

# Untersuchung und Charakterisierung des ribosomalen Reifungsproteins Mak16 mit seinem Bindungspartner Rpf1



Vom Fachbereich Chemie der Rheinland–Pfälzischen Technischen  
Universität Kaiserslautern–Landau zur Erlangung des akademischen  
Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“**

genehmigte Dissertation  
DE - 386

vorgelegt von

**M.Sc. Nadine Duppe**

geboren in Neumünster

Betreuerin: PD Dr. Daili J. A. Netz

Kaiserslautern, 17.03.2025







Der praktische Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit entstand im Zeitraum von Februar 2018 bis Oktober 2021 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Antonio J. Pierik in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Daili J. A. Netz an der Rheinland–Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern–Landau, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 14.11.2023

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.03.2025

Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Kleist

1. Berichterstatterin: PD Dr. Daili J. A. Netz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Fahrer



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVII
1. Einleitung	1
1.1 Eisen–Schwefel–Proteine	1
1.1.1 Eisen–Schwefel–Cluster	1
1.1.2 Biosynthese von Eisen–Schwefel–Proteinen	2
1.1.3 Funktion von Eisen–Schwefel–Proteinen	4
1.2 Ribosomen	7
1.2.1 Vorkommen und Funktion von Ribosomen	7
1.2.2 Biosynthese eukaryotischer Ribosomen	7
1.2.3 Prozessierung und Modifikation der Hefe prä–rRNA	10
1.3 Mak16	13
1.4 Ziel der Arbeit	17
2. Materialien	18
2.1 Geräte	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Software	22
2.3 Chemikalien	23
2.4 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien	27
2.5 Größenstandards	27
2.6 Säulen und Säulenmaterialien	28
2.7 Antibiotika	28
2.8 Antikörper	28
2.9 Enzyme	29
2.10 Komplettsysteme	29
2.11 Oligonukleotide	30
2.11.1 Oligonukleotide zur klassischen Klonierung	30
2.11.2 Oligonukleotide zur Mutagenese	31
2.11.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden	32
2.11.4 Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von Hefestämmen	33
2.12 Plasmide	34

## Inhaltsverzeichnis

2.12.1 Ausgangsplasmide	34
2.12.2 Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	35
2.12.3 Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i>	36
2.13 Zellstämme	37
2.13.1 <i>E. coli</i> Stämme	37
2.13.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	38
3. Methoden	39
3.1 Mikrobiologische Arbeiten	39
3.1.1 Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	39
3.1.2 Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	40
3.1.3 Optische Dichte	41
3.2 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1 Polymerase–Kettenreaktion (PCR)	41
3.2.2 Agarosegelelektrophorese	44
3.2.3 Reinigung von DNA aus PCR Ansätzen und Agarosegelen	45
3.2.4 Restriktionsverdau	45
3.2.5 Ligation	46
3.2.6 Transformation in <i>E. coli</i>	46
3.2.7 Isolierung von Plasmid–DNA aus <i>E. coli</i>	47
3.2.8 Sequenzierung	47
3.2.9 Ortsgerichtete Mutagenese	48
3.3 Isolierung und Reinigung von RNA	50
3.3.1 Isolierung von RNA (ES7a) mittels Sephadex G–200	50
3.3.2 RNA–Extraktion von Lysat/Eluat/Trägermaterial mittels TriReagent®	51
3.3.3 Lösen des RNA Pellets	53
3.3.4 EMSA–Interaktionsassay	53
3.4 Zellbiologische Methoden	55
3.4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	55
3.4.2 Glycerinkulturen <i>E. coli</i>	56
3.4.3 Transformation in <i>S. cerevisiae</i> und homologe Rekombination	56
3.4.4 Chromosomale DNA–Isolierung aus Hefe	57
3.4.5 Glycerinkulturen <i>S. cerevisiae</i>	58
3.4.6 Isolierung von <i>S. cerevisiae</i> Gesamtzellextrakt	58
3.4.7 Wachstumstest–„Tüpfeltest“ von <i>S. cerevisiae</i>	59

3.4.8 Wachstumstest–„Tüpfeltest“ von <i>S. cerevisiae</i> mit Redox–Stressoren	60
3.4.9 Wachstumskurve und Verdopplungszeit von <i>S. cerevisiae</i>	60
3.5 Proteinbiochemische Methoden	61
3.5.1 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	61
3.5.2 Zellaufschluss mittels Retsch Schwingmühle MM 400	62
3.5.3 Zellaufschluss mittels Sonikator/Ultraschall–Homogenisator	62
3.5.4 Reinigung von Proteinen mittels Ni–NTA–Affinitätschromatographie	63
3.5.5 Proteinaufkonzentration durch Zentrifugieren	63
3.5.6 Reinigung von Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie	64
3.5.7 Reinigung von Proteinen mittels Heparin–Sepharose	65
3.5.8 Proteinbestimmung mittels Micro–Biuret–Methode	65
3.5.9 Proteinbestimmung mittels Bradford	66
3.5.10 Eisen–/Schwefelbestimmung	67
3.5.11 TCA–Präzipitation	68
3.5.12 Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS–PAGE)	69
3.5.13 Western–Blot	72
3.5.14 Koimmunopräzipitation	74
3.5.15 UV/Vis–Spektroskopie	74
3.5.16 ESR–Spektroskopie	74
3.5.17 Manuelle Redoxtitration	75
3.5.18 Automatisierte Redoxtitration	76
3.5.19 Mößbauer–Spektroskopie	77
4. Ergebnisse	79
4.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen zum Einfluss des Eisen–Schwefel–Clusters von Hefe–Mak16	79
4.1.1 Überexpression und Aufreinigung von His <sub>6</sub> Mak16	79
4.1.2 Überexpression und Aufreinigung des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1–Komplexes	83
4.1.3 Überexpression und Aufreinigung des His <sub>6</sub> Mak16 <sub>1–191</sub> /Rpf1–Komplexes	86
4.1.4 Überexpression und Aufreinigung des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes	90
4.1.5 Clusterabbau während Exposition an Sauerstoff	102
4.1.6 Überexpression und Aufreinigung des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Rrp1/Nsa1–Komplexes	104
4.1.7 ESR–und Mößbauer–Spektroskopie des Eisen–Schwefel–Clusters von Mak16	107
4.1.8 Untersuchung der Eisen–Schwefel–Clusterkoordination anhand Cysteinmutanten	115

## Inhaltsverzeichnis

4.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen zum Einfluss des Eisen–Schwefel–Clusters von Mak16 in Hefezellen	121
4.2.1 Komplementierung des Wachstumsphänotyps in <i>S. cerevisiae</i> mit Cys–Varianten	121
4.2.2 Untersuchungen zur synthetischen Letalität zwischen CIA–Maschinerie–Faktoren und Mak16	123
4.2.3 Depletion der CIA–Maschinerie–Faktoren führt zur synthetischen Letalität	126
4.2.4 Kritikalität des Eisen–Schwefel–Clusters in Mak16 für die Interaktion mit Rpf1 in Hefezellen	129
4.2.5 Einfluss von Redox–Stressoren auf Hefe–Mak16	134
4.3 rRNA–Interaktion zwischen dem rRNA–Expansionssegment ES7a und dem Mak16–Modul	148
4.3.1 Isolierung des rRNA–Expansionssegments ES7a	148
4.3.2 EMSA–Interaktionsassay zwischen dem rRNA–Expansionssegment ES7a und His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub>	152
5. Diskussion	155
5.1. Biochemische Charakterisierung von Hefe–Mak16 <i>in vitro</i>	155
5.2 Struktur–/Funktionsstudien am Eisen–Schwefel–Cluster von Hefe–Mak16 <i>in vivo</i>	167
5.3 Untersuchung der rRNA–Bindung an Mak16 durch EMSA–Interaktionsassay	172
6. Fazit und Ausblick	173
7. Literaturverzeichnis	176
Danksagung	185
Lebenslauf	187
Eidesstattliche Erklärung	188

## Zusammenfassung

Die Ribosomenbiogenese ist ein hochkomplexer und fundamentaler Prozess in allen lebenden Zellen. In Eukaryoten ist die Bildung der beiden ribosomalen Untereinheiten unter anderem von ca. 80 Assemblierungsfaktoren abhängig. Darunter bilden vier von ihnen in der großen ribosomalen Untereinheit das Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul im prä 60S–Partikel.

Das Hauptinteresse meiner Doktorarbeit lag dabei auf der Charakterisierung des Eisen–Schwefel–Proteins Mak16 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Mittels Koexpression von Mak16 mit seinem gekürzten Interaktionspartner Rpf1 konnte ein stabiler Proteinkomplex isoliert werden. Diese Komplexbildung wurde durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Anschließend konnte *in vitro* mittels biochemischen Methoden, durch UV/Vis–, ESR– und Mößbauer–Spektroskopie, die Anwesenheit eines [4Fe–4S]–Clusters im Mak16/Rpf1–Komplex gezeigt werden.

Die funktionelle Analyse der Cysteinreste von Mak16 wurde mit Plasmid–kodierten Einzel– und Doppelmutanten *in vivo* mittels Tüpfeltest durchgeführt, bei denen die Cysteinreste im N–Terminus von Mak16 in Alanine mutiert wurden. Nach der Depletion des endogenen Mak16 waren die C28A– und die C43A–Mutanten nicht in der Lage, die Lebensfähigkeit der Zellen zu gewährleisten und wurde deswegen als essenziell identifiziert. Die C38A–Mutante rettete den Wachstumsdefekt nur teilweise, während die Mutante C15A das Wildtyp–Wachstum fast komplett wiederherstellen konnte. Die Wirkung der Doppelmutation C15A/C38A auf das Zellwachstum führte unter nicht–permissiven Bedingungen zu einem verstärktem Wachstumsdefekt im Vergleich zur C38A–Mutante. Durch die Isolierung und Aufreinigung der Mak16 Cystein–Mutanten–Komplexe mit gekürztem Rpf1 *in vitro* konnten diese ebenfalls spektroskopisch charakterisiert und als Liganden identifiziert werden. Zusammenfassend sind die vier Cysteinreste: C15, C28, C38 und C43 entscheidend für die Eisen–Schwefel–Cluster–Koordination in Mak16, während die beiden nicht konservierten Cysteinreste C55 und C108 nicht Teil der Metallbindung sind.

Um die Rolle des Eisen–Schwefel–Clusters in der Ribosomenbiogenese auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden mehrere *in vivo* Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Auswirkung von depletierten CIA–Maschinenproteinen in Verbindung mit einer eingeschränkten Eisen–Schwefel–Cluster–Koordination in einer Mak16–Mutante (C38A) auf den Phänotyp und dabei das Konzept der synthetischen Letalität untersucht. Für diese Studien wurden galaktose–regulierbare Stämme entwickelt, die sowohl den Promotor von *MAK16* als auch die Promotoren der CIA–

## Zusammenfassung

Maschinenproteine unter die Kontrolle von *GAL*-Promotoren stellten. Die Ergebnisse zeigten, dass es eine funktionelle Korrelation zwischen den getesteten CIA-Maschinenproteinen und Mak16 gibt und dass der Phänotyp der Mak16-Mutante eng mit dem fehlerhaften Einbau vom Eisen-Schwefel-Cluster verbunden ist. Die Herunterregulierung der einzelner CIA-Faktoren führte dabei zum Zelltod der Mak16-Mutante.

