifität der Bindung zuließ (Daten nicht gezeigt).

Die Resultate der Bindungsexperimente mit Cdc20p, Cdc55p und Pex7p aus Hefelysate legen nahe, dass alle gereinigten Interaktionspartner an ihre korrespondierenden *WD-repeat* Partner binden können. Spezifische Interaktionen wurden auch zwischen *in vitro* synthetisiertem Cdc20p-3HA und Cdc55p-3HA mit 6His-`Hsl1p` bzw. 6His-Tpd3p in Gegenwart eukaryotischer Faktoren beobachtet. Dies stellte ein wesentliches Kriterium für die Verwendung dieser Bindungsexperimente in den nachfolgenden *in vitro* Rekonstitutionsversuchen mit gereinigtem TRiC und Ssb1p.

### 3.2.3.3.1. Löslichkeit und Faltung von *in vitro* synthetisiertem Cdc20p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p

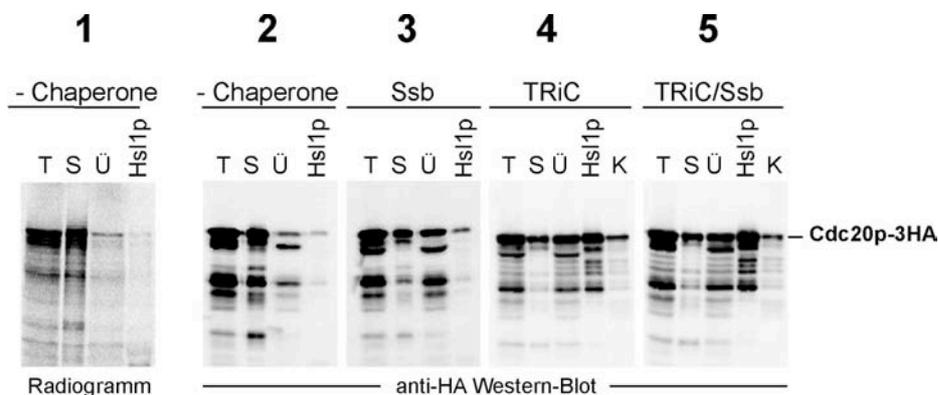
In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von gereinigten eukaryotischen Chaperonen auf die Faltung von Cdc20p untersucht. Hierzu wurde eine *in vitro* Translation von *CDC20-3HA* unter Verwendung des RTS in Ab- und Anwesenheit von Ssb1p und TRiC durchgeführt. Analog zu dem Experiment dargestellt in Abb. 3.42 wurde die Löslichkeit von Cdc20p-3HA (Abb. 3.44 A) und dessen Bindung an 6His-`Hsl1p` (Abb. 3.44 B) analysiert (s. 2.4.10.1.; 2.4.11.2.2.). Die Quantifizierung der Daten mehrerer, unabhängiger Experimente (Abb. 3.44 A) zeigte, dass Zugabe von Ssb1p zum Reaktionsansatz den Anteil an löslichem Cdc20p-3HA erhöht (Kontrolle 13%, Ansatz mit Ssb1p 34%, bezogen auf den Gesamtanteil synthetisierten Cdc20p-3HA). Wurde diese lösliche Fraktion

jedoch im Bindungsexperiment untersucht, so konnte keine spezifische Bindung von Cdc20p-3HA an 6His-`Hsl1p´ detektiert werden (Abb. 3.44 B). Zugabe von TRiC hatte im Vergleich zu Ssb1p einen noch stärkeren Einfluss auf die Löslichkeit von Cdc20p-3HA (55%), darüber hinaus interagierte lösliches Cdc20p-3HA in diesem Ansatz spezifisch mit 6His-`Hsl1p´ im Bindungsexperiment. Gegenüber dem Ansatz mit TRiC allein bewirkte die Kombination beider Chaperone, Ssb1p und TRiC, einen zusätzlichen Anstieg der Löslichkeit von Cdc20p-3HA (70%). Ebenso wurde eine spezifische Bindung von Cdc20p-3HA an 6His-`Hsl1p´ nachgewiesen.



**Abb. 3.44: Die Löslichkeit von *in vitro* synthetisiertem Cdc20p-3HA und dessen Interaktion mit Hsl1p ist von Ssb und TRiC abhängig.** Um den Einfluss von gereinigtem TRiC und Ssb1p auf die Faltung von Cdc20p zu untersuchen, wurde Cdc20p-3HA in Ab- und Anwesenheit gereinigter Chaperone (Ssb1p, TRiC, TRiC/Ssb1p) mittels des prokaryotischen *in vitro* Translationssystems synthetisiert und radioaktiv markiert. Gezeigt sind repräsentative Radiogramme. **(A)** Geladen wurde 1/10 Volumenanteil von (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. **(C)** Zusätzlich wurde ein Aliquot des Überstandes im Bindungsexperiment mit immobilisiertem 6His-`Hsl1p´ inkubiert (Hsl1p) und 1/3 Volumenanteil wurde analysiert. **(B)** Quantifizierung der Löslichkeitsverhältnisse von translatiertem Cdc20p-3HA. **(D)** Quantifizierung des Bindungsexperimentes. Zur Quantifizierung 6 unabhängiger Experimente wurden Signalstärken der Banden, die vollständig synthetisiertem Cdc20p-3HA entsprechen, densitometrisch ermittelt. Angaben in % zum Total-Ansatz (T); Fehlerbalken: Standardfehler. Ssb1p und TRiC erhöhen den Anteil an löslichem Cdc20p-3HA. Nur in Gegenwart von TRiC erreicht Cdc20p-3HA seine native Form und vermag an seinen Interaktionspartner zu binden.

Das Autoradiogramm in Abb. 3.44 weist neben der prominenten Bande, die vollständig synthetisiertem Cdc20p-3HA entspricht, noch weitere Banden mit schnellerem Migrationsverhalten auf. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Banden um Translation-Abbruchprodukte handelt, die eine spezifische Bindung an den Interaktionspartner `Hsl1p` in Frage stellen würden, wurde der Ursprung dieser Fragmente näher untersucht. Hierzu wurden Aliquots der Reaktionsansätze zusätzlich im anti-HA Western-Blot analysiert, um spezifisch das C-terminale HA-Epitop von Cdc20p-3HA zu detektieren. Abb. 3.45 zeigt, dass die Fragmente auch im anti-HA Western-Blot detektiert werden und die Western-Blot Signale denen des Radiogramms entsprechen.



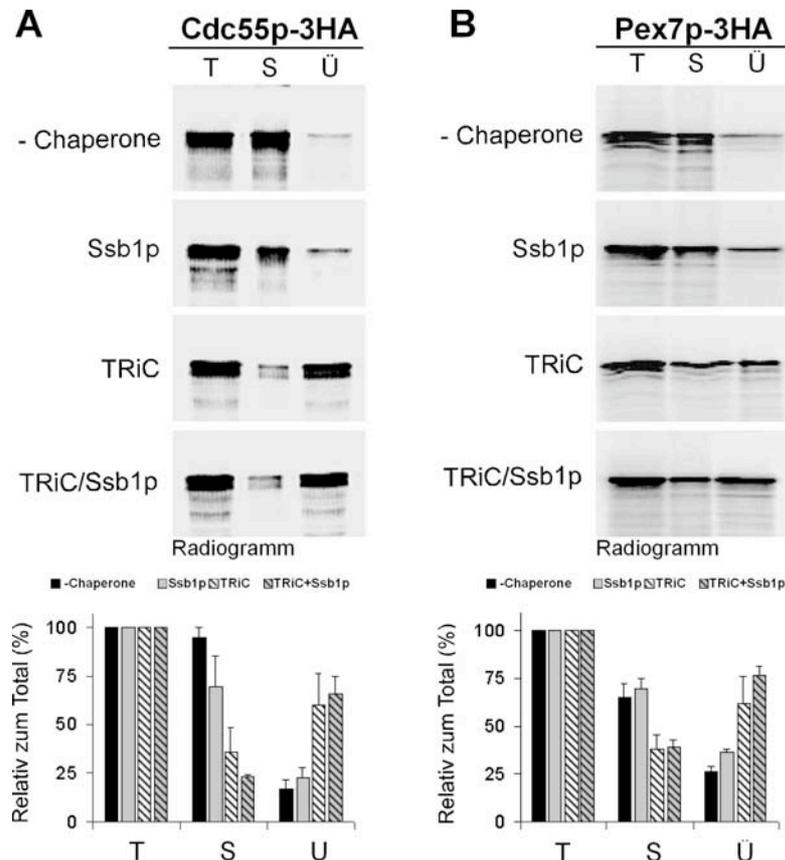
**Abb. 3.45: Detektion des C-terminalen HA-Epitops von Cdc20p-3HA im Western-Blot belegt dessen vollständige Translation *in vitro*.** Im Radiogramm erscheinen neben Vollängen-Cdc20p-3HA Signalen auch kleinere Fragmente. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Translations-Abbruchfragmente handelt, wurden zur spezifischen Detektion des C-terminalen HA-Epitops die Proben mittels anti-HA Western-Blot analysiert. **(1)** Radiogramm: Versuchsansatz ohne Zugabe von Chaperonen. **(2-5)** Anti-HA Western-Blots von Ansätzen ohne Chaperone, mit Ssb1p, mit TRiC und mit TRiC/Ssb1p. (T) Total-Ansatz (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. (Hsl1p, K) Aliquots der Bindeexperimente mit 6His-`Hsl1p` bzw. Kontrollproteinen.

Die Detektion des C-terminalen HA-Epitops belegt, dass Cdc20p-3HA vollständig synthetisiert wurde, es sich hier bei den Fragmenten also nicht um Translations-Abbruchfragmente handelt. Vielmehr legt dies den Schluss nahe, dass es sich um Abbauprodukte im Anschluss an die Translation handelt.

Die Ergebnisse des *in vitro* Rekonstitutionsexperiments, insbesondere die Interaktion von Cdc20p-3HA mit 6His-`Hsl1p`, zeigen, dass Ssb1p und TRiC spezifisch an der Faltung von Cdc20p-3HA beteiligt sind. Während Ssb1p einen entscheidenden Einfluss auf die Löslichkeit von Cdc20p-3HA ausübt, ist TRiC direkt am Faltungsprozess beteiligt. Erst die Präsenz von TRiC führt zu einem Faltungszustand von Cdc20p-3HA, der die spezifische Bindung des *WD-repeat* Proteins an seinen Interaktionspartner 6His-`Hsl1p` ermöglicht.

### 3.2.3.3.2. Löslichkeit von *in vitro* synthetisiertem Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p

Analog zu den Rekonstitutionsexperimenten mit Cdc20p-3HA (3.2.3.3.1.) wurde die Löslichkeit der anderen beiden TRiC Substrate mit *WD-repeats*, Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA (Abb. 3.46 A+B) analysiert.



**Abb. 3.46: Löslichkeitsverhalten von *in vitro* translatiertem Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA ist von eukaryotischen Chaperonen abhängig.** Um den Einfluss von TRiC und Ssb1p auf die Löslichkeit von Cdc55p und Pex7p zu untersuchen, wurden Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA in Ab- und Anwesenheit gereinigter Chaperone (Ssb1p, TRiC und TRiC/Ssb1p) mittels des prokaryotischen *in vitro* Translationssystem synthetisiert. Gezeigt sind Radiogramme repräsentativer Ansätze. **(A)** Cdc55p-3HA: (T) Total-Ansatz, (Ü) Überstand und (S) Sediment nach Zentrifugation. **(B)** Pex7p-3HA. Zur Quantifizierung unabhängiger Experimente (Cdc55p-3HA: 3; Pex7p-3HA: 4) wurden Signalstärken der Banden, die vollständig synthetisiertem Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA entsprechen, densitometrisch ermittelt. Angaben in % zum Total-Ansatz; Fehlerbalken: Standardfehler. Ssb1p und TRiC haben einen positiven Effekt auf die Löslichkeit von Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA.

Für beide *in vitro* synthetisierten Proteine verschob sich das Löslichkeitsverhältnis zur löslichen Fraktion, wenn Ssb1p in den Reaktionsansätzen präsent war. Im Fall von Cdc55p-3HA stieg der lösliche Anteil (bezogen auf den Gesamtanteil des synthetisierten Proteins) von 17% auf 22% an, bei Pex7p-3HA von 26% auf 36%. Zugabe von TRiC bewirkte dagegen eine drastische Zunahme der Löslichkeit beider Proteine (Cdc55p-3HA: 60% und Pex7p-3HA: 62%). Des Weiteren führte die Kombination beider Chaperone, Ssb1p und TRiC, zu einem zusätzlichen Anstieg des löslichen Anteils (Cdc55p-3HA: 66%,

Pex7p-3HA: 77%). Das Löslichkeitsverhalten dieser Substrate bestätigt also die Resultate aus *in vitro* Faltungsstudien von Cdc20p-3HA (Abb 3.44). Allerdings zeigten unter diesen *in vitro* Versuchsbedingungen Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA nur ein schwaches Bindevermögen an die korrespondierenden Interaktionspartner (6His-Tpd3p bzw. Pot1p-6His), was eine eindeutige Auswertung erschwerte (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3.3.3. Faltung von Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA aus Hefelysat in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1/2p

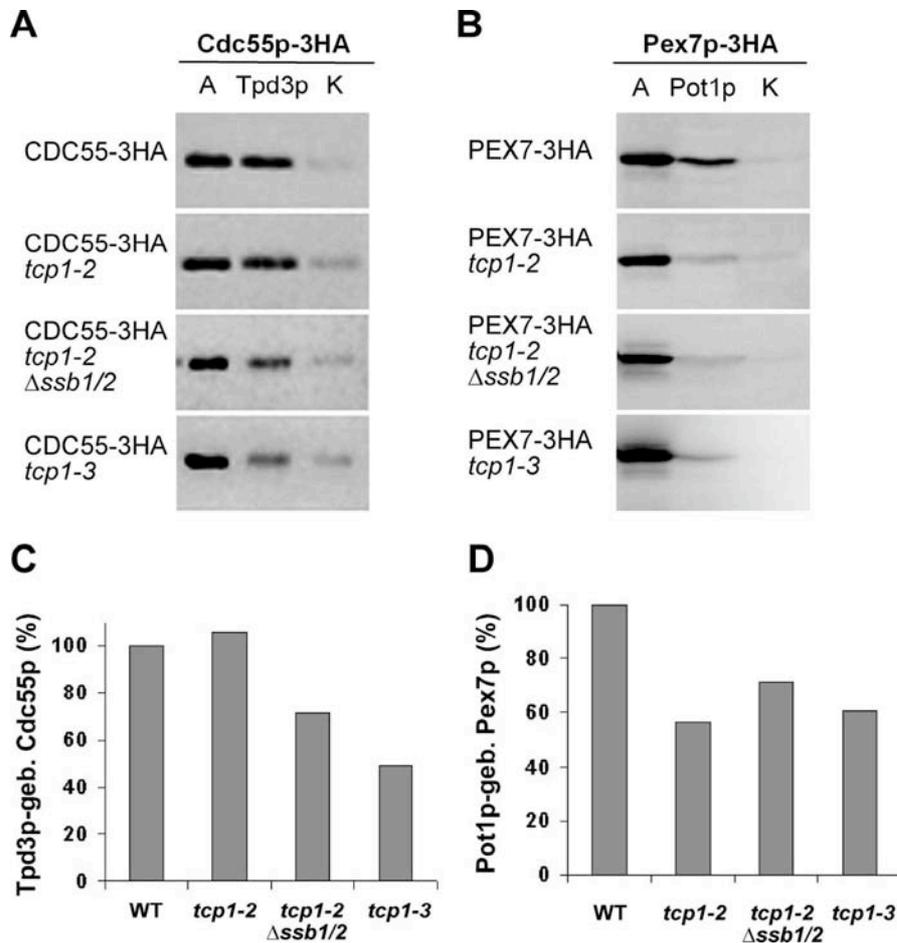
Die schwache Interaktion von *in vitro* synthetisiertem Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA mit dem korrespondierenden Interaktionspartner (s. 3.2.3.3.2.) legte den Schluss nahe, dass für eine stabile Interaktion zusätzlich Faktoren benötigt werden, die im prokaryotischen *in vitro* Translationssystem nicht vorhanden sind. Um die Abhängigkeit der Faltung beider Substrate von TRiC und Ssb1p zu zeigen, wurden daher Bindungsstudien mit Lysat von Hefemutanten, die Defekte für beide Chaperone aufweisen, durchgeführt (s. Tab. 3.6; s. 2.4.11.3.).