Interaktionsstudien *in vivo* mit Eisen-Schwefel-Cluster-Koordination beeinträchtigten Mak16-Mutanten und Rpf1 zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mak16 und Rpf1 mittels Immunpräzipitation, dass Apo-Mak16 mit Rpf1 keine Bindung eingehen kann, wohingegen der Wildtyp mit Rpf1 interagiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit eines Eisen-Schwefel-Clusters in Mak16 sehr wahrscheinlich essenziell für die Stabilität von Mak16 selbst und indirekt für die Bindung mit Rpf1 ist.

Anhand von Redox-Stresstests *in vivo* mit Hefezellen, wurde die Auswirkung von Paraquat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DTT und Vitamin K<sub>3</sub> auf den Phänotyp von Wildtyp-Mak16 und auf eine Mak16-Mutante mit Wachstumsdefekt, C38A, anhand Tüpfeltests bewertet. Mittels dieser Studien konnte sowohl ein dosisabhängiger (DTT), als auch ein substratabhängiger Effekt (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Vitamin K<sub>3</sub>) auf das Wachstum der Zellen beobachtet werden. Um den dosisabhängigen inhibitorischen Charakter von Vitamin K<sub>3</sub> während der Wachstumsphase zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Wachstumskurven die Verdopplungszeiten der Zellen bestimmt. Die Mutantenzellen und die Wildtypzellen wiesen dabei eine vergleichbare Verdopplungszeit auf, jedoch wiesen die stressinduzierten Mak16-Mutantenzellen eine längere Lag-Phase auf. Dies bedeutet, dass die Eisen-Schwefel-Cluster-Koordination beeinträchtigten Mak16-Zellen eine längere Zeit benötigen um sich den Stressbedingungen anpassen zu können, anschließend jedoch ein Wachstum aufwiesen wie stressinduzierte Mak16-Wildtypzellen. Dies lässt eine nützliche biologische Funktion von Mak16 in der Regulation der Ribosomenbiogenese vermuten.

Zu den besonderen Merkmalen von Mak16 gehört neben dem [4Fe4S]-Cluster, die Ähnlichkeit zur ribosomalen L28e Proteinfamilie im N-Terminus und die unmittelbare Nähe zu dem Expansionssegment ES7a der ribosomalen RNA 25S. Um den Einfluss von Mak16 auf die rRNA zu untersuchen, wurden Protein-RNA Interaktionsstudien durchgeführt. Nach erfolgreicher Isolierung des rRNA-Expansionssegments ES7a zeigten erste Ergebnisse mittels dem EMSA-Assay eine Bindung zwischen der rRNA ES7a und dem Mak16/Rpf1-Proteinkomplex.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeiten ein bedeutender Fortschritt im Verständnis zur Funktion des Eisen-Schwefel-Clusters des Mak16/Rpf1-Proteinkomplexes in der Ribosomenbiogenese erbracht werden.

## Abkürzungsverzeichnis

---

∅	Ohne Insert
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (ATP-bindende Kassette)
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRIX	<i>biogenesis of ribosomes in Xenopus domain</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cys/Cystein
°C	Celsius
ca.	circa
CAPS	3-Cyclohexylaminopropan-1-sulfonsäure
Cfd1	<i>Cytosolic Fe/S cluster deficient</i> , Gerüstprotein
CIA	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly</i>
Cia1	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly 1</i> , Protein des Targeting-Komplexes
Cia2	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly 2</i> , Protein des Targeting-Komplexes
Cic1	<i>Core Interacting Component 1</i> , Proteasom-interagierendes Protein
Cys-Mutante	Cystein-Mutante
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CoIP	<i>Co-immunoprecipitation</i> (Ko-Imunopräzipitation)

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

CV	<i>Column volume</i> (Säulenvolumen)
Δ	folgendes Gen ist bei dem Hefestamm deletiert
D	Durchlauf (SDS–PAGE Probe)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHAD	Dihydroxysäure–Dehydratase, Fe/S–Protein
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> –Dimethylformamid
DMPD	<i>N,N</i> –Dimethyl- <i>p</i> –phenylendiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>DpnI</i>	Endonuklease aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
Dre2	<i>Derepressed for ribosomal protein S14 expression</i> , Elektronentransfer
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat (SDS–PAGE Protein–Probe)
e–	Elektron
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent</i> (Verstärkte Chemilumineszenz)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR	Elektronenspinresonanz
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
ETS	externer transkribierter <i>spacer</i>

---

---

<sup>55</sup> Fe	radioaktives Isotop von Eisen
Fe/S	Eisen–Schwefel
g	Gramm
Gal	Galaktose
GelRed	<i>5,5'-(6,22-Dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosane-1,27-diyl)bis(3,8-diamino-6-phenylphenanthridin-5-ium) diiodid</i>
Glu	Glukose
Grc3	<i>Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase</i> , rRNA-Verarbeitung und Beendigung der RNA-Polymerase-I-Transkription
Grx3/Grx4	Glutaredoxin 3/4
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
h	Stunde
His	Histidin
<i>His<sub>6</sub></i>	Hexahistidin-Tag
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IgG	Immunglobulin-G
IGS	<i>intergenic spacer</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISC	<i>Iron sulfur cluster</i> (Eisen Schwefel Cluster)
ITS	interner transkribierter <i>spacer</i>
<i>Kan</i>	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Kp <sub>i</sub>	Kaliumphosphat–Puffer
Kryo–EM	Kryoelektronenmikroskopie
l	Liter
L	Lysat (SDS–PAGE Probe)
LB	Luria–Bertani
LRU	<i>Large ribosomal subunit</i> (große ribosomale Untereinheit)
M	Molar
Mak16	<i>Maintenance of killer 16</i>
Max.	Maximum
MBP	Maltosebindeprotein
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
MET	Methionin
Met18	<i>Methionine requiring 18</i> , Protein des Targeting–Komplexes
<i>MET25</i>	O–Acetylhomoserin–/ O–acetylserin–Sulphydrylase, Promotor
MiaB	<i>tRNA–2–methylthio–N(6)–dimethylallyladenosine synthase</i>
min	Minute
mM	Millimolar
MMS19	Methylmethansulfonat–sensitiv 19, Met18–Homolog aus <i>H. sapiens</i>
mRNA	<i>messenger–RNA</i> (Boten–RNA)
Mrp (RNase)	<i>RNase for mitochondrial RNA processing</i>
NADP/NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Nar1	<i>Nuclear prelamin A recognition factor</i> , Bindeglied der CIA–Maschinerie
n	Anzahl der Wiederholungen eines Versuchs
<i>Nat</i>	Nourseothricin N–Acetyl–Transferase
NBD	Nukleotid–bindende Domänen

---

---

Nbp35	<i>Nucleotide-binding protein of 35 kDa</i> , Gerüstprotein
NEB	<i>New England Biolabs Inc.</i>
ng	Nanogramm
Ngl2	<i>Endonuclease involved in rRNA processing</i>
NI	Nach Induktion (SDS-PAGE Probe)
NIF	<i>Nitrogen fixation</i> (Stickstofffixierung)
nm	Nanometer
NP	Natürlicher Promotor
Nsa1	<i>Nop Seven Associated 1</i> , Ribosomen-Biosyntheseprotein
N-Terminus	Amino-Terminus
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
P	Pellet (SDS-PAGE Probe)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL $\delta$	Polymerase $\delta$ , Fe/S-Protein
Pol I	RNA Polymerase I
Pol III	RNA Polymerase III
PPI	Protein-Protein-Interaktion
Rad3	<i>RADiation sensitive 3</i>
Rat1	<i>Ribonucleic Acid Trafficking</i>
rDNA	ribosomale DNA
Rex1-3	RNA Exonuklease 1-3

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Rli1	RNase L Inhibitor, Fe/S–Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoff Spezies)
Rpf1	<i>Ribosome production factor 1</i> , Mak16 Bindungsprotein
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rProteine	ribosomale Proteine
rRNA	ribosomale RNA
Rrp1	<i>ribosomal RNA–processing protein 1</i>
Rrp5	<i>ribosomal RNA Processing protein 5</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	S–Adenosylmethionin
SC	<i>Synthetic complete</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	systemische Lupus Erythematodes
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i> (kleine nukleoläre Ribonukleinsäure)
snoRNP	<i>small nucleolar Ribonucleoprotein</i> (kleine nukleoläre Ribonukleinproteine)
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SRU	<i>small ribosomal subunit</i> (kleine ribosomale Untereinheit)
SUF	<i>sulphur–utilization factors</i> (Schwefel–Verwertungsfaktoren)
Tag	Markierung
Tah18	<i>Top1T722A mutant Hypersensitive 18</i>
TAP	<i>Tandem affinity purification</i> (Tandem–Affinitäts–Reinigung)
TAPS	Tris(hydroxymethyl)methylamino]propansulfonsäure

---

---

TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TetR	Tetracyclinrepressor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer-RNA</i> (Transport-RNA)
<i>TRP1</i>	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase, Markergen
ts	<i>temperature sensitive</i> (temperatursensitiv)
<i>URA3</i>	Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, Markergen
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i> (ultraviolett/sichtbar)
V	Volumen
vdG	vor der Größenausschlusschromatographie
VI	Vor Induktion (SDS-PAGE Probe)
Vitamin K <sub>3</sub>	Menadion
v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Waschprobe (SDS-PAGE Probe)
WT	Wildtyp
w/v	<i>Weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
XPD	<i>xeroderma pigmentosum group D</i>
X-S	unbekannte schwefelhaltige Verbindung
YP	<i>Yeast Peptone</i>
ZE	Zellextrakt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Eisen–Schwefel–Clustern.....	1
Abbildung 2: Übersicht der Biogenese von zytosolischen und nukleären Eisen–Schwefel–Proteine.....	3
Abbildung 3: Vereinfachtes Model der Synthese der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit.....	8
Abbildung 4: Organisierung des rDNA Genlokus in <i>S. cerevisiae</i> .....	10
Abbildung 5: Schema der Prozessierung der 35S prä–rRNA in <i>S. cerevisiae</i> .....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung des zwei–Domänen Proteins Mak16.....	13
Abbildung 7: Eine hypothetische Variante des phylogenetischen Baums.....	14
Abbildung 8: rRNA Assemblierung mit der möglichen Stabilisierungsfunktion von Mak16.....	15
Abbildung 9: Kryoelektronenmikroskopie basierte Modellierung des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls.....	16
Abbildung 10: Charakterisierung von gereinigtem His <sub>6</sub> Mak16.....	80
Abbildung 11: UV/Vis–Spektrum von His <sub>6</sub> Mak16.....	81
Abbildung 12: Strukturmodell des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls visualisiert mit BIOVIA Visualizer.....	82
Abbildung 13: SDS–PAGE von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1.....	84
Abbildung 14: Nachweis von His <sub>6</sub> Mak/Rpf1 mittels Western–Blot.....	84
Abbildung 15: Charakterisierung von gereinigtem His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1–Komplex.....	86
Abbildung 16: 3D–Modellierung von Hefe–Mak16.....	87
Abbildung 17: Sequenzierungsauszug von His <sub>6</sub> Mak16 mit erfolgreicher Stop–Codon Mutation.....	88
Abbildung 18: SDS–PAGE von His <sub>6</sub> Mak16 <sub>1–191</sub> /Rpf1.....	89
Abbildung 19: UV/Vis–Spektrum von His <sub>6</sub> Mak16 <sub>1–191</sub> /Rpf1.....	89
Abbildung 20: Entfernung des N–Terminus von Rpf1 im Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul.....	90
Abbildung 21: Sequenzierungsauszug für die Deletion der Aminosäuren 1–57 von Rpf1.....	91
Abbildung 22: SDS–PAGE von gereinigtem His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> .....	91
Abbildung 23: Charakterisierung von gereinigtem His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplex.....	92
Abbildung 24: SDS–PAGE zum Vergleich der gereinigten Protein–Komplexe.....	93
Abbildung 25: Analyse des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes mittels Größenausschlusschromatographie.....	94
Abbildung 26: Kalibrierungsgerade der Eichproteine und Maxima 1 und 2.....	95
Abbildung 27: SDS–PAGE des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes vor und nach Größenausschlusschromatographie.....	95

Abbildung 28: UV/Vis–Spektroskopieanalyse der Maxima des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes nach Größenausschlusschromatographie. ....	96
Abbildung 29: Der His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplex zeigt gebundene RNA mittels Gelelektrophorese. ....	97
Abbildung 30: Mögliche RNA–bindende Regionen in <i>S. cerevisiae</i> Mak16. ....	99
Abbildung 31: Aufreinigung von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> mittels Heparin–Sephrose. ....	100
Abbildung 32: SDS–PAGE der Aufreinigung von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> mittels Größenausschluss–chromatographie und anschließender Heparin–Sephrose. ....	101
Abbildung 33: Stabilität des Eisen–Schwefel–Clusters von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> unter aeroben und anaeroben Bedingungen. ....	103
Abbildung 34: SDS–PAGE von gereinigtem Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul. ....	105
Abbildung 35: Charakterisierung des gereinigten Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls. ....	106
Abbildung 36: Absorptionsabnahme nach Natriumdithionitzugabe. ....	107
Abbildung 37: pH–abhängige ESR–Signale von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> . ....	108
Abbildung 38: ESR–Spektren des gereinigten His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes. ....	109
Abbildung 39: Bestimmung des Redoxpotentials des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes mittels UV/Vis–spektroskopisch begleitende Redoxtitration. ....	110
Abbildung 40: Bestimmung des elektrochemischen Potentials des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes. ....	111
Abbildung 41: Redoxtitration des His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexes. ....	112
Abbildung 42: Identifizierung eines [4Fe–4S]–Clusters in His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 mittels Mößbauer–Spektroskopie. ....	114
Abbildung 43: SDS–PAGE zum Vergleich der gereinigten Cys–Varianten von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> . ....	116
Abbildung 44: Eluate gereinigter Cys–Varianten von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> . ....	116
Abbildung 45: Analyse gereinigter Cys–Varianten von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> mittels UV/Vis–Spektroskopie. ...	117
Abbildung 46: Eisen– und säure–labiler Schwefelgehalt isolierter Cys–Varianten von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexen. ....	118
Abbildung 47: ESR–Spektren isolierter Cys–Varianten von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> –Komplexen. ....	119
Abbildung 48: Wachstumskomplementation der Mak16–Cysteinmutanten zeigt unterschiedlichen Komplementationsphänotyp. ....	122
Abbildung 49: Ts–Cic1 nimmt keinen Einfluss auf CIA–Maschinerie–Faktor Nbp35 unter permissiver Temperatur. ....	124
Abbildung 50: Temperatursensitivität von Mak16 mit Nbp35. ....	125
Abbildung 51: Nachweis der synthetischen Letalität zwischen dem CIA–Faktor Nbp35 und Mak16. ....	128

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 52: Wachstumsverhalten von <i>GALL-MAK16/GALL-RPF1</i> Zellen.....	130
Abbildung 53: Western-Blot-Analysen der Zellextrakte.....	131
Abbildung 54: Nachweis der Interaktion von Mak16 mit Rpf1 <i>in vivo</i> durch Koimmunopräzipitation. ....	133
Abbildung 55: Reaktive Sauerstoffspezies.....	134
Abbildung 56: Sekundärstruktur der rRNA ES7-Expansionsregion.....	135
Abbildung 57: Redox-Zyklus von Paraquat.....	136
Abbildung 58: Paraquat als Stressauslöser weist keinen Wachstumsdefekt auf.....	137
Abbildung 59: Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT). ....	138
Abbildung 60: Dithiothreitol zeigt einen dosisabhängigen Wachstumsdefekt auf die Zellen. ....	139
Abbildung 61: Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion. ....	140
Abbildung 62: Wasserstoffperoxid zeigt einen leichten Wachstumsdefekt auf die Zellen.....	141
Abbildung 63: Vitamin K <sub>3</sub> Redox-Mechanismus. ....	142
Abbildung 64: Vitamin K <sub>3</sub> zeigt einen Wachstumsdefekt auf die Zellen. ....	143
Abbildung 65: Verlauf einer typischen Hefewachstumskurve. ....	143
Abbildung 66: Dosisabhängige Wachstumskurve von <i>GALL-MAK16</i> mit und ohne Vitamin K <sub>3</sub> . ....	145
Abbildung 67: Relative Absorption von <i>GALL-MAK16</i> nach 6, 12 und 24 Stunden.....	146
Abbildung 68: Berechnete Verdopplungszeit von mit Vitamin K <sub>3</sub> stressinduzierten Zellen. ....	147
Abbildung 69: Klonierungsschema und RNA-Faltvorhersage von ES7a in pCDF-Duet Vektor.....	148
Abbildung 70: Nachweis des ES7a-Expansionssegmentes der 25S rRNA im Lysat.....	149
Abbildung 71: Nachweis des ES7a-Expansionssegments im Eluat der aufgereinigten Proteine.....	150
Abbildung 72: Verlust vom ES7a-Expansionssegment nach Ni-NTA-Aufreinigung.....	151
Abbildung 73: SDS-PAGE der beiden Aufreinigungsmethoden Sephadex und Ni-NTA-Agarose.....	152
Abbildung 74: Nachweis der Protein-RNA-Wechselwirkung mittels EMSA und SDS-PAGE.....	153
Abbildung 75: Der Rpf1/Mak16-Komplex in der Rpf1-TAP prä-60S Ribosomenstruktur. ....	157
Abbildung 76: Proteine des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls.....	165
Abbildung 77: Mak16 Sequenzvergleich von <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. glabrata</i> .....	171
Abbildung 78: Funktion einzelner zellulärer Hefe [4Fe-4S]-Zielproteine, mit dem dazugehörigem Eisen-Schwefel-Protein Mak16. ....	173

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Software	22
Tabelle 4: Chemikalien	23
Tabelle 5: Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien	27
Tabelle 6: Größenstandards	27
Tabelle 7: Säulen und Säulenmaterialien	28
Tabelle 8: Antibiotika	28
Tabelle 9: Antikörper	28
Tabelle 10: Enzyme	29
Tabelle 11: Komplettsysteme	29
Tabelle 12: Oligonukleotide zur klassischen Klonierung	30
Tabelle 13: Oligonukleotide zur Mutagenese	31
Tabelle 14: Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden	32
Tabelle 15: Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von Hefestämmen	33
Tabelle 16: Ausgangsplasmide	34
Tabelle 17: Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	35
Tabelle 18: Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i>	36
Tabelle 19: <i>E. coli</i> Stämme	37
Tabelle 20: <i>S. cerevisiae</i> Stämme	38
Tabelle 21: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes	42
Tabelle 22: PCR-Programm für Q5/Phusion-Polymerasen	43
Tabelle 23: Pipettierschema eines Kolonie-PCR-Ansatzes	43
Tabelle 24: Kolonie-PCR-Programm	44
Tabelle 25: Restriktionsverdau-Ansatz für Vektor und Insert	45
Tabelle 26: Pipettierschema einer Ligation	46
Tabelle 27: Pipettierschema einer gezielten Mutagenese	48
Tabelle 28: 1. PCR (gezielte Mutagenese)	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 29: 2. PCR (gezielte Mutagenese) _____	49
Tabelle 30: Pipettierschema eines UREA–Polyacrylamidgel (10 %) _____	52
Tabelle 31: Pipettierschema eines EMSA–TBE–Polyacrylamidgel (5 %) _____	54
Tabelle 32: Redox–Stressoren _____	60
Tabelle 33: Micro–Biuret Pipettierschema _____	66
Tabelle 34: Bradford Pipettierschema _____	67
Tabelle 35: Eisenbestimmung Pipettierschema _____	67
Tabelle 36: Sulfidbestimmung Pipettierschema _____	68
Tabelle 37: Pipettierschema des Trenngels (12,5 %) für 2 Mini–Gele _____	70
Tabelle 38: Pipettierschema des Sammelgels für 2 Mini–Gele _____	70
Tabelle 39: Redoxtitrationsansatz _____	75
Tabelle 40: Ablauf der automatischen Redoxtitration _____	77
Tabelle 41: Analyseparameter des Mößbauer–Spektrums der unbehandelten Probe _____	114
Tabelle 42: Analyseparameter des Mößbauer–Spektrums der Dithionit–reduzierten Probe _____	115
Tabelle 43: Proteinausbeute nach der Aufreinigung von His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58–295</sub> und den Cys–Varianten _____	119
Tabelle 44: Berechnete Verdopplungszeiten der mit Vitamin K <sub>3</sub> behandelten Zellen _____	147
Tabelle 45: Berechnete molare Verhältnisse zwischen dem Proteinkomplex und der rRNA _____	154
Tabelle 46: Vergleich der identifizierten Aminosäuren (AA) der Hefe–Proteine Mak16 und Rpf1 in vorliegenden Kryo–EM–Strukturen _____	159
Tabelle 47: Biophysikalische Eigenschaften verschiedener [4Fe–4S]–Cluster in Proteinen _____	161
Tabelle 48: Redoxpotential–Verschiebungen einiger DNA prozessierender Enzyme _____	161
Tabelle 49: Redoxpotential einiger [4Fe–4S]–Cluster wichtiger Eisen–Schwefel–Proteine _____	163

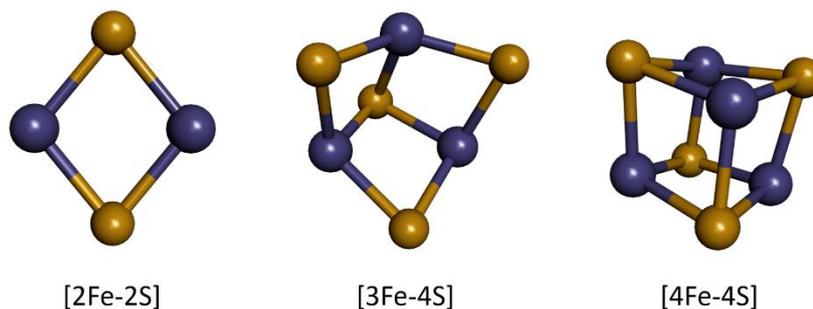
# 1. Einleitung

## 1.1 Eisen–Schwefel–Proteine

Eisen–Schwefel–Proteine sind essentielle biomolekulare Komponenten, die in einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine Schlüsselrolle spielen. Diese wichtige Klasse von Proteinen trägt essentielle Cofaktoren, die Eisen–Schwefel–Cluster.