**Tabelle 3.6: Hefestämme für Bindungsexperimente mit Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA**

Hefestamm	Genotyp
KSY321	YPH499 pRS316- <i>TCP1</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>CDC55</i> :: <i>CDC55-3HA-kanMX6</i>
KSY339	YPH499 pCM538- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>CDC55</i> :: <i>CDC55-3HA-kanMX6</i>
UBY48	YPH499 pCM538- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> $\Delta$ <i>ssb1</i> :: <i>loxP</i> $\Delta$ <i>ssb2</i> :: <i>loxP</i> <i>CDC55</i> :: <i>CDC55-3HA-kanMX6</i>
KSY340	YPH499 pCM538- <i>tcp1-3</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>CDC55</i> :: <i>CDC55-3HA-kanMX6</i>
KSY323	YPH499 pRS316- <i>TCP1</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>PEX7</i> :: <i>PEX7-3HA-kanMX6</i>
KSY348	YPH499 pCM538- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>PEX7</i> :: <i>PEX7-3HA-kanMX6</i>
KSY365	YPH499 pCM538- <i>tcp1-2</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> $\Delta$ <i>ssb1</i> :: <i>loxP</i> $\Delta$ <i>ssb2</i> :: <i>loxP</i> <i>PEX7</i> :: <i>PEX7-3HA-kanMX6</i>
KSY349	YPH499 pCM538- <i>tcp1-3</i> $\Delta$ <i>tcp1</i> :: <i>HIS5MX6</i> <i>PEX7</i> :: <i>PEX7-3HA-kanMX6</i>

Die konditionalen TRiC-Mutanten *tcp1-2* (Gly423Asp) und *tcp1-3* (Gly45Ser) wurden ursprünglich in einem genetischen Screen nach Temperatur-sensitiven Mutanten von *TCP1/CCT1* identifiziert (Ursic und Culbertson, 1991; Ursic *et al.*, 1994). Durch Sequenzvergleiche lassen sich beide TRiC-Mutationen zwei konservierten „loop“-Motiven in der Nähe der ATP Bindestelle (GDGTTT/S) zuordnen. Beide Mutationen führen zu einem temperaturabhängigen Wachstumsdefekt, der sich phänotypisch unter anderem durch abnormale Organisation von Aktinfilamenten und Mikrotubuli auszeichnet (Ursic *et al.*, 1994). Zusätzlich wurden in der *tcp1-2* Mutante beide *SSB*-Gene disruptiert. In diesem Hefestamm ist im Vergleich zu der *tcp1-2* Einzelmutante der Wachstumsdefekt noch stärker ausgeprägt (Siegiers *et al.*, 2003). Für die folgende Analyse wurden Wildtyp-Zellen sowie *tcp1-2*, *tcp1-3* und *tcp1-2*  $\Delta$ *ssb1/2* Mutanten mit isogenem Stammhintergrund verwendet, die *CDC55-3HA* oder *PEX7-3HA* chromosomal exprimieren. Zellen dieser Stämme

wurden bei 30°C gezogen, und nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion mit immobilisierten 6His-Tpd3p bzw. 6His-Pot1p inkubiert. Als Kontrollprotein wurde immobilisiertes Calmodulin-6His verwendet (Abb. 3.47).



**Abb. 3.47: Bindung endogener WD-repeat Proteine aus *S. cerevisiae* an Interaktionspartner in Abhängigkeit von TRiC und Ssb2/2p.** Substrate mit WD-repeat Motiv aus Wildtyp-Hefezellen oder *tcp1*-Mutanten in Kombination mit Deletionen von *SSB1* und *SSB2* sollten bezüglich ihrer spezifischen Bindung an gereinigte Interaktionspartner getestet werden. Lysat dieser Stämme, die chromosomal *CDC55-3HA* (A) bzw. *PEX7-3HA* (B) exprimieren, wurde für das Bindungsexperiment mit immobilisiertem 6His-Tpd3p, Pot1p-6His oder einem Kontrollprotein inkubiert. Die Bindung wurde mittels anti-HA Western-Blots analysiert. (A) 1/3 Volumenanteil Ausgangsmaterial, (6His-Tpd3p, Pot1p-6His oder K) 1/3 Volumenanteil Überstand nach Bindungsexperimenten. Zur Quantifizierung wurden Western-Blot-Signale densitometrisch ermittelt und die Bindung von WD-repeat Proteinen an Interaktoren in Relation zu (A) (100%) gesetzt. (C) Bindung von Cdc55p-3HA an 6His-Tpd3p. (D) Bindung von Pex7p-3HA an Pot1p-6His. In den Mutanten ist die Bindung von WD-repeat Proteinen an Ihre Interaktionspartner beeinträchtigt.

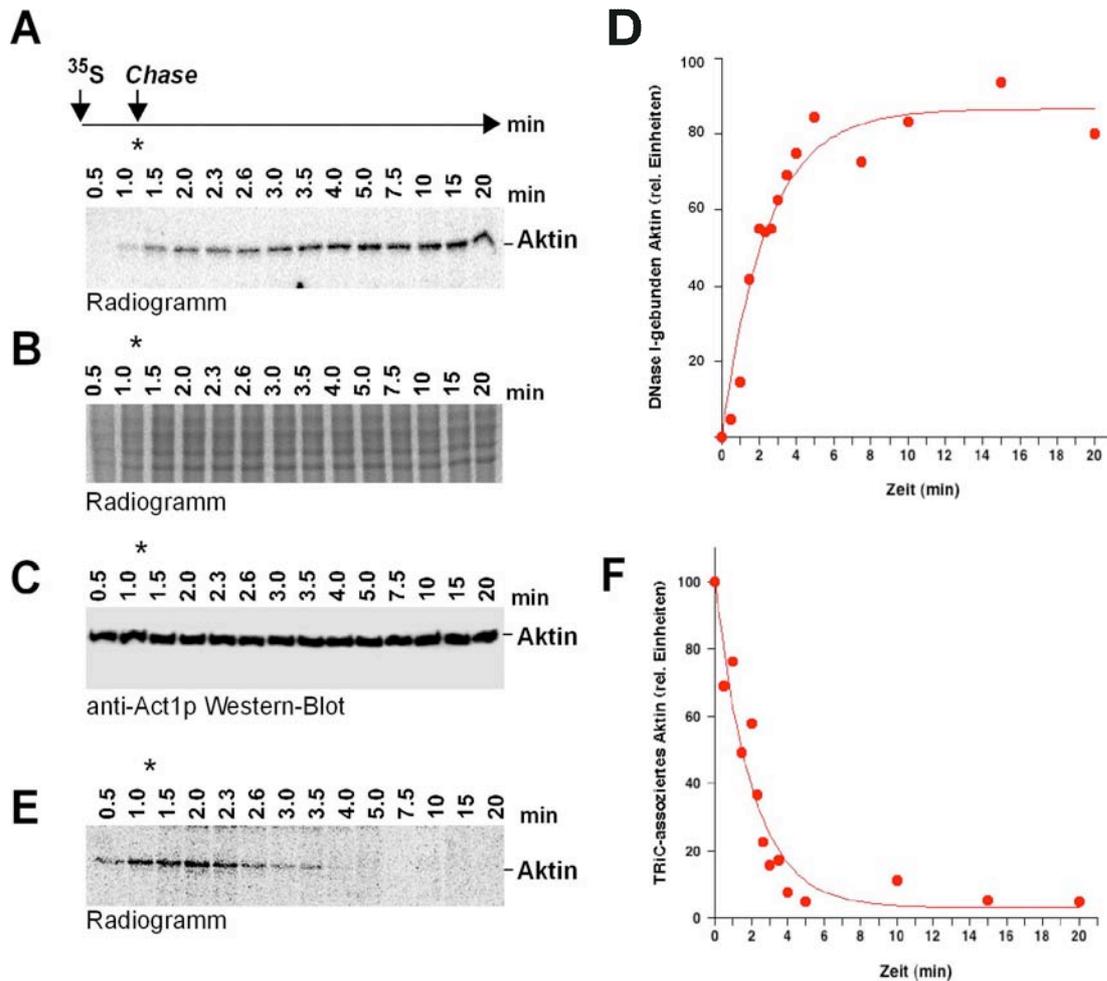
Da sowohl Cdc55p-3HA als auch Pex7p-3HA in diesen Stämmen relativ schwach exprimiert werden, wurden die löslichen Fraktionen je einer anti-HA Immunpräzipitation unterzogen (s. 2.4.8.). Die anti-HA Immunpräzipitation sowie das an 6His-Tpd3p- und Pot1p-6His-gebundene Material (s. 2.4.11.3.) wurden in einem anti-HA Western-Blot untersucht. Die hohe Affinität des anti-HA Antikörpers für das HA-Epitop resultierte in der nahezu vollständigen Immunpräzipitation von Cdc55p-3HA bzw. Pex7p-3HA und wurde

daher als Ausgangsmaterial (A) bezeichnet. Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA aus Wildtyp-Zellen interagierten spezifisch mit ihren jeweiligen Partnerproteinen. Im Fall Cdc55p-3HA war die Affinität gegenüber 6His-Tpd3p vergleichbar der Bindung an anti-HA IgG's. Demnach hatte nahezu die gesamte Menge des verfügbaren zellulären Cdc55p-3HA an seinen Interaktionspartner 6His-Tpd3p gebunden. In den unterschiedlichen *tcp1*-Mutanten ist die zelluläre Menge an Cdc55p-3HA niedriger, was auf eine geringere Stabilität des Proteins in diesen Mutanten hindeutet. Um eine Vergleichbarkeit der Bindung von Cdc55p an 6His-Tpd3p zu ermöglichen, wurden die Blot-Signale bezüglich des Ausgangsmaterials (HA-IP) normalisiert. Während unter Verwendung der *tcp1-2* Einfachmutante kaum ein Unterschied zum Wildtyp beobachtet wurde, zeigte die zusätzliche Deletion von *SSB1/SSB2* eine signifikante Reduktion in der Bindung von Cdc55p-3HA an 6His-Tpd3p. Noch deutlicher wurde dieser Effekt bei der *tcp1-3* Mutante beobachtet. In ähnlicher Weise ließen sich für die Bindung von Pex7p-3HA an Pot1p-6His für alle Mutanten schwächere Bindungseigenschaften gegenüber dem Wildtyp beobachten, wenn auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten weniger stark ausgeprägt waren. Die Resultate beider Experimente legen nahe, dass eine effiziente Bindung von *in vivo* synthetisiertem Cdc55p-3HA und Pex7p-3HA an ihre Bindungspartner von funktionellem TRiC und Ssb1/2p abhängig ist und demzufolge beide Chaperone maßgeblich an der Faltung dieser Substrate beteiligt sind.

### 3.3. Experimente zur Bestimmung der beta-Tubulin Faltungskinetik *in vivo*

Ergänzend zu *in vitro* Experimenten kann Chaperon-vermittelte Faltung von Substratproteinen mittels *in vivo* Studien untersucht werden, die Auskunft über den zeitlichen Ablauf der Substratbindung an das Chaperon sowie der Faltungsreaktion geben. In diesem Zusammenhang wurde bereits für Aktin dessen transiente Assoziation mit TRiC gezeigt sowie Bindungsstudien von *in vivo* gebildeten Aktinmonomeren an DNasel durchgeführt (Siegers *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu existierten *in vivo* Tubulin-Faltungsstudien bislang nicht. Der Vergleich der Faltungskinetiken von Aktin und Tubulinen ist von besonderem Interesse, da für die Dimerisierung von alpha- und beta-Tubulin zusätzliche Kofaktoren benötigt werden, die Einfluss auf die zeitliche Abfolge des Faltungsprozess nehmen könnten (s. 1.3.1.1.). Ziel war es deshalb, analog zu Aktin für Tubuline *in vivo* Faltungsstudien zu entwickeln.