### 1.1.1 Eisen–Schwefel–Cluster

Obwohl Eisen–Schwefel–Cluster zu den ältesten Bestandteilen der lebenden Materie gehören, wurden Eisen–Schwefel–Cluster erstaunlicherweise erst in den 1960 Jahren in Proteinen entdeckt. Die in der Natur wichtigsten und gängigsten Vertreter von Eisen–Schwefel–Proteinen enthalten:  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^-$ ,  $[3\text{Fe}-4\text{S}]^-$  und  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^-$ -Cluster (Abbildung 1). In den meisten Fällen werden die Eisen–Schwefel–Cluster über Seitenketten–Schwefelatome von Cysteinen an das Protein koordiniert. Diese Vielfalt ermöglicht den Eisen–Schwefel–Proteinen eine Vielzahl an wichtigen biologischen Funktionen und Aufgaben in der Zelle zu übernehmen. Zu ihren Hauptaufgaben zählen die werkweise als Akteure in der Generegulation, die Erhaltung der strukturellen Integrität, die RNA Modifizierung und DNA Reparatur sowie den Elektronentransport (Beinert *et al.*, 1997; Jacquot, 2018).



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Eisen–Schwefel–Clustern.**

Räumliche Anordnung der Eisen– und Schwefelionen die überwiegend in biologischen Systemen vorkommen. Die häufigsten Clustertypen sind hierbei der rhombische  $[2\text{Fe}-2\text{S}]^-$  und der kubische  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^-$ -Clustertyp. Der  $[3\text{Fe}-4\text{S}]^-$ -Clustertyp entsteht vorwiegend durch den Zerfall eines  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^-$ -Clusters. Eigene Darstellung mit BIOVIA Discovery Studio 2019, abgeleitet von Fontecave, 2006.

## Einleitung

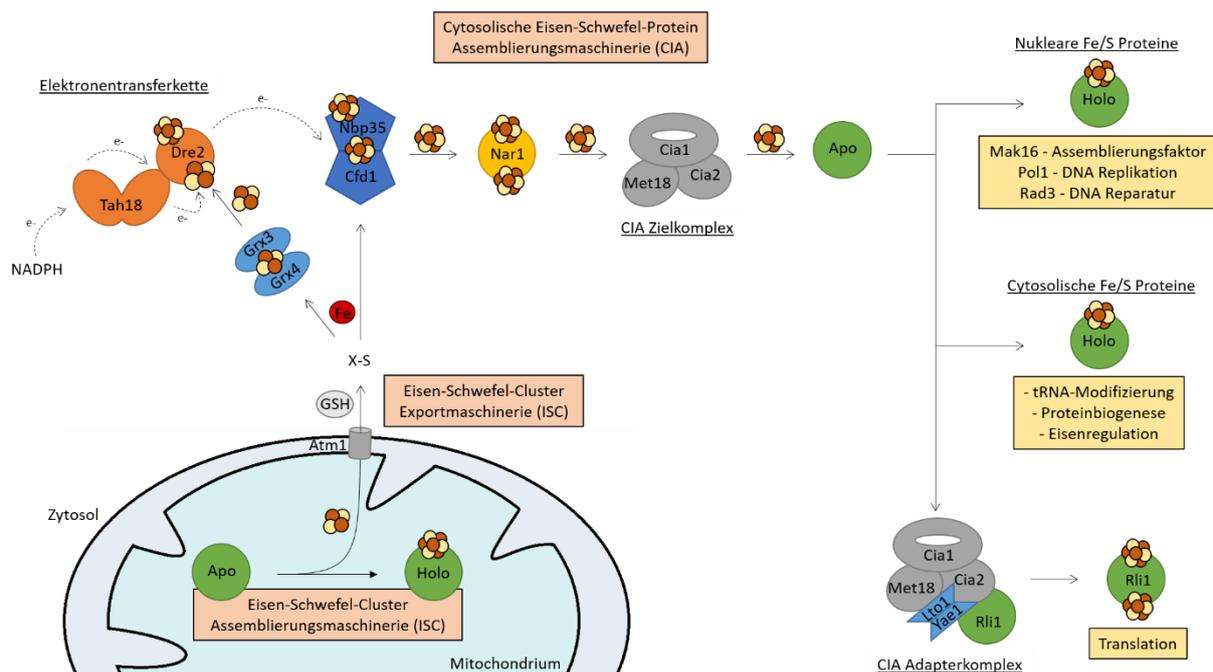
Eine der bekanntesten Ausnahmen ist das [2Fe–2S]–Cluster tragende Rieske–Protein. Hierbei sind zwei der vier koordinierenden Cysteine durch zwei Histidine ersetzt (Link, 1999). Über die Jahre konnten neben Cysteinen und Histidinen noch weitere Aminosäuren identifiziert werden, die an Eisenionen koordinieren können, wie zum Beispiel: Aspartat, Arginin, Glutamin oder Tyrosin (Fontecave, 2006). Eine weitere Besonderheit findet sich bei dem Enzym Aconitase. Die Enzymaktivität wird durch eine Änderung des beinhaltenden Clusters bestimmt. Hierbei erfolgt eine reversible Umwandlung eines [3Fe–4S]–Cluster, der die inaktive Form begünstigt, in einen [4Fe–4S]–Cluster, der die aktive Form aktiviert (Brown *et al.*, 2002). In der Natur gibt es auch durch Kombination einfacher Strukturen komplexere Cluster. Die Mo–abhängige Nitrogenase beinhaltet zum Beispiel ein weites Spektrum an verschiedenen Eisen–Schwefel–Clusterformen. Bei der Reduktion von Stickstoff kommt es zu einer Interaktion zwischen zwei Komponenten, dem Eisen–Protein, welches einen [4Fe–4S]–Cluster trägt und dem Mo–Eisen–Protein, welches einen [8Fe–7S]–Doppelkuban trägt, der aus zwei [4Fe–4S]–Clustern aufgebaut ist, die sich ein gemeinsames Sulfidion teilen. Diese beiden Clusterformen dienen dem Elektronentransfer im Enzymsystem. Das Mo–Eisen–Protein besitzt noch eine zweite Clusterform, bei der ein Eisenion durch ein Molybdän ausgetauscht wurde, ein [7Fe–9S]–Molybdän–Carbid–Homocitrat Cluster, an dem die Stickstoff Aktivierung und Reduktion zu Ammoniak erfolgt (Meyer, 2008; Spatzal *et al.*, 2011; Jacquot, 2018). Neben der Nitrogenase enthält der Komplex I der Atmungskette acht Eisen–Schwefel Cluster, die für den Transport der Elektronen zuständig sind (Sazanov *et al.*, 2006).

### 1.1.2 Biosynthese von Eisen–Schwefel–Proteinen

Anfang der 1970er Jahre konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Eisen–Schwefel–Cluster auf Apoproteine spontan *in vitro* zu assemblieren. Hierzu brauchte man hohe Konzentrationen an Eisen– und Sulfidsalzen, um den Cluster an das Protein zu rekonstituieren und die Aktivität des Holoпротеins zurück zu gewinnen (Malkin *et al.*, 1966). Die Annahme, dass dies auch *in vivo* spontan erfolgt, wurde in den 90er Jahre widerlegt. Dean *et al.* entdeckten, dass die Eisen–Schwefel–Cluster Biosynthese mit Hilfe einer komplexen Maschinerie erfolgt und der Einbau des Clusters katalysiert wird, da Eisen– und Sulfidionen in ihrer freien Form toxisch wirken (Jacobson *et al.*, 1989; Py *et al.*, 2010).

Eisen–Schwefel–Proteine kommen in allen Domänen des Lebens vor und besitzen für ihrer Biosynthese vergleichbare Prinzipien, wie die Verwendung einer Desulfurase zum

Schwefelerhalt, ein Eisendonatorprotein zum Eisenerhalt, die zentrale Rolle von einem Gerüstprotein zur Eisen–Schwefel–Cluster Synthese und Chaperone, die den Transfer des Clusters vom Gerüstprotein zum Zielprotein veranlassen (Johnson *et al.*, 2005). Bei Prokaryoten sind drei unabhängig voneinander arbeitende Systeme bekannt. Die ISC–Maschinerie (*iron–sulphur–cluster*), das SUF–System (*sulphur–utilization factors*) und das NIF–System (*nitrogen fixation*). Letzteres wurde als erste Assemblierungsmaschinerie in dem Proteobakterium *Azotobacter vinelandii* entdeckt (Roche *et al.*, 2013). Eukaryoten verfügen ebenfalls über die ISC–Maschinerie, welche für die Synthese der Eisen–Schwefel–Cluster verantwortlich ist. Die Biosynthese der Eisen–Schwefel–Cluster *in vivo* umfasst in eukaryotischen Zellen mehr als 30 bekannte Proteine (Paul *et al.*, 2015a). Hierbei erfolgt ein Zusammenspiel der mitochondrialen Eisen–Schwefel–Cluster Assemblierungsmaschinerie (ISC–Maschinerie), der Eisen–Schwefel–Cluster Exportmaschinerie und der cytosolischen Eisen–Schwefel–Protein Assemblierungsmaschinerie (CIA: *cytosolic iron–sulfur protein assembly*) (Braymer *et al.*, 2017).



**Abbildung 2: Übersicht der Biogenese von zytosolischen und nukleären Eisen–Schwefel–Proteine.**

Für die Bildung der Eisen–Schwefel–Proteine ist ein Zusammenspiel der ISC–Assemblierungs– und ISC–Exportmaschinerie der Mitochondrien mit der CIA–Assemblierungsmaschinerie im Zytosol notwendig. Exemplarisch sind wichtige Funktionen von nukleären und zytosolischen Eisen–Schwefel–Proteinen aufgelistet.

 2Fe–2S–Cluster, 
  4Fe–4S–Cluster, 
  Eisen–Ionen, 
 X–S: unbekannte schwefelhaltige Verbindung, 
 e–: Elektronen. Eigene Darstellung nach Lill, 2020.

## Einleitung

Die mitochondriale ISC–Assemblierungsmaschinerie ist für die Reifung aller zellulären Eisen–Schwefel–Proteine verantwortlich. Außerdem generiert die mitochondriale ISC–Assemblierungsmaschinerie eine noch unbekannte schwefelhaltige Verbindung (X–S in Abb. 2), die mithilfe des Atm1 Transporterproteins (grau) in das Zytosol exportiert wird. Anschließend verwenden Komponenten der zytosolischen CIA–Assemblierungsmaschine diese Verbindung, sowie Eisenionen (rot, Fe in Abb. 2) und Elektronen ( $e^-$  in Abb. 2), um den Eisen–Schwefel–Cluster auf dem Gerüst–Protein Komplex aus Cfd1/Nbp35 zu assemblieren. Hierbei assistiert das Tripeptid Glutathion (grau, GSH) bei der Assemblierung der Cluster und die Elektronen werden von der Elektronentransferkette, von NADPH aus über Tah18 und Dre2, geliefert. Dieser Elektronentransferkomplex benötigt die [2Fe–2S]–Clusterübergabe der Multidomäne Monothiol Glutaredoxin (Grx3–Grx4). Sobald der [4Fe–4S]–Cluster erfolgreich auf dem Cfd1/Nbp35 Gerüstkomplex hergestellt wurde, wird er an das Nar1 Protein weitergegeben und zum CIA–Zielkomplex weiter transportiert. Dieser besteht aus den Proteinen Cia1, Cia2 und Met18 und liefert die Eisen–Schwefel–Cluster zu den entsprechenden zytosolischen und nukleären Apo–Eisen–Schwefel–Zielproteinen. Für das Rli1–Protein benötigt der Transport einen Adapterkomplex, indem sich die Proteine Yae1 und Lto1 an den CIA–Zielkomplex anlagern, bevor der Cluster sein Zielprotein erreicht (Rli1 in Abbildung 2) (Lill, 2020; Mendel *et al.*, 2020).

### 1.1.3 Funktion von Eisen–Schwefel–Proteinen

Wie bereits erwähnt, stellen Eisen–Schwefel–Proteine eine der allgegenwärtigsten und vielseitigsten Gruppen von Metalloproteinen dar. Es gibt mehr als 120 verschiedene Proteine die Eisen–Schwefel–Cluster enthalten und in grundlegende Prozesse wie der Atmung, der Photosynthese und der Stickstofffixierung involviert sind (Jacquot, 2018). Eine der wichtigsten Funktionen ist der Elektronentransport. Dieser basiert auf der Eigenschaft des Eisenions zwischen den Oxidationszuständen +II und +III wechseln zu können. Allgemein sind die Funktionen der [4Fe–4S]–Cluster tragenden Proteine aufgrund einer Vielzahl an möglichen Redox–Zuständen flexibler als die [2Fe–2S]–Cluster (Beinert *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 2006). So kann das Redoxpotential eines [4Fe–4S]–Clusters je nach Proteinumgebung von 500 mV bis unter –500 mV gemessen werden (Fontecave, 2006). Die bekanntesten Elektronentransportprozesse finden in den Komplexen I, III und IV der Atmungskette und den Ferredoxinen statt (Whiteley *et al.*, 1962; Jacquot, 2018). Eine weitere Funktion ist die

Enzymkatalyse, hierbei bildet der Eisen–Schwefel–Cluster einen Teil des aktiven Zentrums. Die Aconitase zum Beispiel liefert ein Eisenion vom [4Fe–4S]–Cluster, welches nicht durch Cysteinreste koordiniert wird, die Bindungsstelle für das Substrat. Das Eisenion fungiert hierbei als Lewisäure und katalysiert die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat unter der Abspaltung und Wiederanlagerung von Wasser (Werst *et al.*, 1990; Beinert *et al.*, 1997; Lill, 2009). Eine weitere ubiquitäre Klasse von Eisen–Schwefel–Cluster beinhaltenden Proteinen sind die Radikal–S–Adenosylmethionin (Radikal SAM)–Enzyme, die erstmals 2001 von Sofia *et al.* beschrieben wurden. Die damals mit ~ 600 Mitglieder identifizierte Familie, wuchs bis heute auf ~ 220 000 Mitglieder an (Benjdia *et al.*, 2017). Sie katalysieren wichtige Reaktionen, bei denen die Redoxaktivität vom [4Fe–4S]–Cluster genutzt wird, um SAM zum 5`–Desoxy–adenosylradikal als Intermediat zu spalten und anschließend dadurch Substrate zu aktivieren (Broderick *et al.*, 2014). Eine wichtige Funktion von Radikal SAM–Enzymen ist die tRNA–Modifizierung (Landgraf *et al.*, 2016). Diese beinhaltet die tRNA–Faltung und –Stabilität, sowie die Aufrechterhaltung der Translationsgenauigkeit. Ein weiterer Durchbruch in der Forschung war die Entdeckung von [4Fe–4S]–Clustern in Helikasen. Helikasen sind essentielle Komponente, die bei der DNA–Replikation, –Rekombination, –Reparatur und –Transkription wirken und in Archaeen, Eukaryoten und Prokaryoten konserviert vorliegen. Die eukaryotische DNA–Helikase XPD (*xeroderma pigmentosum group D*; Rad3 in *S. cerevisiae*) besitzt einen [4Fe–4S]–Cluster der notwendig für die Aktivität und der DNA–Reparatur ist. Die DNA–Helikase XPD entfaltet die DNA–Doppelhelix an geschädigten Stellen, um die DNA–Reparatur mit anderen assoziierten Proteinen zu ermöglichen. Mutanten von XPD, die keinen Eisen–Schwefel–Cluster besitzen, können die DNA–Helikasenfunktion nicht aufrechterhalten (Rudolf *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Fuss *et al.*, 2015; Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2016). Eisen–Schwefel–Cluster spielen auch als Sensoren und Regulatoren eine wichtige Rolle bei der Genexpression. Hierbei sind sie in der Lage Faktoren, wie molekularen Sauerstoff oder reaktive Sauerstoffspezies ROS (*reactive oxygen species*), nitrosativer Stress und den Eisenstatus der Zellen zu erfassen und Genexpressionen zu modulieren. Durch die andauernde Forschung auf dem Gebiet, steigt die Zahl der neuen Eisen–Schwefel–Proteine weiter an. Jedoch ist die Funktion des Clusters oft nicht eindeutig. Für Proteine die im Zellkern lokalisiert sind und an dem DNA–Metabolismus beteiligt sind, geht man oftmals davon aus, dass die Funktion die Erhaltung der strukturellen Integrität des Proteins ist. Dies trifft beispielsweise auf Nukleasen und DNA–Polymerasen zu. Die DNA–Polymerasen benötigen den [4Fe–4S]–

## Einleitung

Cluster zur Stabilisierung der C-terminalen Domäne und um dadurch aktive Komplexe zu bilden. Der Cluster hilft außerdem bei der Aufrechterhaltung der katalytischen Polymerasen-Untereinheiten. Bei Abwesenheit des Clusters wird der Polymerasenkomplex instabil und es kommt zum Verlust der Untereinheiten und der damit einhergehenden Beeinträchtigung der Replikationsfunktion (Netz *et al.*, 2012; Prindle *et al.*, 2012). Ein Beispiel, bei dem die Eisen-Schwefel-Cluster nicht nur zum Erhalt der Stabilität dienen, sondern noch weitaus mehr Funktionen übernehmen, ist Rli1 (ABCE1 in humanen Zellen). Den Namen Rli1 bekam das Protein von der zuerst entdeckten Eigenschaft die RNase-L Aktivität des natürlichen Immunsystems zu hemmen: RNase-L Inhibitor (Rli1) (Bisbal *et al.*, 1995). Rli1 ist ein Mitglied der ABC (*ATP-binding cassette*) Enzyme, essentiell und hoch konserviert in Eukaryoten. Es besitzt zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBDs), eine Hinge Domäne und zwei am N-Terminus lokalisierte [4Fe-4S]-Cluster. Die ATPase Rli1 weist eine Kopf-zu-Schwanz Anordnung der beiden NBDs auf, die durch die Hinge Domäne miteinander verbunden sind. Sie bilden das aktive Zentrum, an dem die ATP-Spaltung erfolgt. Dabei wird durch die Bindung von ATP eine Art Klick-Bewegung des Eisen-Schwefel-Clusters eingeleitet und die ATP Hydrolyse vollendet. Durch diese Klick-Bewegung wird chemische Energie in mechanische Kraft umgewandelt, die nötig ist um die Ribosomen in ihre ribosomalen Untereinheiten zu spalten. Ribosomen Recycling ist nur eine der Funktionen von Rli1. Weitere Studien deuten darauf hin, dass Rli1 auch eine wichtige Rolle während der Translation und der Ribosomenbiogenese spielt (Paul *et al.*, 2015b; Beißel *et al.*, 2019; Yarunin *et al.*, 2005).

## 1.2 Ribosomen

### 1.2.1 Vorkommen und Funktion von Ribosomen

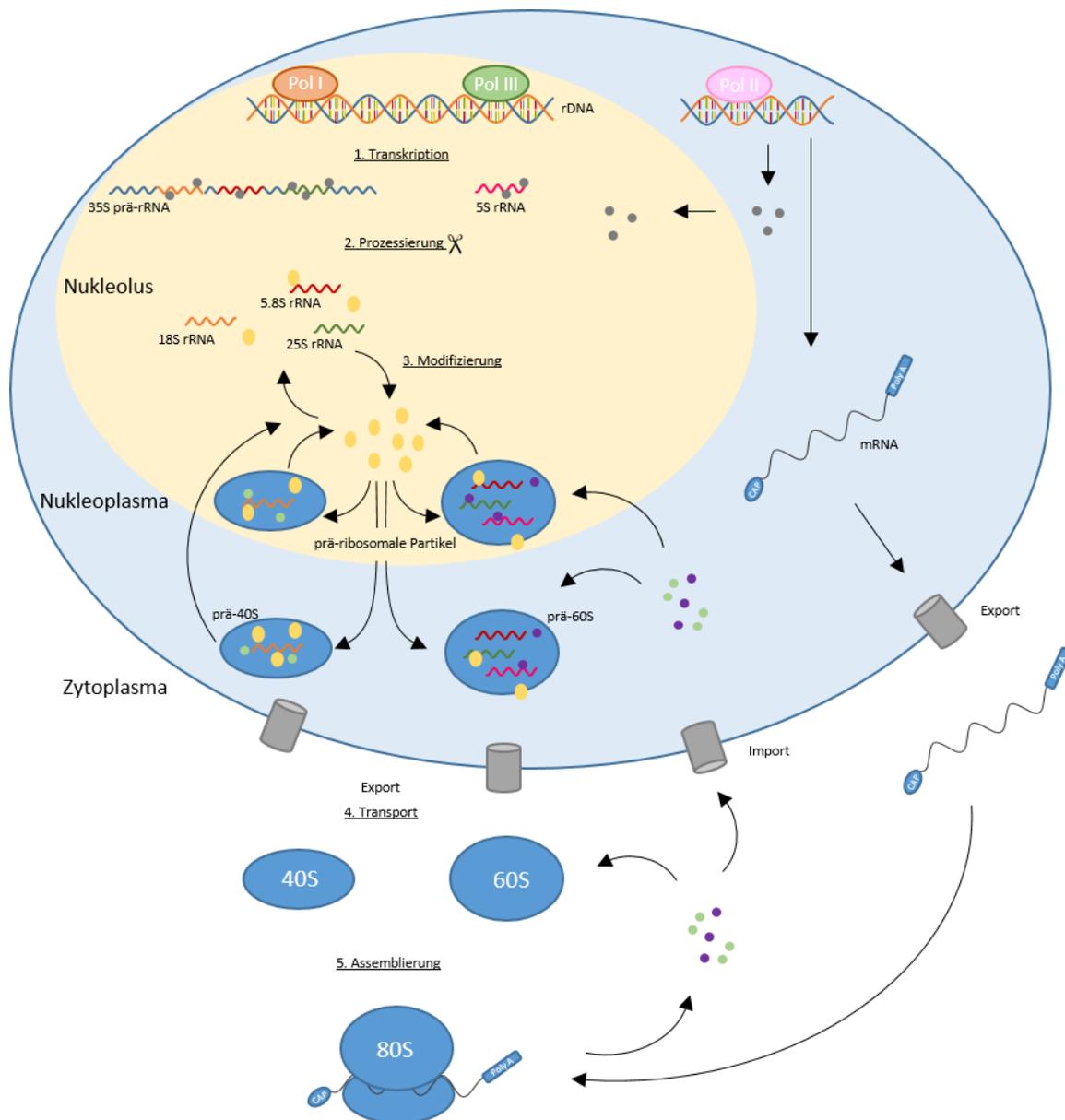
Ribosomen sind makromolekulare Maschinen die eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese einnehmen. Bei der Proteinbiosynthese sind Ribosomen für die Translation des genetischen Codes und der katalytischen Bildung der Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren zuständig. Unter der Verwendung von aminoacylierter *transfer* RNA (tRNA) wird die genetische Information der *messenger* RNA (mRNA) Vorlage in Aminosäuren übersetzt und führt anschließend zur Polypeptid-Bildung. Die somit geregelte Herstellung von Proteinen beeinflusst Zellen maßgeblich in ihrer Struktur, ihrer Funktion und ihrem Wachstum (Cech, 2000).