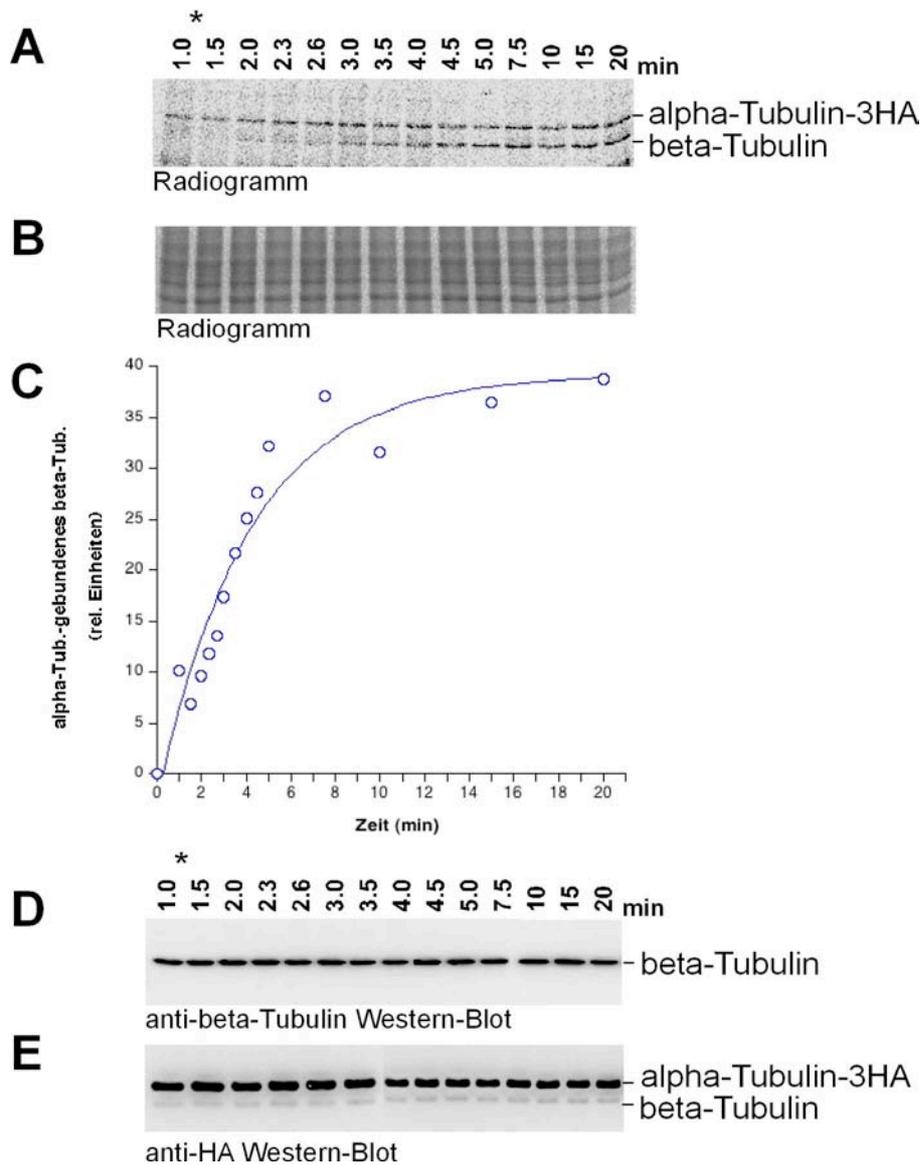
Abbildung 3.48 A zeigt eine Aktinfaltungskinetik, in der die *de novo* Synthese nativer Aktinmonomere durch Bindung an DNasel zeitlich gemessen wurde. Um die Faltung *de novo* synthetisierter Polypeptide zu verfolgen, wurden Sphäroplasten für einen kurzen Zeitraum (80 s) mit radioaktiv-markiertem Methionin und Cystein inkubiert (s. 2.4.13.). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Zellen in Gegenwart von EDTA lysiert. Hierdurch wurde aufgrund Komplexbildung freier  $Mg^{2+}$ -Ionen die ATPase-Aktivität von TRiC gehemmt und somit die Dissoziation von TRiC-gebundenem Aktin verhindert. Um die Faltung neu synthetisierten Aktins zu untersuchen, wurden Lysat-Aliquots der unterschiedlichen Zeitpunkte mit immobilisierter DNasel inkubiert (s. 3.2.2.2.). Die Menge an DNasel-gebundenem radioaktiv-markiertem Aktin wurde quantifiziert. Aus dem Graph geht hervor, dass bereits nach 1-2 min die Hälfte des *de novo* synthetisierten Aktins an DNasel gebunden ist. d.h. in seiner nativen Form vorliegt (3.48 D). Die Effizienz der metabolischen Proteinmarkierung mit [ $^{35}S$ ]-Methionin und [ $^{35}S$ ]-Cystein wurde anhand der Total-Extrakte im Radiogramm analysiert (3.48 B). Die Western-Blot Analyse mit Aktin-spezifischen Antikörpern zeigt zusätzlich, dass Gesamt-Aktin (= markiertes und nicht-markiertes, gefaltetes Aktin) in allen Proben effizient an DNasel gebunden hatte (Abb. 3.48 C). Neben der Bindung nativer Aktinmonomere an DNasel wurde die transiente Interaktion nicht-gefalteter Aktin-Monomere mit TRiC untersucht. Hierzu wurden Lysat-Aliquots einer TRiC-Immunpräzipitation mittels einer Epitop-markierten Untereinheit (Tcp2p-3HA) unterzogen und ko-immunpräzipitiertes Aktin analysiert (Abb. 3.48 E+F). Anhand der Daten zeigt sich, dass *de novo* gebildetes, radioaktiv-markiertes Aktin transient mit TRiC assoziiert ( $t_{1/2}$  ca. 2 min). Aus den Kinetiken beider Bindungsexperimente (TRiC- und DNasel-Bindung) geht hervor, dass Aktin unmittelbar im Anschluss an die transiente Assoziation mit TRiC in seiner nativen Form vorliegt.



**Abb. 3.48: Faltungskinetik und transiente TRiC-Assoziation von Aktin aus Hefezellen.**

(A) Aktinfaltungskinetik. Sphäroplastierte Wildtyp-Hefezellen wurden für 80 s radioaktiv-markiert und anschließend mit Cycloheximid und einem Überschuss an nicht radioaktivem Methionin/Cystein (\*) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Zellen lysiert und *de novo* synthetisierte, gefaltete Aktinmonomere an immobilisierte DNaseI gebunden. (B) Total-Extrakte zur Überprüfung der Markierungseffizienz. (C) Anti-Aktin Western-Blot mit Proben aus (A). (D) Quantifizierung von DNaseI-assoziiertem, radioaktiv-markiertem Aktin. Nach ca. 2 min ist die Hälfte des *de novo* synthetisierten Aktins an DNaseI gebunden. (E) Transiente Interaktion von TRiC mit *in vivo* gebildetem Aktin. Hefezellen, die chromosomal für Tc2p-3HA kodieren, wurden wie in (A) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde TRiC über seine Tc2p-3HA Untereinheit mittels anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert. (F) Quantifizierung von TRiC-assoziiertem, markiertem Aktin, normalisiert auf die Menge an markiertem Gesamtprotein. Die Halbwertszeit der Aktin-Dissoziation von TRiC liegt bei ca. 2 min. Die Experimente zeigen, dass die TRiC-Aktin Assoziation zeitlich der Bindung von gefaltetem Aktin an DNaseI vorausging.

Ähnlich der DNaseI-Assoziation mit nativen Aktinmonomeren kann zur Etablierung von Tubulin-Faltungskinetiken der Umstand genutzt werden, dass alpha-Tubulin und beta-Tubulin nur nach Erreichen ihrer nativen Form dimerisieren (s. 1.3.1.1.). Wildtyp-Sphäroplasten, die neben WT *TUB1* (kodiert für alpha-Tubulin) Epitop-markiertes *TUB1*-3HA extrachromosomal exprimieren, wurden für einen kurzen Zeitraum radioaktiv markiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Zellen in EDTA-haltigem Puffer lysiert (s. 2.4.13.). Alpha-Tubulin-3HA wurde mittels anti-HA Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 3.49).



**Abb. 3.49: Faltungskinetik von beta-Tubulin.** Sphäroplastierte Hefezellen, die extrachromosomal für alpha-Tubulin-3HA kodieren, wurden für 80 s radioaktiv markiert und anschließend mit Zykloheximid und einem Überschuss von nicht radioaktivem Methionin/Cystein (\*) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und Zellen lysiert. Beta-Tubulin wurde durch Bindung an alpha-Tubulin-3HA mittels anti-HA IgGs ko-immunpräzipitiert. **(A)** An alpha-Tubulin-3HA gebundenes, radioaktiv-markiertes beta-Tubulin. **(B)** Kontrolle: Total-Extrakte. **(C)** Quantifizierung von ko-immunpräzipitiertem beta-Tubulin. Nach ca. 4 min ist die Hälfte *de novo* synthetisiertes beta-Tubulin an alpha-Tubulin gebunden. **(D)** Anti-beta-Tubulin Western-Blot der Proben aus (A). **(E)** Anti-HA Western-Blot der Proben aus (A). Neben alpha-Tubulin erscheinen spezifische beta-Tubulin Restsignale der vorrangegangenen Antikörper-Inkubation.

Da die Bindung des HA-Antikörpers unabhängig vom Faltungszustand von alpha-Tubulin erfolgt, ist bereits zum Zeitwert  $t = 1$  min eine Bindung von alpha-Tubulin-3HA im Radiogramm zu beobachten. Nach etwa 3 min lassen sich im Radiogramm signifikant zusätzliche Signale erkennen, welche in ihrem Migrationsverhalten dem von beta-Tubulin im 7,5% SDS-Gel entsprechen (Abb. 3.49 A), wie aus der Western-Blot Analyse hervorging (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle für die Markierungseffizienz wurden Total-Extrakte aller Zeitwerte im Radiogramm analysiert (Abb. 3.49 B). Eine Western-Blot Analyse, die

zunächst mit anti-beta-Tubulin Antikörpern durchgeführt wurde, belegt, dass beta-Tubulin effizient mit alpha-Tubulin-3HA ko-immunpräzipitiert wurde (Abb. 3.49 D). Dieselbe Transfermembran wurde anschließend mit anti-HA Antikörpern inkubiert (Abb. 3.49 E). Alpha-Tubulin-3HA wurde aus den Proben zu allen Zeitwerten gleichmäßig immunpräzipitiert. Zur Quantifizierung wurden im Radiogramm Signale von ko-immunpräzipitiertem beta-Tubulin densitometrisch bestimmt (Abb. 3.49 C). Anhand der graphischen Auswertung zeigt sich, dass nach ca. 4 min die Hälfte des *de novo* synthetisierten, gefalteten beta-Tubulins dimerisiert mit alpha-Tubulin vorliegt. Diese Daten geben erste Anhaltspunkte, dass die Chaperon-vermittelte Faltung von Aktin und den Tubulinen in einem unterschiedlichem Zeitrahmen abläuft.

---

## 4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für TRiC aus Hefe, um in funktionellen *in vitro* Studien in Kombination mit anderen gereinigten Chaperonen die TRiC-vermittelte Faltung für verschiedene Substrate zu untersuchen. Gegenüber der bereits beschriebenen Reinigungsmethode von TRiC aus Rinderhoden (Ferreya and Frydman, 2000) bietet die Reinigung aus Hefe als gut charakterisiertem und genetisch leicht veränderbarem Modellorganismus zahlreiche Vorteile. Hierzu zählt vor allem die Verwendung gereinigter TRiC-Mutanten *in vitro*, was die funktionelle Analyse des Chaperonins bedeutend erleichtert. So stehen bereits verschiedene Mutanten von TRiC zur Verfügung (Ursic *et al.*, 1992 und 1994) bzw. lassen sich aufgrund der vollständigen Entschlüsselung des Hefegenoms (Goffeau *et al.*, 1997) gezielt generieren. Daneben erleichtert die Kenntnis der Genomsequenz und damit der Aminosäureabfolge der einzelnen Untereinheiten auch die Strukturanalyse von Proteinkristallen, für deren Gewinnung das gereinigte Chaperonin herangezogen werden kann.

### 4.1. Reinigung von TRiC aus *S. cerevisiae*

Die Anforderungen einer effizienten Reinigung (schnelle Reinigung großer Mengen funktionellen Proteins zu einem hohem Reinheitsgrad) des multimeren Chaperonin-Komplexes beinhalteten die Herstellung TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper bzw. Epitop-markierter TRiC Untereinheiten. Darüber hinaus mussten Reinigungsbedingungen gesucht werden, unter denen der Komplex stabil vorliegt und sich zu einem hohen Reinheitsgrad aus Hefezellen isolieren lässt. Daher wurden für die Anreicherung von TRiC anfangs parallel verschiedene Methoden (immunologische Methoden bzw. Affinitätschromatographie) verfolgt und miteinander verglichen. Im Folgenden wurde die optimale Anreicherungsmethode als Basis für die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls mit weiteren chromatographischen Schritten zur Reinigung von funktionellem TRiC verwendet.

#### 4.1.1. Vergleich verschiedener Strategien zur Anreicherung von TRiC

Eine mögliche Strategie der TRiC Anreicherung basiert auf Verwendung immobilisierter, TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper, mit deren Hilfe sich der Komplex immunpräzipitieren lässt. Diese Methode setzt voraus, dass die Epitope der jeweiligen TRiC Untereinheiten für die korrespondierenden Antikörper unter nativen Bedingungen, d.h. im assemblierten Chaperonin-Komplex, zugänglich sind. Der Vorteil der TRiC Immunpräzipitation mittels Untereinheiten-spezifischer Antikörper besteht vor allem darin, dass das Chaperonin ohne zusätzliche Modifikation angereichert werden kann. Besonders bei Kristallisierungsexperimenten kann sich ein Epitop-Anhang als störend herausstellen.

Alternativ können zur Reinigung Epitop-markierte TRiC Untereinheiten herangezogen werden, die durch gezielte Verwendung hoch affiner Antikörper bzw. einer Affini-

tätsmatrix eine effiziente Anreicherung des Chaperonin-Komplexes erlauben. Voraussetzung hierfür ist, dass der Epitop-*tag* einerseits nicht mit der Funktionalität des Chaperonins interferiert, andererseits aber auch für die Matrix zugänglich ist. Zusätzlich muss die Möglichkeit bestehen – wie auch bei der Verwendung TRiC Untereinheitenspezifischer Antikörper –, den intakten Chaperonin-Komplexes im Anschluss an die Anreicherung effizient von der Matrix zu eluieren.

Für die Reinigung nicht-modifizierter Komplexe wurden TRiC Untereinheitenspezifische Antiseren generiert, diese an Protein A-Sepharose gekoppelt und der Komplex aus Hefezellen angereichert (Abb. 3.4). Analog zu dieser Methode wurde TRiC unter Verwendung einer C-terminal 3HA-Epitop-markierten Untereinheit mittels eines hochaffinen anti-HA-Antikörpers ko-immunpräzipitiert (Abb. 3.5). In einem anderen Versuchsansatz ließ sich der Komplex über eine C-terminal TEV-linker-6His-markierte Untereinheit mittels einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsmatrix reinigen (Abb. 3.9). Aufgrund der bereits bekannten Kristallstruktur des Thermosoms aus *T. acidophilum* (Dietzel *et al.*, 1998) und dessen hoher Sequenzhomologie zu TRiC (ca 40%; Gutsche *et al.*, 1999) wird angenommen, dass die C-Termini aller TRiC Untereinheiten Bestandteil der Äquatorialebene sind und C-terminale Epitope in die Faltungshöhle ragen (Abb. 1.3). Die Zugänglichkeit des 6His-Epitops zur Matrix konnte durch eine flexible alpha-helikale Verbindungssequenz von 37 Aminosäuren (*linker*) gewährleistet werden (ca. 55,5 Å; die Ganghöhe einer alpha-Helix beträgt 3,6 Aminosäuren und nimmt einen axialen Abstand von 5,4 Å pro Windung ein). Die TEV-Erkennungssequenz und 6 Histidine haben eine Länge von ca. 45,5 Å (axialer Abstand zwischen 2 Aminosäuren nicht-helikaler Polypeptide: ca. 3,5 Å). Daher umfasst der TEV-linker-6His-*tag* insgesamt eine Länge von ca. 101 Å. In Anlehnung an das Thermosom wird auch bei TRiC das Innere der Faltungshöhle eines Ringes auf eine Höhe von ca. 45 Å geschätzt. Demzufolge ragt die Hexahistidin-Sequenz aus der Faltungskammer. Im Fall des hier verwendeten HA-Epitop-*tags* (44 Aminosäuren; Sequenz von 3 HA-Epitopen und zusätzliche Aminosäuren) war eine Verbindungssequenz nicht notwendig, da die Länge des *tags* (ca. 154 Å im linearen Zustand; axialer Abstand zwischen 2 Aminosäuren: ca. 3,5 Å) zur Antigen-Präsentation ausreicht. Folglich könnten durchaus 2 der 3 HA-Epitope aus der Faltungskammer ragen. Die Funktionalität des Chaperonins ist durch die hier verwendeten Epitop-Markierungen nicht beeinträchtigt. Dies ließ sich anhand von Hefestämmen demonstrieren, welche die Epitop-markierte Untereinheit als einzige Kopie in der Zelle tragen. Obgleich alle 8 Untereinheiten essentiell sind und nicht durch paraloge Untereinheiten ersetzt werden können, wurden für jene Stämme keine Wachstumsdefekte beobachtet (Abb. 3.3 und Kapitel 3.1.4.). Demzufolge interferieren die in der Faltungshöhle lokalisierten Epitope (3HA, TEV-linker-6His) nicht mit dem Faltungsprozess essentieller TRiC Substrate, wie z.B. Aktin und Tubuline.

Mit allen drei Methoden ließen sich vollständig assemblierte Chaperonin-Komplexe aus Hefelysate anreichern, wenngleich sich die einzelnen Reinigungsmethoden im Grad der

Anreicherung unterschieden. So war die Anreicherung unter Verwendung TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper geringer als unter Verwendung Epitop-markierter TRiC-Untereinheiten. Dies mag unter anderen darin begründet sein, dass es sich hier um polyklonale Antikörper mit vermutlich divergierenden Affinitäten zu unterschiedlichen Tcp-Epitopen handelt. Allerdings könnte die Menge an immunpräzipitiertem TRiC durch Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper oder Kombination verschiedener TRiC Untereinheiten-spezifischer Antikörper erhöht werden. Im Gegensatz hierzu führte die Verwendung einer HA-markierten TRiC Untereinheit mittels immobilisierter HA-Antikörper zur effizienten Ko-Immunitätsreinigung von TRiC. Die einzelnen TRiC Untereinheiten ließen sich bereits mittels Coomassie-Färbung im SDS-Gel detektieren (Abb. 3.5). Die hohe Affinität des Antikörpers zum HA-Epitop erschwerte jedoch die Elution (mit freiem 6HA-Polypeptid oder 0,1 M Glyzin pH 3) des angereicherten Chaperonins von der Matrix. Stringentere Elutionsmethoden konnten nicht angewendet werden, ohne die Stabilität und Funktionalität des gereinigten Chaperonins zu beeinflussen. Damit ist diese Methode zur Gewinnung von gereinigtem TRiC für anschließende funktionelle *in vitro* Faltungsstudien unter diesen Bedingungen nicht geeignet. Allerdings zeigte sich anhand von Western-Blots mittels Aktin- und Tubulin-spezifischer Antikörper, dass sich unter Verwendung der HA-markierten TRiC-Untereinheit neben TRiC auch TRiC-Substrate spezifisch ko-immunpräzipitieren lassen (Daten nicht gezeigt). Daher könnte diese Methode durchaus bei anderen Zielsetzungen Verwendung finden, wie z.B. der Identifizierung potentieller TRiC Substrate mittels Massenspektrometrie.

Gegenüber der anti-HA Immunpräzipitation war die Anreicherung von TRiC an die Matrix unter Verwendung des TEV-linker-6His-*tags* geringer (Faktor 0,1 – 0,2). Gründe hierfür liegen vermutlich an der unterschiedlichen Zugänglichkeit bzw. Affinität beider Epitop-*tags* (TEV-linker-6His, 3HA) zur jeweiligen Matrix. Allerdings überwog unter Verwendung des 6His-Epitops deutlich der Vorteil, dass TRiC effizient von der Affinitätsmatrix eluiert werden konnte. Außerdem war durch Inserierung der TEV-Erkennungssequenz die Abspaltung des Epitop-*tags* im Anschluss an die Reinigung gewährleistet. Aus diesen Gründen wurde die Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie für die Isolierung von TRiC im Großmaßstab gewählt.

#### **4.1.2. Entwicklung eines Reinigungsprotokolls von TRiC im Großmaßstab**

Für die Reinigung von TRiC mittels Affinitätschromatographie wurde ein diploider Hefestamm generiert, der die gleichzeitige Überexpression aller 8 individuellen Untereinheiten erlaubt und somit eine höhere Ausbeute an gereinigtem TRiC ermöglicht (Abb. 3.13). Die eigens hierfür konstruierten 4 Überexpressionsplasmide beinhalten jeweils den Leserahmen von 2 verschiedenen *TCP/CCT*-Genen unter Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors. Ferner sind im diploiden Hefestamm neben den extrachromosomalen auch beide chromosomalen *TCP1/CCT1*-Kopien mit einer TEV-linker-6His-Sequenz versehen (s. 3.1.4.1.1.).

Dies gewährleistet, dass TRiC in der Zelle ausschließlich als His-markiertes Chaperonin vorkommt und folglich keine Komplexe ohne Epitop-*tag* assemblieren, die an die Affinitätsmatrix nicht binden könnten. Schließlich wurde in diesem Hefestamm eine *REG1* Disruption vorgenommen, wodurch sich die Glukose-vermittelte Repression *GAL1*-Promoter-regulierter Gene aufheben lässt (Schüller *et al.*, 2003) und daher die Überproduktion der einzelnen TRiC Untereinheiten auch in Gegenwart von Glukose möglich ist (s. 3.1.4.1.2.). Da Glukose schneller als Galaktose von Hefezellen metabolisiert wird, werden durch zusätzliche Gegenwart von Glukose im Medium optimale Wachstumsbedingungen ermöglicht. Beide Zucker lassen sich durch enzymatische Spaltung von Laktose mit  $\beta$ -Galaktosidase erzeugen, was eine kostengünstige Alternative zur Verwendung der einzelnen Monosaccharide darstellt.

Im ersten Schritt der Reinigung wurde das in Fermenterkulturen dieses Hefestammes überproduzierte TRiC über seine Epitop-markierte Tcp1p-Untereinheit durch Affinitätschromatographie vom Großteil aller löslichen Proteine des Hefelysats separiert. Die Effizienz der Reinigungsstrategie zeichnete sich bereits durch Analyse der Fraktionen im Coomassie-Gel ab, in dem sich das für TRiC typische Bandenmuster erkennen ließ (Abb. 3.15). Ein Großteil der Verunreinigungen, die unspezifisch an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätsmatrix gebunden hatten und ein zu TRiC unterschiedliches Molekulargewicht aufwiesen, wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie von TRiC abgetrennt (Abb. 3.16). Nach Abspaltung des TEV-linker-6His-*tags* mittels TEV-Protease wurde TRiC vom abgespaltenen Epitop-*tag* sowie der His-markierten TEV-Protease durch eine zweite Affinitätschromatographie (Filtersäule) separiert (Abb. 3.17, 3.18). Hierdurch konnten auch solche Kontamination entfernt werden, die sich von TRiC im vorangegangenen Reinigungsschritt nicht abtrennen ließen und eine hohe Affinität zur  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix aufwiesen (z.B. Alkoholdehydrogenase I). Im letzten chromatographischen Reinigungsschritt wurde TRiC mittels eines Anionenaustauschers von unvollständig assemblierten Chaperonin-Komplexen separiert, die im Vergleich zu TRiC bei anderen Salzkonzentrationen von der Säule eluierten (Abb. 3.19).

Die Qualität (Reinheitsgrad, Funktionalität) des gereinigten Komplexes ließ sich durch unterschiedliche analytische Methoden belegen. So zeigten Western-Blots mit TRiC Untereinheiten-spezifischen Antiseren, dass alle Untereinheiten im assemblierten Chaperonin vertreten sind (Abb. 3.22). Analytische Gelfiltration sowie Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen demonstrierten ferner, dass TRiC auch nach Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  als stabiler Komplex vorliegt (Abb. 3.21, Abb. 3.23). Zusätzlich veranschaulicht die Nativ-Gelelektrophorese, dass gereinigtes Chaperonin an Aktin, eines der Hauptsubstrate von TRiC, bindet (Abb. 3.23, Radiogramm). Elektronenmikroskopische Aufnahmen demonstrierten außerdem die Reinheit sowie Homogenität der gereinigten Chaperonin-Komplexe (Abb. 3.24). Ferner zeigten Western-Blots, dass im gereinigten Komplex keine Kontaminationen von Aktin und alpha-Tubulin nachweisbar sind, deren Gegenwart sich in

funktionellen Tests mit dem gereinigtem Komplex als störend erweisen würden (Abb. 3.31). Schließlich wurde anhand von Faltungsstudien mit *in vitro* synthetisiertem Aktin die Funktionalität von gereinigtem TRiC belegt (Abb. 3.36; näheres siehe Kapitel 4.2.1).

Die Entwicklung dieses Protokolls erlaubt die quantitative Reinigung von funktionellem TRiC im Großmaßstab aus Hefe. Basierend auf insgesamt nur 4 chromatographischen Reinigungsschritten kann TRiC aus Hefelysat isoliert werden und für *in vitro* Rekonstitutionsexperimente zur Faltungsanalyse von TRiC Substraten verwendet werden. Die Ausbeute an gereinigtem Chaperonin aus Fermenterkulturen des *TCP/CCT*-Überexpressionsstammes liegt bei ca. 1,5 mg pro 100 g Hefezellen. Dies beträgt ungefähr ein Drittel der Ausbeute, die ursprünglich für die Reinigung von TRiC aus Gewebe des Rinderhodens, das besonders reichhaltig an Chaperonin ist, erzielt wurde (3-5 mg aus 100 g Gewebe; Ferreyra and Frydman, 2000). Der große Vorteil des Hefesystems gegenüber Rinder-Testis besteht aber in der Möglichkeit, auf TRiC-Mutanten zurückzugreifen bzw. gezielt Mutagenese vornehmen zu können, wie beispielsweise in der apikalen Substrat-Bindedomäne zur Analyse der Substratspezifität. Solche Mutanten können mit der hier entwickelten Methode analog zu Wildtyp-Chaperonin gereinigt und in funktionellen *in vitro* Faltungsstudien anhand bereits gut charakterisierter Substrate untersucht werden (siehe hierzu auch 4.4.).

## **4.2. In vitro Faltungsstudien mit gereinigtem TRiC aus *S.cerevisiae***

Die essentielle Bedeutung von TRiC für die Faltung von Aktin und anderen Substraten ist seit geraumer Zeit bekannt (Kubota *et al.*, 1995, Lewis *et al.*, 1996; Farr *et al.*, 1997; Siegers *et al.*, 1999), dennoch ist der genaue Mechanismus der Faltung bislang noch ungeklärt. Eine Möglichkeit, Einblick in die molekulare Wirkungsweise der TRiC-vermittelten Faltung zu bekommen, ist die Durchführung von *in vitro* Rekonstitutionsexperimenten zur Faltungsanalyse von TRiC Substraten in Gegenwart gereinigter Chaperone. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, die Rolle einzelner Chaperone, die *in vivo* in komplexen Netzwerken oftmals redundante Funktionen ausüben, bei der Faltung von Proteinen direkt zu untersuchen.

### **4.2.1. Entwicklung von *in vitro* Rekonstitutionstests zur Faltung von TRiC Substraten**

Da TRiC vor allem an der *de novo* Proteinfaltung beteiligt ist, wurden *in vitro* Rekonstitutionstests entwickelt, anhand derer sich gezielt die Faltung neu synthetisierter Polypeptidketten untersuchen lässt. Hierzu wurde ein prokaryotisches *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem gewählt, das folglich über keine eukaryotischen Chaperone verfügt. Der Einfluss von TRiC, GimC bzw. Ssb1p auf die *de novo* Faltung verschiedener TRiC Substrate wurde untersucht, indem die gereinigten Chaperone einzeln oder in Kombination der *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion zugefügt wurden und

anschließend die Faltung des *in vitro* synthetisierten Polypeptids analysiert wurde. Der Faltungszustand eines Proteins – (partiell) gefaltet oder ungefaltet – lässt sich indirekt über dessen Löslichkeit bestimmen, da nicht-gefaltete Polypeptidketten aufgrund exponierter hydrophober Bereiche zur Aggregation und damit zur Präzipitation neigen. Allerdings erlaubt die Bestimmung der Löslichkeit keine Aussage darüber, ob das Protein vollständig bzw. korrekt gefaltet vorliegt. Hierfür eignen sich vor allem Aktivitätstests, da sich die spezifische Funktion eines Proteins direkt aus seiner dreidimensionalen, nativen Struktur ableitet. Da funktionelle - z.B. enzymatische Tests - nicht für alle Testsubstrate durchführbar sind, wurde hier eine Alternativstrategie verfolgt. Diese beruht auf der Interaktion eines Testsubstrats mit einem Partnerprotein unter der Voraussetzung, dass eine spezifische Wechselwirkung mit dem Interaktionspartner ausschließlich nur dann stattfinden kann, wenn das Testsubstrat in seiner korrekt gefalteten, nativen Struktur vorliegt.

Das hier entwickelte *in vitro* Rekonstitutionssystem mit gereinigten Chaperonen wurde am Beispiel des prominenten TRiC Substrats Aktin erprobt (Abb. 3.36). Die *de novo* Faltung synthetisierten Aktins lässt sich neben der Bestimmung der Löslichkeit über dessen Interaktion mit DNaseI verfolgen, da nur native Aktinmonomere spezifisch von DNaseI gebunden werden (Lazarides und Lindberg, 1974; Kabsch *et al.*, 1990). Gegenwart von gereinigtem TRiC oder GimC erhöhten die Löslichkeit *in vitro* synthetisierten Aktins im bakteriellen Transkriptions-/Translationssystem, wobei die Kombination beider Chaperone einen additiven Effekt auf die Löslichkeit von Aktin zeigte. Eine korrekte Faltung von Aktin - visualisiert durch Bindung an DNaseI - erfolgte jedoch nur, wenn TRiC im Translationsansatz vorhanden war. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, die anhand von *in vivo* Faltungsstudien in Hefezellen und anhand von *in vitro* Aktin-Bindungsstudien mit gereinigten Komponenten aus Retikulozyten Lysat (TRiC) und Rindenhoden (Prefoldin) gemacht wurden (Sieggers *et al.*, 1999; Vainberg *et al.*, 1998). Der Befund, dass nur ein kleiner Anteil *in vitro* synthetisierten Aktins an DNaseI bindet (weniger als 10% bezüglich der Gesamtmenge synthetisierten Aktins), könnte darauf zurückzuführen sein, dass natives, monomeres G-Aktin bereits im Laufe der Transkriptions-/Translationsinkubation teilweise zu filamentösen F-Aktin polymerisiert ist, an das DNaseI nicht mehr binden kann. Oberhalb der kritischen Konzentration monomeren G-Aktins liegt das Gleichgewicht auf Seiten von F-Aktin. Die berechnete Konzentration von *in vitro* synthetisiertem Aktin lag gegen Ende der Reaktion (0,23  $\mu\text{M}$ ) tatsächlich oberhalb der kritischen Konzentration (0,1  $\mu\text{M}$ ), die unter gängigen *in vitro* Reaktionsbedingungen für Aktin angegeben wird (Lodish *et al.*, 2004, S. 784). Darüber hinaus wurde Aktinpolymerisation bereits für *in vitro* synthetisiertes Maus-Aktin beobachtet (Stemp *et al.*, 2005). Um den Anteil an F-Aktin zu reduzieren und damit eine höhere Bindung an DNaseI zu ermöglichen, könnte beispielsweise die Salzkonzentration (z.B.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -Ionen), die einen direkten Einfluss auf die kritische

Konzentration für die Aktin-Polymerisierung hat, erniedrigt oder Polymerisation-inhibierende Substanzen (z.B. Cofilin) dem Ansatz beigefügt werden (Lodish *et al.*, 2004).