### 1.2.2 Biosynthese eukaryotischer Ribosomen

Eukaryotische Ribosomen assemblieren aus einer großen 60S und einer kleinen 40S Untereinheit, die beide aus ribosomalen Proteinen und rRNA bestehen, und als Gesamtheit das 80S Ribosom bilden (Ben-Shem *et al.*, 2011). Die kleine Untereinheit beinhaltet eine 18S rRNA (1800 Nukleotide) und ist hauptsächlich für die Erkennung und Bindung der mRNA zuständig. Sie sorgt hierbei für eine korrekte Codon–Anticodon–Wechselwirkung zwischen der mRNA und der tRNA. Die große Untereinheit bindet die tRNAs und beinhaltet drei rRNAs, 25S (3396 Nukleotide), 5.8S (158 Nukleotide) und 5S (121 Nukleotide) (Konikkat *et al.*, 2017). Sie bilden das innere Gerüst und das katalytische Zentrum der Ribosomen. Ca. 80 ribosomale Proteine sitzen an diesen rRNAs und sind für die richtige Faltung und Stabilität der Untereinheiten zuständig (Black *et al.*, 2021). Die große Untereinheit besitzt das Peptidyl–Transferase Zentrum (PTC), welches ausschließlich aus rRNA besteht. In diesem Zentrum werden die von der tRNA abgelieferten Aminosäuren kovalent an die heranwachsende Polypeptid–Kette verknüpft (Kargas *et al.*, 2019). Die Biogenese von Ribosomen in *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Eukaryoten ist ein hoch komplexer Prozess mit zahlreichen Reifungsschritten. Hierbei verwenden Eukaryoten bis zu 80 % der gesamten synthetisierten RNA der Zelle für die Herstellung von Ribosomen (Moss *et al.*, 2002). Für den Zusammenbau und die Reifung von Ribosomen wird das Zusammenspiel aller drei RNA Polymerasen, über 200 Biogenesefaktoren, wie zum Beispiel AAA+–Typ ATPasen, GTPasen, RNA–Helikasen und –Kinasen, ribosomale Proteine (rProteine) und rRNAs, sowie ~ 80 kleine

## Einleitung

nicht codierende nukleare RNAs (*small nucleolar RNAs* = snoRNAs) benötigt (Hage *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2013; Baßler *et al.*, 2019). Der gesamte Prozess der Ribosomenbiogenese lässt sich in fünf Hauptphasen unterteilen (Abbildung 3).



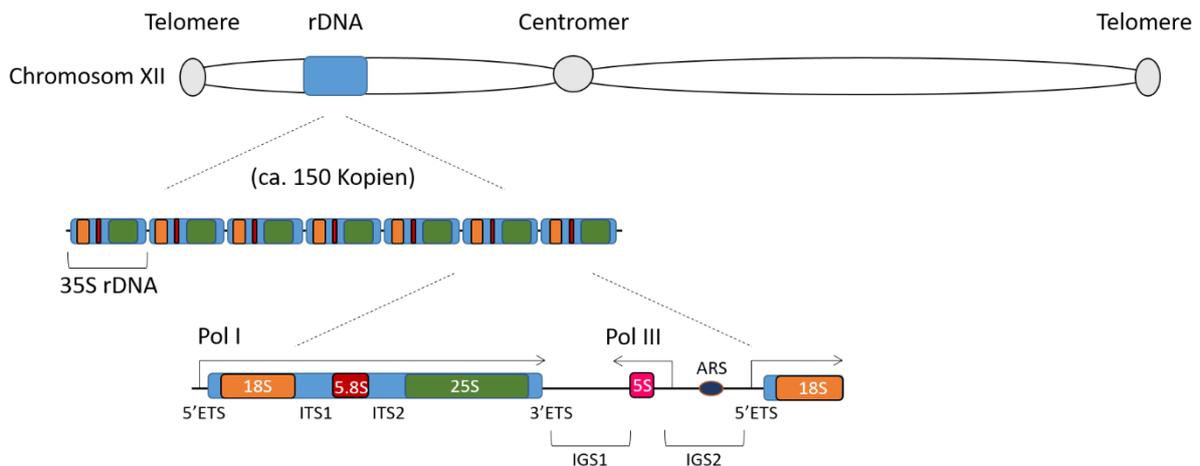
**Abbildung 3: Vereinfachtes Modell der Synthese der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit.**

● snoRNAs, ● rProteine (RPs und RPI), ● Assemblierungsfaktoren (Biogenesefaktoren)

Die Ribosomenbiogenese erfolgt hauptsächlich im Nukleolus (eingefärbt in hell braun). Hierbei synthetisiert die RNA-Polymerase I die 35S prä-rRNA und die RNA-Polymerase III die 5S rRNA. Im Nukleoplasma (eingefärbt in hell blau) werden snoRNAs und mRNAs von der RNA-Polymerase II hergestellt. Während der Transkription wird die prä-rRNA prozessiert und modifiziert. Durch die Anlagerung von ribosomalen Proteinen und Assemblierungsfaktoren werden prä-ribosomale Partikel gebildet, die nach weiteren Reifungsschritten ins Zytoplasma exportiert werden. Hier lagern sich reife 40S und 60S Untereinheiten zusammen und translatieren anschließend mRNAs in Proteine. Eigene Darstellung, abgeleitet nach Baßler, 2019.

Die Phase 1 beginnt im Nukleolus mit der Transkription der ribosomalen DNA (rDNA) durch die RNA-Polymerase I (Pol I). Der rDNA Locus liegt in *S. cerevisiae* auf dem Chromosom XII und enthält mehrere rDNA-Kopien hintereinander. Eine Hefezelle besitzt 150–200 solcher rDNA-Kopien, die bis zu 60 % des Chromosoms XII darstellen (Haeusler *et al.*, 2006). Eine rDNA-Kopie kodiert hierbei für eine 35S prä-rRNA, die die Sequenzen für die 18S, 5.8S und 25S rRNAs beinhalten. Diese Sequenzen werden von Pol I in ein einziges Transkript umgeschrieben. Zwischen den rDNA-Kopien sind zwei Trenn-DNA-Sequenzen enthalten, deren Zwischenraum den genetischen Code für die 5S rRNA enthält. Die Transkription dieser 5S rRNA erfolgt von der RNA-Polymerase III (Pol III), die überwiegend auch tRNAs transkribiert (Abbildung 4). (Leśniewska *et al.*, 2017; Salim *et al.*, 2017). Die dritte RNA Polymerase, die RNA-Polymerase II, ist für die Transkription der rProteine, der mRNA und den snoRNAs zuständig. Sie werden vom Zytoplasma in den Nukleolus, für die Assemblierung mit rRNAs, transportiert (Hein *et al.*, 2013). Die entstandene Vorläufer-rRNA (prä-rRNA) wird in den Phasen 2 und 3 prozessiert, durch Endo- und Exonukleasen vielfältig modifiziert und in katalytisch aktiven prä-ribosomalen Untereinheiten gefaltet (Kapitel 1.2.3). Hierbei durchlaufen die prä-ribosomalen Partikel viele Stadien mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen, aufgrund von Assoziation und Dissoziation früher und später ribosomaler Faktoren. Eine stabile Zusammensetzung durch die Assoziation von rProteine wird in Phase 4 für den Transport durch die Kernporen ins Zytoplasma benötigt. In der letzten Phase 5 erfolgt die Assemblierung der kleinen und großen Untereinheit im Zytoplasma zu einem funktionsfähigen Ribosom (Boisvert *et al.*, 2007). Mehr als 2000 Ribosomen werden so jede Minute neu in den schnell wachsenden Hefezellen synthetisiert. Eine Fehlregulation bei der Ribosomen-Assemblierung kann sich stark auf die Funktion des Organismus auswirken (Kobayashi, 2011; Woolford *et al.*, 2013).