Die hier vorgestellten Daten lassen folgende Schlüsse zu: Die Löslichkeit *in vitro* synthetisierten Aktins in Gegenwart von GimC oder TRiC demonstriert, dass beide gereinigten Chaperone den Faltungszustand von Aktin beeinflussen, d.h. dessen Aggregation verhindern, und folglich funktionell sind. Die Bindung von Aktin, das in Gegenwart von TRiC synthetisiert wurde, an DNaseI zeigt ferner, dass mittels dieses *in vitro* Rekonstitutionssystems der unterschiedliche Beitrag gereinigter Chaperone an der Substrat-Faltung bestimmt werden kann. So verhindert die Gegenwart von GimC die Aggregation von *in vitro* synthetisiertem Aktin, vermittelt aber nicht die Faltung in dessen Nativzustand (Abb. 3.36). Dagegen scheint TRiC an beiden Prozessen beteiligt zu sein. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass GimC ungefaltete Substrate zwar bindet und dadurch in Lösung hält, vornehmlich aber als Ko-Chaperon während der TRiC-vermittelten Faltung auftritt. Die Funktion von GimC könnte daher einerseits in der Rekrutierung von Substraten zu TRiC liegen (Vainberg *et al.*, 1998). Andererseits könnte GimC aber auch eine Rolle in der Qualitätskontrolle spielen. *In vivo* liegt GimC z.T. mit TRiC assoziiert vor (Siegiers *et al.*, 1999; *in vitro*: Martín-Benito *et al.*, 2002), entweder durch eine direkte oder Substrat-vermittelte Interaktion. Folglich könnte TRiC-assoziiertes GimC auch partiell gefaltete Polypeptide binden, die aus der TRiC-Faltungshöhle entlassen worden sind, bis diese erneut von TRiC gebunden werden und einen weiteren Faltungszyklus durchlaufen. Durch diese Form der Qualitätskontrolle wäre eine effizientere TRiC-vermittelte Faltung gewährleistet (Siegiers *et al.*, 1999).

Neben dem Einfluss von TRiC und GimC wurde auch der Beitrag von Ssb1p auf die *in vitro* Faltung von Aktin untersucht. Dieses Hsp70 Chaperon bindet unspezifisch ko-translational an Polypeptidketten (Pfund *et al.*, 1998). Obwohl Ssb1/2p in der TRiC-vermittelten Faltung von *WD-repeat* Proteinen zusätzlich auch eine post-translationale Funktion zukommt, kann es die spezifische Funktion von GimC in der Faltung von Aktin nicht ersetzen (Siegiers *et al.*, 2003). Wurde gereinigtes Ssb1p dem hier verwendeten *in vitro* Translationssystem zugefügt, so ließ sich gegenüber der Kontrolle ohne Chaperon-Zugabe keine signifikante Zunahme des löslichen Aktin-Anteils feststellen (Abb. 3.36). Folglich vermag Ssb1p auch unter *in vitro* Bedingungen nicht an Aktin binden, sondern geht allenfalls eine transiente Interaktion mit naszenten Aktin-Polypeptidketten ein, die jedoch nicht ausreicht, nicht gefaltetes Aktin dauerhaft in Lösung zu halten. In vorangegangenen Experimenten wurde die ATPase-Aktivität des aus *E.coli* gereinigten Ssb1p bereits überprüft (Andreas Bracher, persönliche Mitteilung); demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass das hier verwendete Ssb1p funktionell aktiv ist.

Neben Aktin wurden zwei weitere Hauptsubstrate von TRiC, alpha- und beta-Tubulin, mittels der hier entwickelten *in vitro* Rekonstitutionsexperimente zur Faltungsanalyse von Substraten untersucht. Die Gegenwart von sowohl TRiC als auch GimC führten zu einer beträchtlichen Zunahme des löslichen Anteils beider *in vitro* synthetisierter

Substrate, wobei GimC einen größeren Effekt auf die Löslichkeit von beta-Tubulin hatte (Abb. 3.37). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass GimC eine höhere Affinität zu beta-Tubulin besitzt, wenn auch bislang keine Daten vorliegen, die einen Unterschied zwischen alpha- und beta-Tubulin bezüglich der Bindungseigenschaften gegenüber GimC direkt belegen. Für die nähere Analyse des Faltungszustands der *in vitro* synthetisierten Tubuline lagen zum Abschluss dieser Arbeit noch keine geeigneten Bindungsstudien vor. Analog zum DNaseI-Aktin Bindungsexperiment können hierfür Interaktionspartner von alpha- bzw. beta-Tubulin herangezogen werden, die spezifisch an das native Substrat binden. Hierfür kommen z.B. Kofaktoren in Betracht, die im Anschluss an die TRiC-vermittelte Faltung alpha- bzw. beta-Tubulin binden und an der Dimerisierungsreaktion beteiligt sind (siehe Einleitung, 1.3.1.1.). Für die in höheren Eukaryoten bereits gut beschriebenen Kofaktoren (A-E) konnten in Hefe potentielle Funktionshomologe gefunden werden. So bindet beispielsweise Alf1p (Kofaktor B-Homolog) an alpha-Tubulin (Feierbach *et al.*, 1999) und Rbl2p (Kofaktor A-Homolog) an beta-Tubulin (Tian *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 2000). Beide Tubulin-Kofaktoren, Alf1p und Rbl2p, wurden rekombinant exprimiert, an CnBr-Sepharose immobilisiert und in Bindungsexperimenten mit alpha- bzw. beta-Tubulin untersucht. Allerdings konnten unter diesen Bedingungen im Western-Blot bislang keine spezifischen Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass durch die Kopplung der rekombinanten Kofaktoren an die CnBr-Matrix die Interaktion mit den Tubulin-Bindepartnern womöglich beeinträchtigt ist. Zur Optimierung der Bindungsexperimente könnten daher Verbindungssequenzen zwischen Kofaktor und Matrix inseriert werden (z.B. HA-Epitop), wodurch vermutlich eine höhere sterische Flexibilität erreicht und damit die Bindung an die Tubuline begünstigt wird. Alternativ könnten nicht-immobilisierte Kofaktoren verwendet werden und im Anschluss an die Tubulin-Bindung mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert werden.

#### **4.2.2. Anwendung von *in vitro* Faltungstests zur Validierung potentieller TRiC Substrate**

Das Substratspektrum von TRiC ist noch nicht vollständig erfasst. Während das bakterielle Homolog GroEL bevorzugt an der Faltung von Proteinen mit so genannten  $\beta\alpha$ -barrel Domänen beteiligt ist (Houry *et al.*, 1999; Kerner *et al.*, 2005; s. auch 1.2.2.), konnten für TRiC Substrate bislang keine Substrat-spezifischen Sekundärstruktur-Motive identifiziert werden. Allerdings ist vielen Substraten gemein, dass sie einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern aufweisen, deren Faltung im Vergleich zur  $\alpha$ -Helix-Ausbildung langsamer ist und die daher bei der Substraterkennung eine Rolle spielen könnten (Spiess und Frydman, 2003). Dies trifft auch für die WD40-Motiv Klasse der *WD-repeat* Proteine zu, deren Propellerstruktur maßgeblich aus  $\beta$ -Faltblättern besteht (Abb. 1.6). Mitglieder dieser Motivklasse wurden erstmalig innerhalb großangelegter massenspektrometrischer Studien in Hefe mit TRiC assoziiert vorgefunden (Ho *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002). Die im

Anschluss durchgeführten Ko-Immünpräzipitationen ließen vermuten, dass es sich bei einigen dieser *WD-repeat* Proteine tatsächlich um TRiC Substrate handelt (Camasses *et al.*, 2003; Siegers *et al.*, 2003). Für den APC/C Rekrutierungsfaktor Cdc20p (Camasses *et al.*, 2003) und die Protein-Phosphatase 2A Komplexuntereinheit Cdc55p (Siegers *et al.*, 2003), beides *WD-repeat* Proteine, konnte anhand funktioneller Tests *in vitro* bzw. *in vivo* gezeigt werden, dass für die Aktivität dieser Proteine funktionelles TRiC benötigt wird. Diese Daten legten nahe, dass der Chaperonin-Komplex unmittelbar an der Faltung von Cdc20p und Cdc55p beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde die TRiC-vermittelte *de novo* Faltung von *WD-repeat* Proteinen mittels *in vitro* Faltungsexperimenten direkt studiert. Hierzu wurden analog zur Faltungsanalyse von Aktin gereinigte Chaperone verwendet und die Faltung *in vitro* synthetisierter *WD-repeat* Polypeptide anhand deren Löslichkeit und deren Bindung an Interaktionspartner untersucht. Für die Bindungsexperimente mit Cdc20p, Cdc55p und Pex7p wurden jeweils korrespondierende Interaktionspartner kloniert, rekombinant exprimiert, gereinigt und immobilisiert (s. 3.2.3.2.). Neben TRiC wurde für die Faltungsanalyse auch der Einfluss des Hsp70 Chaperons Ssb1p untersucht, da *in vivo* Studien zuvor bereits gezeigt hatten, dass TRiC bei der Faltung von *WD-repeat* Proteinen präferenziell nicht mit GimC, sondern mit Ssb1/2p kooperiert (Siegers *et al.*, 2003). Zu diesem Zweck wurde Ssb1p rekombinant exprimiert und gereinigt (s. 3.2.1.2.).

#### 4.2.2.1. *De novo* Faltung von Cdc20p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb1p

In Abwesenheit eukaryotischer Faktoren bzw. eukaryotischer Chaperone lag *in vitro* synthetisiertes Cdc20p nahezu vollständig in unlöslicher Form vor (Abb. 3.37). Die Gegenwart eukaryotischer Faktoren durch die Verwendung von Retikulozyten Lysat (Abb. 3.37) oder die Zugabe von gereinigtem Ssb1p bzw. TRiC (Abb. 3.42) zum Translationsansatz verhinderten dagegen weitgehend die Aggregation und Präzipitation des *in vitro* synthetisierten Polypeptids. Ähnlich der *de novo* Aktin-Faltung in Gegenwart von TRiC und GimC ließ sich auch durch Kombination von TRiC mit Ssb1p für Cdc20p eine zusätzliche Steigerung der Löslichkeit beobachten. Neben der Löslichkeit wurde auch direkt der Faltungszustand von Cdc20p analysiert. Hierzu wurde dessen Bindung an ein APC/C Substrat, die Proteinkinase Hsl1p, untersucht. Für das Bindeexperiment wurde ein rekombinantes Polypeptid, 6His-`Hsl1p´, verwendet, welches die für die Rekrutierung essentielle D-Box enthält (s. 3.2.3.; 3.2.3.2.). Zugabe von TRiC bewirkte, dass 15-20% von Cdc20p an 6His-`Hsl1p´ gebunden hatte (bezogen auf die Gesamtmenge an *in vitro* synthetisiertem Cdc20p; s. Abb. 3.44). Folglich lag ungefähr bei einem Drittel der löslichen Fraktion Cdc20p in seinem nativen Faltungszustand vor. Dagegen führte Zugabe von Ssb1p nicht zur Bindung von Cdc20p an 6His-`Hsl1p´.

Anhand dieses Rekonstitutionsexperiments ließ sich direkt demonstrieren, dass TRiC für die Faltung von Cdc20p benötigt wird und zumindest *in vitro* hierfür auch ausreichend ist. Ssb1p hat zwar einen Einfluss auf die Löslichkeit von Cdc20p, vermag allein jedoch die Faltung des *in vitro* synthetisierten Polypeptids nicht zu begünstigen.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Ssb1/2p womöglich eine ähnliche Rolle wie GimC in der TRiC-vermittelten Faltung spielt und durch Bindung an Substrate deren Aggregation verhindert und die Rekrutierung zu TRiC optimiert. Für diese Hypothese spricht auch der Befund, dass GimC *in vivo* das Fehlen von Ssb1p und Ssb2p partiell zu supprimieren vermag (Siegers *et al.*, 2003). Weshalb Cdc20p (und andere *WD-repeat* Proteine) jedoch präferenziell mit Ssb1/2p statt mit GimC interagiert, bleibt bislang ungeklärt.

Die Tatsache, dass in Gegenwart von gereinigtem TRiC der Anteil an 6His-<sup>6</sup>Hsl1p-gebundenem Cdc20p (ca. 1/3 bezüglich der Menge an löslichen, d.h. verfügbaren Cdc20p) deutlich höher war als der Anteil an DNaseI-gebundenem Aktin (ca. 1/8 bezüglich der Menge an löslichen Aktins), könnte auf die spontane Polymerisation von Aktinmonomeren zurückzuführen sein (siehe Seite 129). Andere Aspekte, wodurch sich beide Faltungstests außerdem unterscheiden, z.B. verschiedene Affinitätskonstanten der Substrate zu den jeweiligen Interaktionspartnern, könnten hier aber ebenso eine Rolle spielen. Das hier verwendete Transkriptions-/Translationssystem enthält allerdings auch substantielle Mengen bakterieller Chaperone (Angaben des Herstellers, Roche; siehe auch Abb.3.36), die präferenziell an nicht-gefaltete Polypeptidketten binden (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Diese unspezifischen Bindungen könnten einen Teil des *in vitro* synthetisierten Polypeptids in Lösung halten und somit seine korrekte Faltung und anschließende Bindung an den Interaktionspartner verhindern. Weshalb Ssb1p einen deutlich geringeren Einfluss auf die Löslichkeit von Cdc20p zeigte als GimC bezüglich Aktin ist nicht direkt ersichtlich, da beide Chaperone in gleichen Konzentrationen (ca. 10 µM) und damit im Überschuss gegenüber dem *in vitro* synthetisierten Substrat vorlagen. Allerdings muss aber auch berücksichtigt werden, dass sich Ssb1p und GimC allein strukturell (Monomer versus oligomerer Komplex) erheblich voneinander unterscheiden und gegebenenfalls auch andere Substratbindungseigenschaften aufweisen, was sich auch auf die Löslichkeit der gebundenen Substrate auswirken könnte.

#### 4.2.2.2. Löslichkeit von Cdc55p und Pex7p in Abhängigkeit von TRiC und Ssb

Neben Cdc20p wurden zwei weitere *WD-repeat* Proteine, Cdc55p und Pex7p, mittels des hier entwickelten *de novo* Faltungstests analysiert. Cdc55p ist Bestandteil eines trimeren Protein-Phosphatase 2A Komplexes, der sich aus einer katalytischen Untereinheit (Pph21p bzw. Pph22p) und zwei regulatorischen Untereinheiten (Cdc55p und Tpd3p) zusammensetzt (Jiang *et al.*, 1999). Pex7p ist ein löslicher Peroxisomen-Importrezeptor, der Proteine mit einer C-terminalen, peroxisomalen Erkennungssequenz (PTS2, *peroxisomal targeting sequence 2*) wie z.B. Pot1p, eine Thiolase, im Zytosol rekrutiert und deren Import in Peroxisomen vermittelt (Rehling *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996).