## Einleitung



**Abbildung 4: Organisation des rDNA Genlokus in *S. cerevisiae*.**

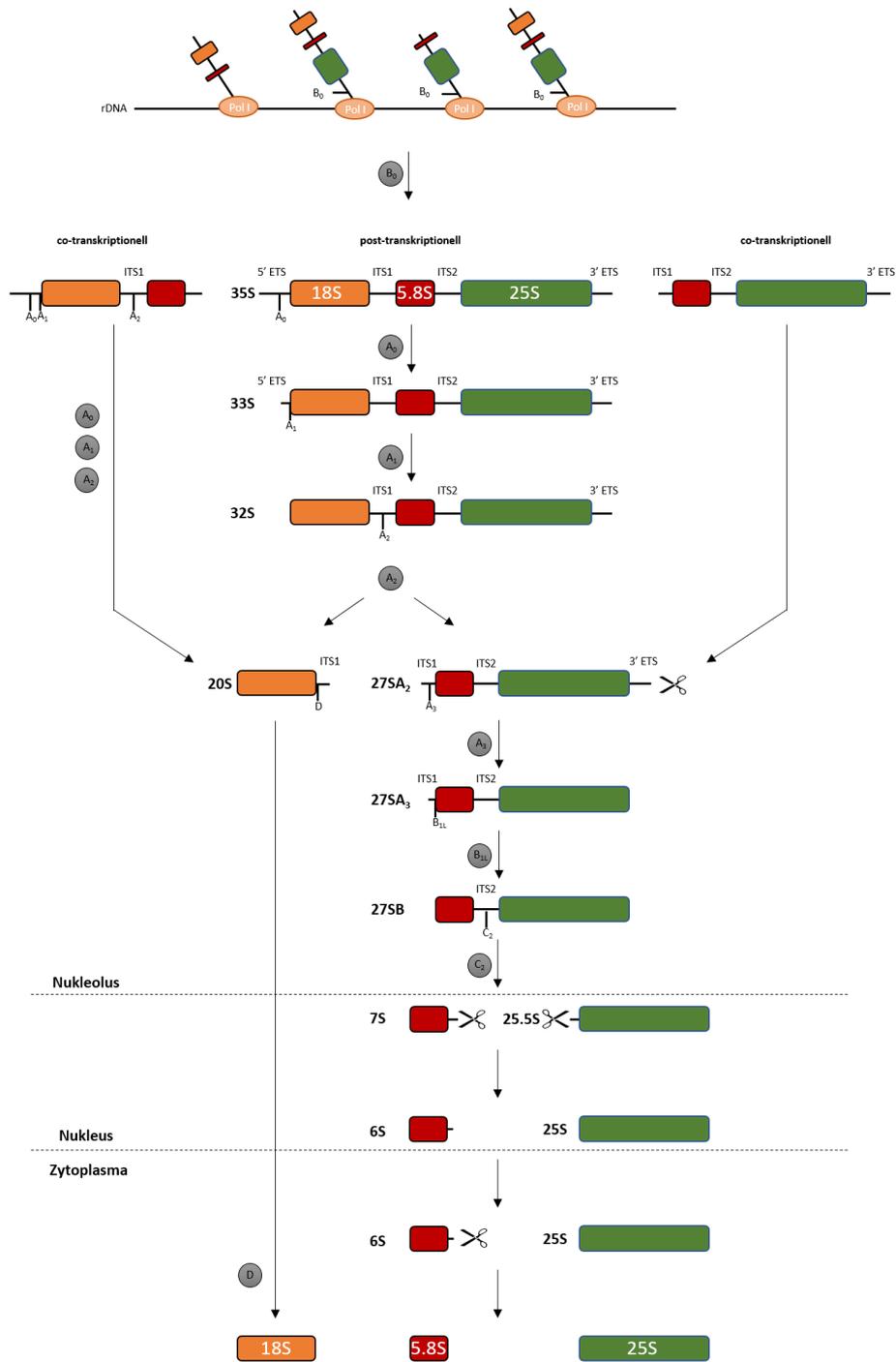
Die rDNA-Kopien (150–200, ~ 9,1 kb) sind auf dem Arm des Chromosoms XII lokalisiert. Eine einzelne rDNA Einheit beinhaltet die Gene der 35S und 5S rRNAs, die durch zwei Trenn-DNA-Sequenzen (IGS1 und IGS2) voneinander unterteilt sind. Hier transkribiert die RNA-Polymerase I (Pol I) die 35S-prä rRNA, welche zu den 18S, 5,8S und 25S rRNAs reift. Die RNA-Polymerase III (Pol III) synthetisiert die 5S rRNA. Eigene Darstellung, abgeleitet nach Kobayashi, 2011 und Woolford, 2013.

### 1.2.3 Prozessierung und Modifikation der Hefe prä-rRNA

Die Transkription der rDNA wird durch die RNA Polymerase I katalysiert. Diese besteht aus 14 Untereinheiten und bildet den Komplex, der mit einer bestimmten Anzahl an Initiations-Faktoren die rRNA transkribiert. Heutige Studien zeigen, dass die Prozessierung der prä-rRNA co-transkriptionell erfolgt (Klinge *et al.*, 2019). Es wird geschätzt, dass in Wildtyp Hefezellen 70 % der prä-rRNAs co-transkriptionell gespalten werden (Fernández-Pevida *et al.*, 2015). Hierbei durchlebt die rRNA eine Vielzahl von Modifikationsschritten, um die prä-rRNAs von sich selber und von ITS- und ETS-Regionen zu trennen. Diese Regionen werden durch Endo- und Exonukleasen entfernt, wofür unter anderem Proteine benötigt werden, die größtenteils in wichtige Cluster zusammengelagert sind. Zu diesen gehören zum Beispiel die snoRNPs, die entweder die Pseudouridylierung (H/ACA) oder die 2'-O-ribose-Methylierung (box C/D) der prä-rRNA katalysieren. Beide snoRNPs werden von snoRNAs gesteuert. Diese snoRNAs beinhalten charakteristische Sequenzabschnitte, welche von snoRNPs erkannt werden und zur Bindung dieser führen. Die snoRNAs besitzen außerdem die komplementären Basen zur Bindung der Ziel-RNA (Chen *et al.*, 2020). Eine der wohl bekanntesten snoRNAs ist die U3 box C/D snoRNA. An ihr bildet sich ein wichtiger Chaperonkomplex. Dieser ist essentiell für die

Initiierung der Spaltung der frühen 18S Vorläufer rRNA und somit ein wichtiger Bestandteil für die Assemblierung der kleinen ribosomalen Untereinheit. Durch die Bindung der U3 box C/D snoRNA an die 35S prä-rRNA, kann die Spaltung an den A<sub>0</sub>-, A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Spaltungsstellen durch Nukleasen erfolgen und die 20S prä-rRNA wird freigesetzt (Abbildung 5) (Sharma *et al.*, 1999). Für langsam wachsende Zellen, bei denen die Prozessierung post-transkriptionell erfolgt, folgt eine weitere Spaltung der Spaltungsstelle A<sub>3</sub>, initiiert von der RNase MRP, wodurch dann die 23S prä-rRNA freigesetzt wird. Für die weitere Prozessierung der 20S und der 23S prä-rRNA ist das Wiederlösen der snoRNAs mittels RNA Helikasen notwendig. Durch Exosome und Exosom-Interaktionsproteine wird das 5' ETS-Ende von der 23S prä-rRNA entfernt und liefert somit die reife 18S rRNA (Klinge *et al.*, 2019). Die Prozessierung der großen ribosomalen Einheit benötigt unter anderem ebenso die Spaltung an der A<sub>3</sub>-Spaltungsstelle. Durch *in vivo* UV-Crosslinking konnte eine Quervernetzung von Rrp5 nahe der A<sub>3</sub>- und A<sub>2</sub>-Spaltungsstelle in der ITS1-Region beobachtet werden. Hierbei bindet der C-Terminus von Rrp5 nahe der A<sub>2</sub>-Spaltungsstelle und ist dadurch sowohl für die 18S rRNA Synthese als auch, durch die Bindung des N-Terminus nahe der A<sub>3</sub>-Spaltungsstelle, für den Syntheseweg der 5.8S und 25S rRNA verantwortlich. Durch diese Protein-RNA-Wechselwirkung wird vermutlich die Spaltung der kleinen und großen Untereinheit zeitlich reguliert (Woolford *et al.*, 2013; Lebaron *et al.*, 2013). Diese Spaltungen führen zum 27SB prä-rRNA Intermediat und für die Prozessierung der großen ribosomalen Untereinheit werden unter anderem drei weitere Nukleasenkomplexe benötigt, die die ITS2-Region entfernen. Die Endonuklease Las1 schneidet hierbei an der C<sub>2</sub>-Spaltungsstelle in der ITS2-Region und setzt dabei die Vorläufer rRNAs 7S und 25.5S frei. In weiteren Schritten werden durch Nukleasen Nukleotide an der prä-rRNA gekürzt. Hierbei aktiviert die Kinase Grc3 die Nukleasen Rat1 und Rail1, die die 25.5S Vorläufer rRNA zu der reifen 25S rRNA trimmen (Klinge *et al.*, 2019). Ein Multimer-Proteinkomplex, das Exosom entfernt Nukleotide und bildet die 6S prä-rRNA. Durch die Prozessierung des Nukleasenkomplexes Ngl2 und Rex1-3 entsteht daraufhin im Zytoplasma die reife 5.8S rRNA (Abbildung 5) (Thomson *et al.*, 2010; Sterrett *et al.*, 2021). Die rRNA Prozessierung ist mit der hierarchischen Einbindung von ribosomalen Proteinen verknüpft und hängt stark mit der Rekrutierung von ribosomalen Assemblierungsfaktoren ab.

# Einleitung

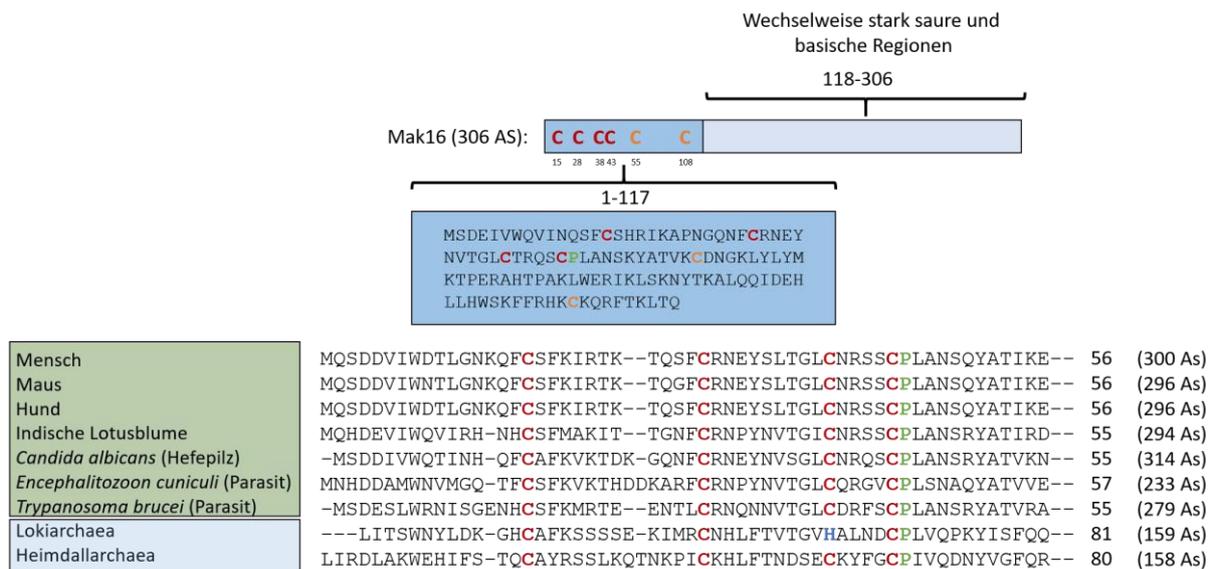


**Abbildung 5: Schema der Prozessierung der 35S prä-rRNA in *S. cerevisiae*.**

Dargestellt werden post- und co-transkriptionelle Modifikationsschritte der rRNA. Hierbei enthält die 35S prä-rRNA die Sequenzen der reifen 18S, 5,8S und 25S rRNAs mit zusätzlichen internen und externen Regionen. Im Zuge der Prozessierung erfolgen nach und nach Spaltungen an den angegebenen Spaltungsstellen  $\bullet$  und durch Nukleasen  $\text{✂}$  werden überschüssige Nukleotide entfernt. Durch die Spaltung an der Spaltungsstelle  $A_2$  resultieren die 20S und 27S A<sub>2</sub> prä-rRNA Sequenzen. Die weitere Reifung der großen Untereinheit im Nukleolus, Nukleus und Zytoplasma liefern die 5.8S und 25S rRNA. Die 20S prä-rRNA wird ins Zytoplasma exportiert und durch die Entfernung der internen transkribierten Region, entsteht die 18S rRNA. Eigene Darstellung, abgeleitet nach (Klinge et al., 2019).