Untersuchungen mittels des prokaryotischen *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems ergaben, dass beide *WD-repeat* Proteine in Abwesenheit eukaryotischer Faktoren bzw. Chaperone (TRiC, Ssb1p) ähnlich wie Cdc20p vornehmlich unlöslich sind

(Abb. 3.39; Abb. 3.46). Gegenwart von gereinigtem Ssb1p oder TRiC bewirkte dagegen eine merkliche bzw. ausgeprägte Zunahme von löslichem Cdc55p (Abb. 3.46 A) und Pex7p (Abb. 3.46 B). Die Kombination beider Chaperone zeigte hier allerdings nur tendenziell einen Anstieg in der Substrat-Löslichkeit. Zusammen lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass Anwesenheit von gereinigtem TRiC im prokaryotischen Transkriptions-/Translationssystem die Aggregation von Cdc55p und Pex7p verhindert und daher vermutlich wie auch bei Cdc20p direkt an deren Faltung beteiligt ist. Ebenso deuten diese Daten auf eine (indirekte) Beteiligung von Ssb1p an der Faltung von Cdc55p und Pex7p hin, wie sie für Cdc20p bereits diskutiert worden ist (siehe Kapitel 4.2.2.1), wenngleich auch bei diesen Substraten der Unterschied zur Kontrolle ohne Ssb1p nicht so deutlich ausgeprägt ist. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass der lösliche Anteil in Abwesenheit eukaryotischer Chaperone generell für Cdc55p und Pex7p reproduzierbar höher war (17% bzw. 26% gegenüber 13% Cdc20p). Demnach scheinen sich die drei *WD-repeat* Proteine bezüglich ihres Aggregationsverhaltens von einander zu unterscheiden. Dies lässt sich vermutlich auf unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen zurückführen, da die drei Proteine mit Ausnahme des *WD-repeat* Motivs keine strukturellen Gemeinsamkeiten aufweisen. Je größer der Anteil an nicht-löslichem Substrat in Abwesenheit zusätzlicher Faktoren ist, desto sensibler verhält sich der Versuch bezüglich der Reaktion zugefügter Faktoren, welche die Löslichkeit beeinflussen. Dieser Umstand mag daher einer der Gründe gewesen sein, weshalb sich der Ssb1p-vermittelte Löslichkeitseffekt bei Cdc55p und Pex7p weniger deutlich abgezeichnet hatte.

Um die *de novo* Faltung beider *WD-repeat* Proteine direkt zu untersuchen, wurden Faltungstests analog zu Cdc20p entwickelt. Hierzu wurde im Anschluss an die *in vitro* Synthese mittels des prokaryotischen Transkriptions-/Translationssystem in Gegenwart von gereinigtem Ssb1p und/oder TRiC die lösliche Fraktion mit rekombinantem, immobilisiertem Interaktionspartner (6His-Tpd3p für Cdc55p; Pot1p-6His für Pex7p) inkubiert. Eine signifikante Bindung an den jeweiligen Interaktionspartner konnte allerdings für keines der beiden *WD-repeat* Proteine unter diesen Bedingungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat war insofern überraschend, da sowohl endogenes Cdc55p als auch endogenes Pex7p in Bindungsexperimenten mit Hefelysat an rekombinantes 6His-Tpd3p bzw. Pot1p-6His effizient binden konnte (Abb. 3.41); dies schließt die Möglichkeit aus, dass die für die Interaktion relevanten Bereiche der beiden aus *E. coli* gereinigten Interaktionspartner (6His-Tpd3p, Pot1p-6His) nicht in ihrem nativen Faltungszustand vorliegen. Vielmehr scheinen für die ausbleibende Interaktion von *in vitro* synthetisiertem Cdc55p und Pex7p mit ihren korrespondierenden Partnern unter diesen experimentellen Bedingungen (prokaryotisches Translationssystem, gereinigte eukaryotische Chaperone) noch andere Faktoren in Betracht zu kommen. So konnte für *in vitro* synthetisiertes Cdc55p mittels Retikulozyten Lysat durchaus eine Bindung an 6His-Tpd3p beobachtet werden (Abb. 3.43). Dieses Ergebnis legt nahe, dass in dem eukaryotischen Transkriptions-/Translationssystem weitere Faktoren vorhanden sind, welche entweder

die Faltung von Cdc55p oder dessen Interaktion mit 6His-Tpd3p begünstigen. So ist beispielsweise bislang nicht bekannt, ob die beiden regulatorischen Untereinheiten des Protein-Phosphatase 2A Komplexes, Cdc55p und Tpd3p, in Abwesenheit der katalytischen Untereinheit Pph21p bzw. Pph22p direkt miteinander interagieren können. Es ist also denkbar, dass eine stabile Bindung nur in Form des trimeren Komplexes stattfindet. Bei der Verwendung von Retikulozyten Lysat für die *in vitro* Synthese von Cdc55p könnte die fehlende katalytische Hefe-Untereinheit (Pph21p bzw. Pph22p) durch ein orthologes Protein aus dem Retikulozyten Lysat substituiert werden und damit eine effizientere Bindung von Cdc55p an 6His-Tpd3p in Form eines trimeren Komplexes ermöglichen. Tatsächlich sind die Komponenten des eukaryotischen Protein-Phosphatase 2A Komplexes hochkonserviert und das humane Proteinhomolog zu *S. cerevisiae* Pph21p bzw. Pph22p weist eine Sequenzidentität von ca. 75% auf (Roopchand *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu verfügt das prokaryotische Translationssystem nicht über ein Pph21p-homologes Protein, was die fehlende Interaktion von *in vitro* synthetisiertem Cdc55p mit 6His-Tpd3p unter diesen Bedingungen erklären könnte.

Ebensowenig ist bekannt, ob der Peroxisomen-Importrezeptor Pex7p weitere Komponenten für eine stabile Interaktion mit Substraten wie Pot1p-6His benötigt. Folglich wäre es ebenso denkbar, dass für die Interaktion von rekombinantem Pot1p-6His mit *in vitro* synthetisiertem Pex7p neben eukaryotischen Chaperonen auch hier weitere eukaryotische Komponenten involviert sein könnten. Dieser putative Faktor kann durch Verwendung von Retikulozyten Lysat als *in vitro* Translationssystem offensichtlich nicht substituiert werden, da auch unter diesen Bedingungen keine effiziente Bindung zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Unter der Annahme, dass ein oder mehrere solcher Faktoren für die Bindung mit Pex7p und Peroxisomen-Importsubstraten benötigt werden, erscheint es plausibel, dass deren zelluläre Menge mit der Gegenwart funktioneller Peroxisomen korreliert. Untersuchungen haben gezeigt, dass in Gegenwart bestimmter Kohlenstoffquellen wie Fettsäuren und Methanol die Peroxisomenproliferation in Hefezellen rasch induziert wird. Umgekehrt war ein Rückgang dieser Zellorganellen in Hefezellen zu beobachten, wenn Glukose als einzige Kohlenstoffquelle im Medium vorhanden war (Purdue und Lazarow, 2001). Als Vorläuferzellen von Erythrozyten, deren Energiegewinnung ausschließlich auf Glykolyse beruht, verfügen Retikulozyten nur über eine reduzierte Zahl von Peroxisomen. Folglich könnte bei der Verwendung von Retikulozyten Lysat als eukaryotisches *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem keine oder nur kaum peroxisomale Proteine substituiert werden, die eine Pex7p-Pot1p Interaktion womöglich begünstigen.

Als Alternative zum Interaktionspartner Pot1p könnten auch Pex18p oder Pex21p in *in vitro* Rekonstitutionsexperimenten zur Faltungsanalyse von Pex7p untersucht werden. Beide Proteine interagieren mit Pex7p, sind zueinander schwach homolog und haben innerhalb des PTS2-vermittelten Imports eine partiell redundante Funktion. In Abwesenheit von Pex18p und Pex21p findet kein Import mehr statt (Purdue *et al.*, 1998). Die Interaktion

beider Proteine mit Pex7p könnte womöglich ausreichend stabil sein, um als Indikator für die Faltung von *in vitro* synthetisiertem Pex7p zu dienen. Interessanterweise assoziieren Pex18p und Pex21p *in vivo* auch mit Import-Substraten wie beispielsweise mit Pot1p, wobei die Assoziation von der PTS2-Sequenz abhängig ist (Purdue *et al.*, 1998). Allerdings erscheint es eher unwahrscheinlich, dass Pex18p und Pex21p direkt mit Import-Substraten interagieren und die Bindung von Pot1p an Pex7p kontrollieren (siehe oben). Letzteres konnte anhand von Yeast-Two-Hybrid Interaktionen mit Pex7p und Pot1p gezeigt werden, die auch in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p stattfinden (Purdue *et al.*, 1998). Soweit weitere Faktoren für die Pex7p-Pot1p-Interaktion benötigt werden, müssen hierfür also andere Faktoren in Betracht kommen.

Da eine Substratvalidierung mit Hilfe dieser *in vitro* Faltungstests für Cdc55p und Pex7p unter diesen Bedingungen schwer möglich war, wurden ergänzend Bindungstests mit Zellextrakten von *tcp1-2* und *tcp1-3* Mutanten herangezogen (Abb. 3.47; s. 3.2.3.3.3.). Zusätzlich wurde ein Hefestamm untersucht, der neben der *tcp1-2* Mutation eine Deletion sowohl für *SSB1* als auch für *SSB2* aufweist. Bindungsstudien mit endogenen *WD-repeat* Proteinen demonstrierten, dass Cdc55p und Pex7p in Stämmen mit TRiC-Mutationen eine geringere Bindungsaffinität zu rekombinantem 6His-Tpd3p bzw. Pot1p-6His zeigten. Für Cdc55p ließ sich eine direkte Korrelation zwischen dem Phänotyp der Mutante und dem Ausmaß der verminderten Tpd3p-Interaktion feststellen: Während für die *tcp1-2* Einfachmutante, die nur einen geringen Wachstumsdefekt zeigt (Ursic *et al.*, 1994), keine Veränderung der Bindungsaffinität im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten war, zeigte die *tcp1-2 Δssb1 Δssb2* Dreifachmutante eine signifikante Reduktion für die Bindung von Cdc55p an rekombinantes 6His-Tpd3p. Demzufolge ist in der Dreifachmutante eine effiziente TRiC-vermittelte Faltung nicht mehr gewährleistet, und *in vivo* führt dies unmittelbar zur Akkumulation von nicht korrekt-gefaltetem Cdc55p. Für die *Δssb1 Δssb2* Doppelmutante wurde bereits zuvor gezeigt, dass sie keinen Einfluss auf die endogene Cdc55p-abhängige Phosphataseaktivität hat (Siegers *et al.*, 2003), daher wurde sie hier nicht gesondert untersucht (der Grund hierfür liegt in der partiellen *Δssb1 Δssb2* Komplementierung durch GimC). Noch stärker war die Tpd3p-Bindung von endogenem Cdc55p in der *tcp1-3* Einfachmutante reduziert. Diese Mutante besitzt im Vergleich zu *tcp1-2* auch ausgeprägtere Zytoskelettdefekte (Ursic *et al.*, 1994), was vermuten lässt, dass aufgrund eines stärkeren Faltungsdefekts von TRiC hier vermehrt Aktin und Tubuline fehlgefaltet akkumulieren. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl TRiC als auch Ssb an der *de novo* Faltung von Cdc55p und Pex7p unmittelbar beteiligt sind.

### 4.3. In vivo Faltungskinetiken mit beta-Tubulin

Neben *in vitro* Faltungsstudien, anhand derer sich mittels gereinigter Komponenten direkt die Beteiligung verschiedener Chaperone bei der Faltung putativer Substrate analysieren lassen, können *in vivo* Untersuchungen Aufschluss über den Faltungsablauf, insbeson-

dere über dessen Kinetik, geben. So konnte für das TRiC Substrat Aktin bereits gezeigt werden, dass die Faltung in *S. cerevisiae* innerhalb kurzer Zeit (Halbwertszeit ca. 1-2 min) abgeschlossen ist und daher vermutlich nur wenige Faltungszyklen benötigt (Abb. 3.48.; Siegers *et al.*, 1999). Für andere Substrate von TRiC, wie beispielsweise Tubuline, lagen solche Kenntnisse nicht vor. Diese Substratklasse ist vor allem deshalb von Interesse, da sich alpha- und beta-Tubulin in ihrer Faltung durch die Beteiligung weiterer, so genannter Tubulin-Kofaktoren, die zur Dimerisierung benötigt werden (siehe hierzu 1.3.1.1), von Aktin deutlich unterscheiden.

Für die Bestimmung der *in vivo* Faltungskinetik von beta-Tubulin wurde der Umstand zu Nutze gemacht, dass beta-Tubulin nur in seinem nativen Faltungszustand an alpha-Tubulin binden kann, analog der Bindung von Aktin an DNaseI. Zur Bestimmung der beta-Tubulin Faltungskinetik wurde HA-Epitop-markiertes alpha-Tubulin verwendet, das als C-terminale Genfusion (*TUB1-3HA*) extrachromosomal exprimiert wurde. Dies ermöglichte die effiziente Immunpräzipitation von HA-markiertem alpha-Tubulin, da die Bindung des HA-Antikörpers an sein Epitop unabhängig vom Faltungszustand von alpha-Tubulin erfolgt. Hierdurch ließ sich *de novo* synthetisiertes, natives beta-Tubulin koimmunpräzipitieren (Abb. 3.49). Die Daten zeigen, dass im Vergleich zur Aktinfaltung die Faltung von beta-Tubulin ungefähr den doppelten Zeitraum benötigt. Dies könnte daraufhin deuten, dass für beta-Tubulin eine größere Anzahl von Faltungszyklen benötigt wird. Alternativ könnte aber auch das Zusammenspiel der Tubulin-Kofaktoren im Anschluss an die TRiC-vermittelte Faltung die Dimerisierung von alpha- und beta-Tubulin zeitlich limitieren.

Detailliertere Einblicke in die beta-Tubulinfaltungskinetik könnte die Untersuchung von Mutanten Tubulin-Kofaktoren kodierender Gene, wie z.B von *RBL2*, *ALF1* oder *PAC2* (siehe hierzu auch Einleitung, Abb. 1.8) ergeben, die sich mit der hier entwickelten Methode analysieren lassen. Der Vorteil in der Verwendung HA-Epitop-modifizierten alpha-Tubulins liegt vor allem darin, dass das HA-Epitop unstrukturiert ist und somit alpha-Tubulin auch zu Zeitpunkten, an denen es seinen nativen Faltungszustand noch nicht erreicht hat, effizient immunpräzipitiert werden kann. Dies wäre unter Verwendung von z.B. alpha-Tubulin-spezifischen Antikörpern nicht gegeben. Zwar scheint der C-terminale Epitop-*tag* mit der essentiellen Funktion assemblierter Mikrotubuli zu interferieren (C-terminale, chromosomale Genfusionen von *TUB1* sind nicht lebensfähig; Daten nicht gezeigt), allerdings ist dies bei der hier verwendeten Methode nicht von Bedeutung, da die Hefezellen zusätzlich über eine Wildtyp-Kopie von *TUB1* verfügen. Zudem befindet sich der C-Terminus von gefaltetem alpha-Tubulin ausserhalb des Bereichs, der an der Dimerisierung mit beta-Tubulin beteiligt ist (Nogales, 1998), weshalb letztlich auch ausgeschlossen werden kann, dass das HA-Epitop die Faltungskinetiken von beta-Tubulin beeinflusst.

## 4.4. Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Reinigungsprotokoll entwickelt werden, mit dem sich TRiC aus Hefe effizient für *in vitro* Studien reinigen lässt. Die Funktion des Chaperonins wurde in einem isolierten System mit verschiedenen, bereits bekannten Substraten von TRiC sowie in Kooperation mit anderen, gereinigten eukaryotischen Chaperonen überprüft. Aufgrund der gut erforschten Genetik von *S. cerevisiae* können nun im Anschluss analog zum Wildtyp-Chaperonin Mutanten von TRiC generiert, gereinigt und in *in vitro* Studien charakterisiert werden. Viele der bereits publizierten, gut charakterisierten Mutanten zeigen vornehmlich Aminosäureaustausche im ATP-Bindebereich, d.h. in der äquatorialen Domäne. Durch zielgerichtete Mutagenese lassen sich aber auch andere Domänen (z.B. apikale Domäne) des Chaperonins verändern, von denen angenommen wird, dass sie bestimmte Funktionen wie beispielsweise die Substratbindung oder eventuelle Interaktionen mit anderen Chaperonen (GimC, Ssb) vermitteln. Darüber hinaus diene die Strategie zur Reinigung von TRiC als Basis für die Etablierung eines Reinigungsprotokolls von GimC aus Hefe. Die *in vitro* Analyse verschiedener Chaperon-Mutanten (GimC, TRiC) wird derzeit in dieser Arbeitsgruppe intensiv verfolgt. Schließlich ermöglicht das Reinigungsprotokoll auch die Gewinnung ausreichender Mengen an gereinigtem Chaperonin zur Kristallisierung des Komplexes. Die Kenntnis der genauen Struktur von TRiC, die sich mittels Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen gewinnen lassen könnte, würde die funktionelle Charakterisierung des Chaperonins erheblich erleichtern.

Neben funktionellen Untersuchungen zum Faltungsmechanismus und Substratspezifität von TRiC eignet sich der in dieser Arbeit verfolgte methodische Ansatz auch zur Validierung potentieller Substrate, was sich am Beispiel des *WD-repeat* Proteins Cdc20p demonstrieren ließ. Die korrekte *de novo* Faltung eines beliebigen Substrats in Anwesenheit gereinigter Chaperone lässt sich folglich direkt über dessen Bindung an einen bekannten, gereinigten Interaktionspartner überprüfen. Die einzige Voraussetzung hierfür ist, dass für die Interaktion mit dem Partnerprotein keine weiteren Faktoren benötigt werden. Diese Analyse putativer TRiC Substrate weist gegenüber Ko-Immunpräzipitation den Vorteil auf, dass nicht nur die Interaktion mit dem Chaperonin, sondern direkt dessen Auswirkung auf die Substratfaltung analysiert werden kann. Da viele Substrate von Chaperonen keine enzymatische Aktivität besitzen, können hierdurch schließlich auch enzymatische Tests zur funktionellen Analyse des gefalteten Substrats umgangen werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde eine Methode zur Analyse der Faltung von beta-Tubulin *in vivo* entwickelt. Hiermit lassen sich Faltungskinetiken bestimmen, die Aufschluss über die zeitliche Assoziation von Tubulinen mit Komponenten des Chaperon-Netzwerks sowie an der Dimerisierung beteiligter Kofaktoren geben. Ebenso lässt sich durch Verwendung von Hefe-Mutanten das Zusammenspiel von Chaperonen und Kofaktoren detaillierter untersuchen.

---

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Agashe, V. R., S. Guha, H. C. Chang, P. Genevoux, M. Hayer-Hartl, M. Stemp, C. Georgopoulos, F. U. Hartl and J. M. Barral (2004). Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell* **117**(2): 199-209.
- Agashe, V. R. and F. U. Hartl (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* **11**(1): 15-25.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96): 223-30.
- Barral, J. M., S. A. Broadley, G. Schaffar and F. U. Hartl (2004). Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 17-29.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blond-Elguindi, S., A. M. Fourie, J. F. Sambrook and M. J. Gething (1993). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem* **268**(17): 12730-5.
- Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich and P. B. Sigler (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**(6498): 578-86.
- Brinker, A., G. Pfeifer, M. J. Kerner, D. J. Naylor, F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl (2001). Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding. *Cell* **107**(2): 223-33.
- Buhner, M. and H. Sund (1969). Yeast alcohol dehydrogenase: SH groups, disulfide groups, quaternary structure, and reactivation by reductive cleavage of disulfide groups. *Eur J Biochem* **11**(1): 73-9.
- Bukau, B., E. Deuerling, C. Pfund and E. A. Craig (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**(2): 119-22.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**(3): 351-66.
- Burton, J. L. and M. J. Solomon (2000). Hsl1p, a Swe1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* **20**(13): 4614-25.
- Burton, J. L. and M. J. Solomon (2001). D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* **15**(18): 2381-95.
- Camasses, A., A. Bogdanova, A. Shevchenko and W. Zachariae (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* **12**(1): 87-100.
- Cayley, S., B. A. Lewis, H. J. Guttman and M. T. Record, Jr. (1991). Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions in vivo. *J Mol Biol* **222**(2): 281-300.
- Chan, R. K. and C. A. Otte (1982). Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol* **2**(1): 11-20.
- Chen, X., D. S. Sullivan and T. C. Huffaker (1994). Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9111-5.
- Cohen, P., D. L. Schelling and M. J. Stark (1989). Remarkable similarities between yeast and mammalian protein phosphatases. *FEBS Lett* **250**(2): 601-6.
- Craig, E. A. (2003). Eukaryotic chaperonins: lubricating the folding of WD-repeat proteins. *Curr Biol* **13**(23): R904-5.
- Craig, E. A., H. C. Eisenman and H. A. Hundley (2003). Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defense against protein misfolding? *Curr Opin Microbiol* **6**(2): 157-62.
- Cummings, C. J., M. A. Mancini, B. Antalffy, D. B. DeFranco, H. T. Orr and H. Y. Zoghbi (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* **19**(2): 148-54.
- Cyr, D. M., T. Langer and M. G. Douglas (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* **19**(4): 176-81.

- DeBurman, S. K., G. J. Raymond, B. Caughey and S. Lindquist (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13938-43.
- Dinner, A. R., A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson and M. Karplus (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* **25**(7): 331-9.
- Ditzel, L., J. Lowe, D. Stock, K. O. Stetter, H. Huber, R. Huber and S. Steinbacher (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* **93**(1): 125-38.
- Dobson, C. M. and M. Karplus (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* **9**(1): 92-101.
- Ellis, R. J. (2001a). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **11**(1): 114-9.
- Ellis, R. J. (2001b). Molecular chaperones: inside and outside the Anfinsen cage. *Curr Biol* **11**(24): R1038-40.
- Ellis, R. J. and F. U. Hartl (1996). Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *Faseb J* **10**(1): 20-6.
- Ellis, R. J. and F. U. Hartl (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**(1): 102-10.
- Ewalt, K. L., J. P. Hendrick, W. A. Houry and F. U. Hartl (1997). In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**(3): 491-500.
- Farr, G. W., E. C. Scharl, R. J. Schumacher, S. Sondek and A. L. Horwich (1997). Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell* **89**(6): 927-37.
- Fayet, O., T. Ziegelhoffer and C. Georgopoulos (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**(3): 1379-85.
- Feldman, D. E., C. Spiess, D. E. Howard and J. Frydman (2003). Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding. *Mol Cell* **12**(5): 1213-24.
- Feldman, D. E., V. Thulasiraman, R. G. Ferreyra and J. Frydman (1999). Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol Cell* **4**(6): 1051-61.
- Fenton, W. A. and A. L. Horwich (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci* **6**(4): 743-60.
- Fenton, W. A., Y. Kashi, K. Furtak and A. L. Horwich (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**(6498): 614-9.
- Fenton, W. A., J. S. Weissman and A. L. Horwich (1996). Putting a lid on protein folding: structure and function of the co-chaperonin, GroES. *Chem Biol* **3**(3): 157-61.
- Ferreyra, R. G. and J. Frydman (2000). Purification of the cytosolic chaperonin TRiC from bovine testis. *Methods Mol Biol* **140**: 153-60.
- Figueiredo, L., D. Klunker, D. Ang, D. J. Naylor, M. J. Kerner, C. Georgopoulos, F. U. Hartl and M. Hayer-Hartl (2004). Functional characterization of an archaeal GroEL/GroES chaperonin system: significance of substrate encapsulation. *J Biol Chem* **279**(2): 1090-9.
- Fontalba, A., R. Paciucci, J. Avila and J. C. Zabala (1993). Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis. *J Cell Sci* **106** ( Pt 2): 627-32.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603-47.
- Frydman, J., H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and F. U. Hartl (1999). Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase. *Nat Struct Biol* **6**(7): 697-705.
- Frydman, J. and F. U. Hartl (1996). Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* **272**(5267): 1497-502.
- Frydman, J., E. Nimmesgern, H. Erdjument-Bromage, J. S. Wall, P. Tempst and F. U. Hartl (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *Embo J* **11**(13): 4767-78.
- Frydman, J., E. Nimmesgern, K. Ohtsuka and F. U. Hartl (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**(6485): 111-7.

- Gao, Y., J. O. Thomas, R. L. Chow, G. H. Lee and N. J. Cowan (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* **69**(6): 1043-50.
- Gao, Y., I. E. Vainberg, R. L. Chow and N. J. Cowan (1993). Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of alpha- and beta-tubulin. *Mol Cell Biol* **13**(4): 2478-85.
- Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**(6868): 141-7.
- Geissler, S., K. Siegers and E. Schiebel (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *Embo J* **17**(4): 952-66.
- Gething, M. J., S. Blond-Elguindi, J. Buchner, A. Fourie, G. Knarr, S. Modrow, L. Nanu, M. Segal and J. Sambrook (1995). Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 417-28.
- Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**(6305): 132-8.
- Goffeau, A. *et al.* (1997) The Yeast Genome Directory. *Nature* **387**, (suppl.), 1-105
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**(6583): 571-9.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**(5561): 1852-8.
- Hayer-Hartl, M. K., K. L. Ewalt and F. U. Hartl (1999). On the role of symmetrical and asymmetrical chaperonin complexes in assisted protein folding. *Biol Chem* **380**(5): 531-40.
- Hilioti, Z., Y. S. Chung, Y. Mochizuki, C. F. Hardy and O. Cohen-Fix (2001). The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Curr Biol* **11**(17): 1347-52.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**(6868): 180-3.
- Hohfeld, J. and S. Jentsch (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *Embo J* **16**(20): 6209-16.
- Horwich, A. L. and J. S. Weissman (1997). Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. *Cell* **89**(4): 499-510.
- Houry, W. A., D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich and F. U. Hartl (1999). Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**(6758): 147-54.
- Iizuka, R., S. So, T. Inobe, T. Yoshida, T. Zako, K. Kuwajima and M. Yohda (2004). Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. *J Biol Chem* **279**(18): 18834-9.
- Jiang, Y. and J. R. Broach (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo J* **18**(10): 2782-92.
- Kabani, M., J. M. Beckerich and J. L. Brodsky (2002a). Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4677-89.
- Kabani, M., C. McLellan, D. A. Raynes, V. Guerriero and J. L. Brodsky (2002b). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett* **531**(2): 339-42.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**(6288): 37-44.
- Kafri, G., K. R. Willison and A. Horovitz (2001). Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1. *Protein Sci* **10**(2): 445-9.
- Kashuba, E., K. Pokrovskaja, G. Klein and L. Szekely (1999). Epstein-Barr virus-encoded nuclear protein EBNA-3 interacts with the epsilon-subunit of the T-complex protein 1 chaperonin complex. *J Hum Virol* **2**(1): 33-7.
- Kerner, M. J., D. J. Naylor, Y. Ishihama, T. Maier, H. C. Chang, A. P. Stines, C. Georgopoulos, D. Frishman, M. Hayer-Hartl, M. Mann and F. U. Hartl (2005). Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* **122**(2): 209-20.

- Klumpp, M., W. Baumeister and L. O. Essen (1997). Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. *Cell* **91**(2): 263-70.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth and E. Schiebel (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**(10B): 963-72.
- Kraft, C., H. C. Vodermaier, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber and J. M. Peters (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol Cell* **18**(5): 543-53.
- Kramer, G., T. Rauch, W. Rist, S. Vorderwulbecke, H. Patzelt, A. Schulze-Specking, N. Ban, E. Deuerling and B. Bukau (2002). L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* **419**(6903): 171-4.
- Kubota, H., G. Hynes and K. Willison (1995a). The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* **230**(1): 3-16.
- Kubota, H., G. Hynes and K. Willison (1995b). The eighth Cct gene, Cctq, encoding the theta subunit of the cytosolic chaperonin containing TCP-1. *Gene* **154**(2): 231-6.
- Langer, T., G. Pfeifer, J. Martin, W. Baumeister and F. U. Hartl (1992). Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *Embo J* **11**(13): 4757-65.
- Laskey, R. A., B. M. Honda, A. D. Mills and J. T. Finch (1978a). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**(5679): 416-20.
- Laskey, R. A., B. M. Honda, A. D. Mills, N. R. Morris, A. H. Wyllie, J. E. Mertz, E. M. De Roberts and J. B. Gurdon (1978b). Chromatin assembly and transcription in eggs and oocytes of *Xenopus laevis*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **42 Pt 1**: 171-8.
- Lazarides, E. and U. Lindberg (1974). Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(12): 4742-6.
- Lee, M. J., D. A. Stephenson, M. J. Groves, M. G. Sweeney, M. B. Davis, S. F. An, H. Houlden, M. A. Salih, V. Timmerman, P. de Jonghe, M. Auer-Grumbach, *et al.* (2003). Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct4) gene. *Hum Mol Genet* **12**(15): 1917-25.
- Leroux, M. R., M. Fandrich, D. Klunker, K. Siegers, A. N. Lupas, J. R. Brown, E. Schiebel, C. M. Dobson and F. U. Hartl (1999). MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *Embo J* **18**(23): 6730-43.
- Leroux, M. R. and F. U. Hartl (2000). Protein folding: versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT. *Curr Biol* **10**(7): R260-4.
- Lewis, S. A., G. Tian, I. E. Vainberg and N. J. Cowan (1996). Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* **132**(1-2): 1-4.
- Lewis, V. A., G. M. Hynes, D. Zheng, H. Saibil and K. Willison (1992). T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol. *Nature* **358**(6383): 249-52.
- Li, W. Z., P. Lin, J. Frydman, T. R. Boal, T. S. Cardillo, L. M. Richard, D. Toth, M. A. Lichtman, F. U. Hartl, F. Sherman and *et al.* (1994). Tcp20, a subunit of the eukaryotic TRiC chaperonin from humans and yeast. *J Biol Chem* **269**(28): 18616-22.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**: 1151-91.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**: 631-77.
- Llorca, O., J. Martin-Benito, P. Gomez-Puertas, M. Ritco-Vonsovici, K. R. Willison, J. L. Carrascosa and J. M. Valpuesta (2001a). Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. *J Struct Biol* **135**(2): 205-18.
- Llorca, O., J. Martin-Benito, J. Grantham, M. Ritco-Vonsovici, K. R. Willison, J. L. Carrascosa and J. M. Valpuesta (2001b). The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. *Embo J* **20**(15): 4065-75.

- Llorca, O., J. Martin-Benito, M. Ritco-Vonsovici, J. Grantham, G. M. Hynes, K. R. Willison, J. L. Carrascosa and J. M. Valpuesta (2000). Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *Embo J* **19**(22): 5971-9.
- Llorca, O., E. A. McCormack, G. Hynes, J. Grantham, J. Cordell, J. L. Carrascosa, K. R. Willison, J. J. Fernandez and J. M. Valpuesta (1999). Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. *Nature* **402**(6762): 693-6.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott. *Molecular Cell Biology*. 5<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman and Company, New York, New York: 784-791 (2004)
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen and J. R. Pringle (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10): 953-61.
- Lopez-Fanarraga, M., J. Avila, A. Guasch, M. Coll and J. C. Zabala (2001). Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol* **135**(2): 219-29.
- Manney, T. R., P. Jackson and J. Meade (1983). Two temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with altered expression of mating-type functions. *J Cell Biol* **96**(6): 1592-600.
- Martin, J., S. Geromanos, P. Tempst and F. U. Hartl (1993). Identification of nucleotide-binding regions in the chaperonin proteins GroEL and GroES. *Nature* **366**(6452): 279-82.
- Martin, J. and F. U. Hartl (1997a). Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**(1): 41-52.
- Martin, J. and F. U. Hartl (1997b). The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1107-12.
- Martin-Benito, J., J. Boskovic, P. Gomez-Puertas, J. L. Carrascosa, C. T. Simons, S. A. Lewis, F. Bartolini, N. J. Cowan and J. M. Valpuesta (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *Embo J* **21**(23): 6377-86.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**(6): 670-84.
- Mayhew, M. and F. U. Hartl (1996). Lord of the rings: GroES structure. *Science* **271**(5246): 161-2.
- McCallum, C. D., H. Do, A. E. Johnson and J. Frydman (2000). The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. *J Cell Biol* **149**(3): 591-602.
- McCormack, E. A., O. Llorca, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta and K. R. Willison (2001). Point mutations in a hinge linking the small and large domains of beta-actin result in trapped folding intermediates bound to cytosolic chaperonin CCT. *J Struct Biol* **135**(2): 198-204.
- Melville, M. W., A. J. McClellan, A. S. Meyer, A. Darveau and J. Frydman (2003). The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. *Mol Cell Biol* **23**(9): 3141-51.
- Meyer, A. S., J. R. Gillespie, D. Walther, I. S. Millet, S. Doniach and J. Frydman (2003). Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell* **113**(3): 369-81.
- Minton, A. P. (1983). The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem* **55**(2): 119-40.
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**(24): 3788-96.
- Naylor, D. J. and F. U. Hartl (2001). Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. *Biochem Soc Symp*(68): 45-68.
- Netzer, W. J. and F. U. Hartl (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**(6640): 343-9.
- Netzer, W. J. and F. U. Hartl (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* **23**(2): 68-73.
- Pande, V. S., A. Grosberg, T. Tanaka and D. S. Rokhsar (1998). Pathways for protein folding: is a new view needed? *Curr Opin Struct Biol* **8**(1): 68-79.

- Pappenberger, G., J. A. Wilsher, S. M. Roe, D. J. Counsell, K. R. Willison and L. H. Pearl (2002). Crystal structure of the CCTgamma apical domain: implications for substrate binding to the eukaryotic cytosolic chaperonin. *J Mol Biol* **318**(5): 1367-79.
- Pfleger, C. M., E. Lee and M. W. Kirschner (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **15**(18): 2396-407.
- Pfund, C., N. Lopez-Hoyo, T. Ziegelhoffer, B. A. Schilke, P. Lopez-Buesa, W. A. Walter, M. Wiedmann and E. A. Craig (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J* **17**(14): 3981-9.
- Purdue, P. E. and P. B. Lazarow (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 701-52.
- Rehling, P., M. Marzioch, F. Niesen, E. Wittke, M. Veenhuis and W. H. Kunau (1996). The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene. *Embo J* **15**(12): 2901-13.
- Roche Diagnostics. Rapid Translation System RTS. Manual. Optimization of solubility and function (3.3.12.)
- Ronne, H., M. Carlberg, G. Z. Hu and J. O. Nehlin (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol Cell Biol* **11**(10): 4876-84.
- Roobol, A. and M. J. Carden (1999). Subunits of the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT do not always behave as components of a uniform hetero-oligomeric particle. *Eur J Cell Biol* **78**(1): 21-32.
- Roopchand, D. E., J. M. Lee, S. Shahinian, D. Paquette, H. Bussey and P. E. Branton (2001). Toxicity of human adenovirus E4orf4 protein in *Saccharomyces cerevisiae* results from interactions with the Cdc55 regulatory B subunit of PP2A. *Oncogene* **20**(38): 5279-90.
- Roseman, A. M., S. Chen, H. White, K. Braig and H. R. Saibil (1996). The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**(2): 241-51.
- Rudiger, S., L. Germeroth, J. Schneider-Mergener and B. Bukau (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J* **16**(7): 1501-7.
- Rudiger, S., M. P. Mayer, J. Schneider-Mergener and B. Bukau (2000). Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch. *J Mol Biol* **304**(3): 245-51.
- Rudiger, S., J. Schneider-Mergener and B. Bukau (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *Embo J* **20**(5): 1042-50.
- Sali, A., E. Shakhnovich and M. Karplus (1994). Kinetics of protein folding. A lattice model study of the requirements for folding to the native state. *J Mol Biol* **235**(5): 1614-36.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Schaffar, G., P. Breuer, R. Boteva, C. Behrends, N. Tzvetkov, N. Strippel, H. Sakahira, K. Siegers, M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* **15**(1): 95-105.
- Schuller, E., T. Gulesserian, R. Seidl, N. Cairns and G. Lube (2001). Brain t-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease. *Life Sci* **69**(3): 263-70.
- Schüller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**(3): 139-60.
- Schultz, C. P. (2000). Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol* **7**(1): 7-10.
- Shomura, Y., Z. Dragovic, H. C. Chang, N. Tzvetkov, J. C. Young, J. L. Brodsky, V. Guerriero, F. U. Hartl and A. Bracher (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell* **17**(3): 367-79.
- Siegers, K., B. Bolter, J. P. Schwarz, U. M. Bottcher, S. Guha and F. U. Hartl (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *Embo J* **22**(19): 5230-40.
- Siegers, K. and E. Schiebel (2000). Purification of GimC from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **140**: 185-93.
- Siegers, K., T. Waldmann, M. R. Leroux, K. Grein, A. Shevchenko, E. Schiebel and F. U. Hartl (1999). Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *Embo J* **18**(1): 75-84.

- Siegert, R., M. R. Leroux, C. Scheufler, F. U. Hartl and I. Moarefi (2000). Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell* **103**(4): 621-32.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**(1): 19-27.
- Simons, C. T., A. Staes, H. Rommelaere, C. Ampe, S. A. Lewis and N. J. Cowan (2004). Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem* **279**(6): 4196-203.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena and E. J. Neer (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**(5): 181-5.
- Sneddon, A. A., P. T. Cohen and M. J. Stark (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *Embo J* **9**(13): 4339-46.
- Sondek, J., A. Bohm, D. G. Lambright, H. E. Hamm and P. B. Sigler (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**(6563): 369-74.
- Soares, H., D. Penque, C. Mouta and C. Rodrigues-Pousada (1994). A *Tetrahymena* orthologue of the mouse chaperonin subunit CCT gamma and its coexpression with tubulin during cilia recovery. *J Biol Chem* **269**(46): 29299-307.
- Sorensen, C. S., C. Lukas, E. R. Kramer, J. M. Peters, J. Bartek and J. Lukas (2000). Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol Cell Biol* **20**(20): 7613-23.
- Soti, C. and P. Csermely (2002a). Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int* **41**(6): 383-9.
- Soti, C. and P. Csermely (2002b). Chaperones come of age. *Cell Stress Chaperones* **7**(2): 186-90.
- Spieß, C., A. S. Meyer, S. Reissmann and J. Frydman (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol* **14**(11): 598-604.
- Srikakulam, R. and D. A. Winkelmann (1999). Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin. *J Biol Chem* **274**(38): 27265-73.
- Stemp, M. J., S. Guha, F. U. Hartl and J. M. Barral (2005). Efficient production of native actin upon translation in a bacterial lysate supplemented with the eukaryotic chaperonin TRiC. *Biol Chem* **386**(8): 753-7.
- Stockel, J. and F. U. Hartl (2001). Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. *J Mol Biol* **313**(4): 861-72.
- Stoldt, V., F. Rademacher, V. Kehren, J. F. Ernst, D. A. Pearce and F. Sherman (1996). Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *Yeast* **12**(6): 523-9.
- Teter, S. A., W. A. Houry, D. Ang, T. Tradler, D. Rockabrand, G. Fischer, P. Blum, C. Georgopoulos and F. U. Hartl (1999). Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**(6): 755-65.
- Thulasiraman, V., C. F. Yang and J. Frydman (1999). In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *Embo J* **18**(1): 85-95.
- Tian, G., I. E. Vainberg, W. D. Tap, S. A. Lewis and N. J. Cowan (1995). Specificity in chaperonin-mediated protein folding. *Nature* **375**(6528): 250-3.
- Todd, M. J., G. H. Lorimer and D. Thirumalai (1996). Chaperonin-facilitated protein folding: optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4030-5.
- Tu, J. and M. Carlson (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **14**(23): 5939-46.
- Ursic, D. and M. R. Culbertson (1991). The yeast homolog to mouse Tcp-1 affects microtubule-mediated processes. *Mol Cell Biol* **11**(5): 2629-40.
- Ursic, D. and M. R. Culbertson (1992). Is yeast TCP1 a chaperonin? *Nature* **356**(6368): 392.
- Ursic, D., J. C. Sedbrook, K. L. Himmel and M. R. Culbertson (1994). The essential yeast Tcp1 protein affects actin and microtubules. *Mol Biol Cell* **5**(10): 1065-80.

- Vainberg, I. E., S. A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. L. Klein and N. J. Cowan (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**(5): 863-73.
- Valpuesta, J. M., J. Martin-Benito, P. Gomez-Puertas, J. L. Carrascosa and K. R. Willison (2002). Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett* **529**(1): 11-6.
- Vinh, D. B. and D. G. Drubin (1994). A yeast TCP-1-like protein is required for actin function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9116-20.
- Virshup, D. M. (2000). Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* **12**(2): 180-5.
- Wach, A. (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**(3): 259-65.
- Wach, A., A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung and P. Philippsen (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(11): 1065-75.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann and P. Philippsen (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(13): 1793-808.
- Waldmann, T., E. Nimmesgern, M. Nitsch, J. Peters, G. Pfeifer, S. Muller, J. Kellermann, A. Engel, F. U. Hartl and W. Baumeister (1995). The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. *Eur J Biochem* **227**(3): 848-56.
- Wera, S. and B. A. Hemmings (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311** ( Pt 1): 17-29.
- Won, K. A., R. J. Schumacher, G. W. Farr, A. L. Horwich and S. I. Reed (1998). Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol* **18**(12): 7584-9.
- Xu, Z., A. L. Horwich and P. B. Sigler (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* **388**(6644): 741-50.
- Yaffe, M. B., G. W. Farr, D. Miklos, A. L. Horwich, M. L. Sternlicht and H. Sternlicht (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* **358**(6383): 245-8.
- Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers and F. U. Hartl (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 781-91.
- Young, J. C. and F. U. Hartl (2002). Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors. *Nat Struct Biol* **9**(9): 640-2.
- Zabrocki, P., W. Swiatek, E. Sugajska, J. M. Thevelein, S. Wera and S. Zolnierowicz (2002a). The *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase Pph22p is biochemically different from mammalian PP2A. *Eur J Biochem* **269**(14): 3372-82.
- Zabrocki, P., C. Van Hoof, J. Goris, J. M. Thevelein, J. Winderickx and S. Wera (2002b). Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol Microbiol* **43**(4): 835-42.
- Zachariae, W. and K. Nasmyth (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **13**(16): 2039-58.
- Zhang, J. W. and P. B. Lazarow (1996). Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH<sub>2</sub>-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH<sub>2</sub>-terminal peptide. *J Cell Biol* **132**(3): 325-34.
- Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**: 27-65.
- Zimmerman, S. B. and S. O. Trach (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **222**(3): 599-620.
- Zylicz, M. and A. Wawrzynow (2001). Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* **51**(5):283-7.
- Zwanzig, R., A. Szabo and B. Bagchi (1992). Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 20-2.

---

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. F. Ulrich Hartl für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Ebenfalls möchte ich meiner Betreuerin Dr. Katja Siegers herzlich für das spannende Thema meiner Doktorarbeit, für die zahlreichen Ideen und Vorschläge danken sowie nicht zuletzt für ihre Bemühungen, uns den kritischen Umgang mit Experimenten und Ergebnissen nahe zu bringen.

Professor Dr. Alfred Pingoud danke ich für seine Bereitschaft, meine Doktorarbeit vor der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität in Giessen zu vertreten, insbesondere aber auch für sein reges Interesse und die fortwährende Unterstützung, die es mir ermöglicht haben, meine Arbeit erfolgreich zum Abschluss zu bringen.

Ich bedanke mich bei Dr. Andreas Bracher, der mir eine hervorragende Einführung in die Proteinbiochemie gab und mir stets mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Dr. Peter Palm (Abt. Oesterheld, MPI für Biochemie, Martinsried) danke ich für seine Unterstützung bei unzähligen Kultivierungen und Ernten von Fermenter-Kulturen. Frau Oana Mihalache (Abt. Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried) danke ich für die Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Zelluläre Biochemie danke ich für die kollegiale und motivierende Atmosphäre sowie den vielen Freundschaften, die sich im Lauf der Zeit gebildet haben. Ganz besonders möchte ich meinen Kollegen Bettina Bölker, Juliane Schwarz und Silke Grallath für den festen Zusammenhalt und sehr viel Spass – trotz gelegentlicher Murrattacker – danken.

Ich danke Bernd Grampp, der immer für Nachschub sorgte und dadurch oftmals zum Retter in der Not wurde.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die stets an mich geglaubt haben und immer für mich da waren.

Schließlich möchte ich mich bei Sigurd von ganzem Herzen bedanken. Seine Unterstützung, sein Glaube an mich und sehr viel Spass in allen Lebenslagen haben erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.