### 1.3 Mak16

Im Jahr 1963 entdeckten Bevan und Makower das sogenannte Killerphänomen in einem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm, welcher aus einer Brauerei–Verunreinigung stammte. 1979 konnten die dafür verantwortlichen MAK–Gene (*MA*intenance of *K*iller), darunter MAK16, identifiziert werden, die für die Vermehrung linear doppelsträngiger RNA (dsRNA) virusähnlicher Partikel notwendig sind (Wickner *et al.*, 1979; Schmitt *et al.*, 2002). Bis heute ist die genaue Funktion von Mak16 noch ungeklärt, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass das Protein eine wichtige Rolle im Zellkern an der Reifung von der prä–rRNA übernimmt (Pellett *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* Mak16 besteht aus 306 Aminosäuren und weist eine berechnete Masse von 35,69 kDa auf (Wickner, 1988). Es besitzt eine schwache Sequenzähnlichkeit mit der 60S ribosomalen L28e Proteinfamilie im N–Terminus (1–117 Aminosäuren), wohingegen der C–Terminus von Mak16 abwechselnde Regionen aus hoch–basischen und –sauren Segmenten besitzt. Der N–Terminus beinhaltet eine Cystein–Abfolge mit einem abschließenden Prolin, nach folgendem Motiv CX<sub>11–13</sub>CX<sub>9</sub>CX<sub>4</sub>CP.

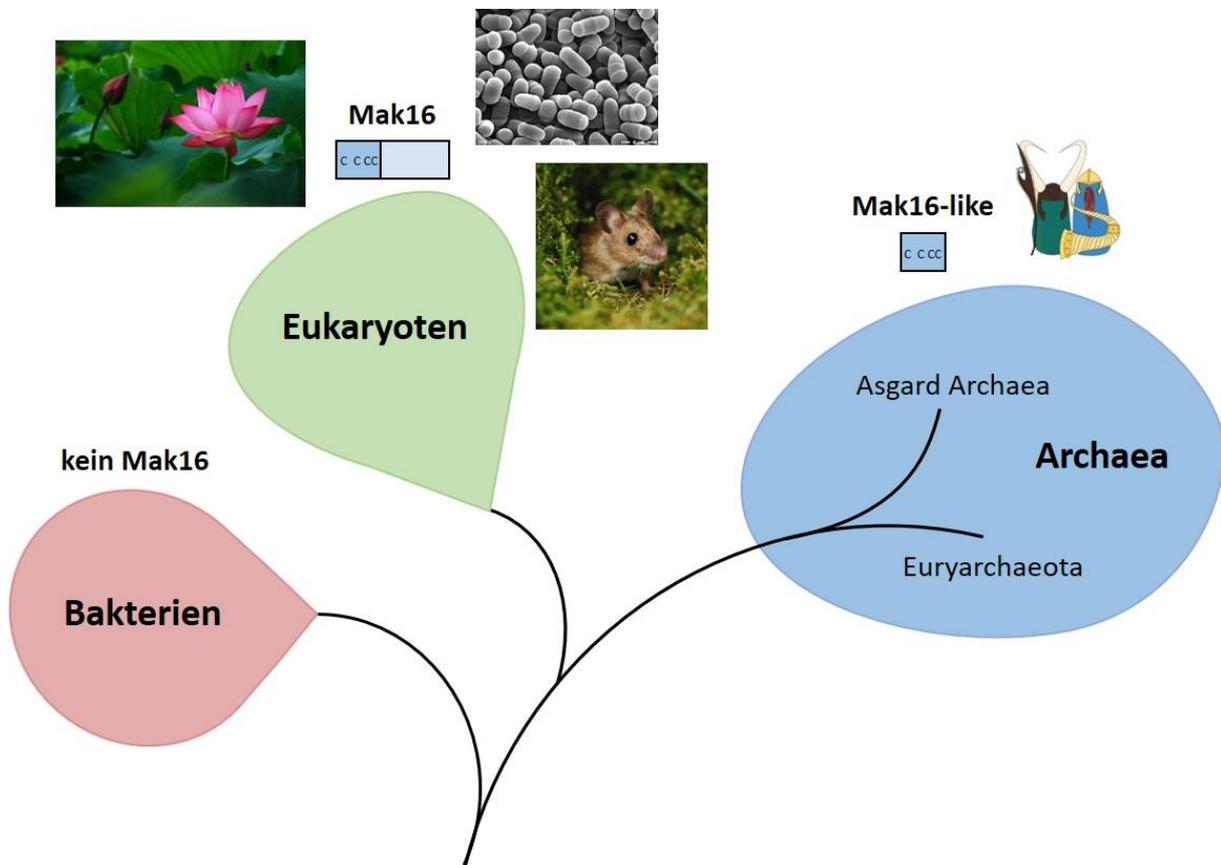


**Abbildung 6: Schematische Darstellung des zwei-Domänen Proteins Mak16.**

Oben: Im N–Terminus sind die vier konservierten Cysteine an den Positionen 15, 28, 38 und 43 in rot aufgezeigt. Weniger konservierte Cysteine sitzen an den Stellen 55 und 108 und sind in orange gekennzeichnet. Unten: Gezeigt ist die Sequenzübereinstimmung von *Saccharomyces cerevisiae* Mak16 mit verschiedenen Kandidaten aus allen Bereichen des Lebens. Grüner Kasten: Eukaryoten und blauer Kasten: Asgard Archaeen. Das hochkonservierte Cysteinmotiv wurde in rot und das abschließende Prolin in grün aufgezeigt.

## Einleitung

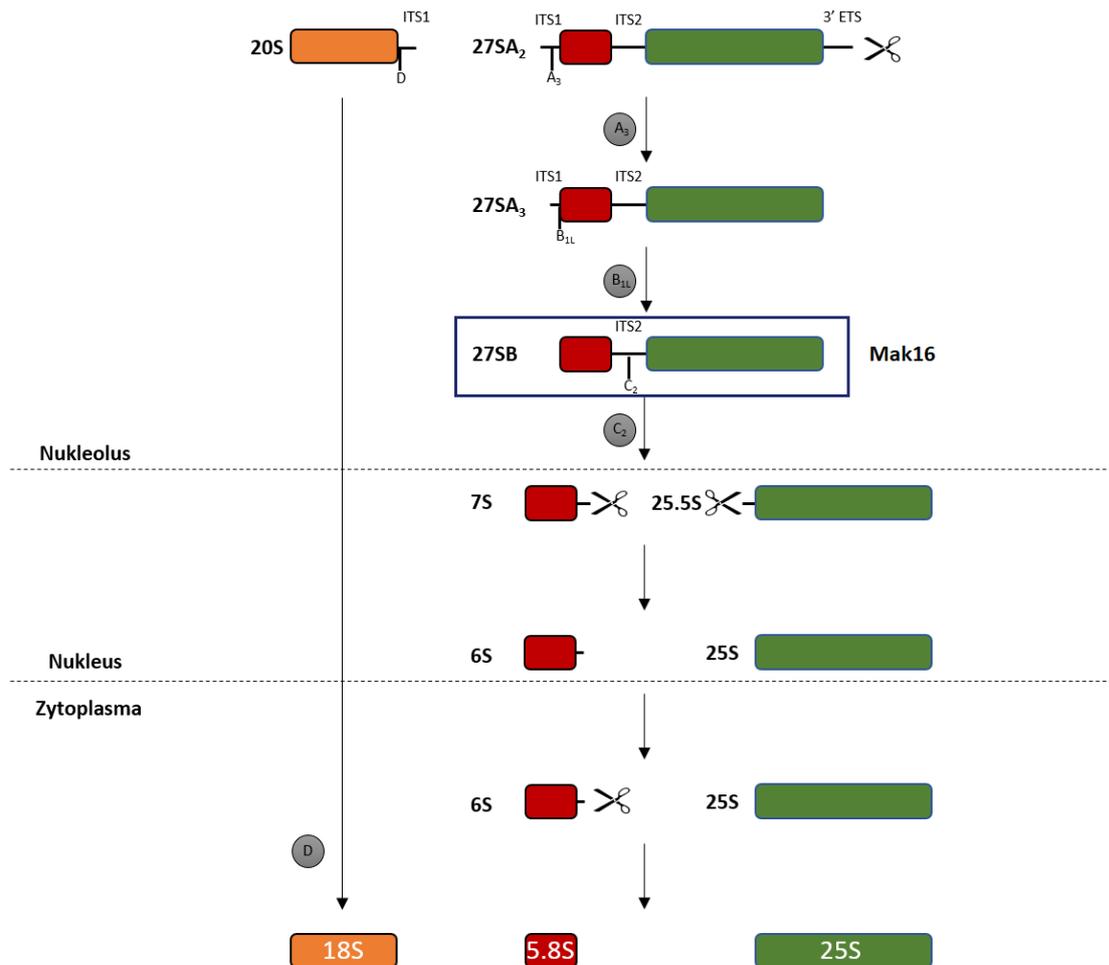
Hierbei zeigen eukaryotische Mak16- und Asgard-Archaea-Mak16-like Proteine eine außerordentlich hohe Konservierung des Cystein-Motives auf, was für eine fundamentale Funktion von Mak16 an einem konservierten Prozess in einigen Bereichen des Lebens nahelegt.



**Abbildung 7: Eine hypothetische Variante des phylogenetischen Baums.**

Dieser Baum wurde aufgrund von phylogenetischen Untersuchungen von Asgard RNA-Polymerasen-Genen erstellt und unterstützt die hochdiskutierte drei Domänen Topologie vom Baum des Lebens. Hierbei werden die Asgard Archaeen als eine Schwestergruppe der Euryarchaeota bezeichnet. Eigene Darstellung nach MacLeod et al., 2019. Bilder adaptiert: Loki- und Heimdallskizze: **Fernandez-Caceres** (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017), Waldmaus: (**Welt.de**), indische Lotusblume: (**Gartenbista**), Spaltheife: (**Card2Brain**).

Polysom-Vergleichsstudien vom Wildtyp und temperatursensitiven MAK16 Stamm, welcher eine Cystein- zu Tyrosin-Mutation an der 38 AS beinhaltet, zeigten einen Defekt in der Assemblierung der 60S ribosomale Untereinheit beim Mutanten-Stamm. Die Mengen an 25S und 5.8S rRNA waren dabei stark reduziert. Besonders die Menge des 27S-B Intermediates war hierbei außergewöhnlich niedrig und das 27S-A3 Intermediat zeigte einen leichten Anstieg. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass Mak16 an der Stabilisierung der 27S-B prä-rRNA beteiligt ist (Pellett et al., 2006).

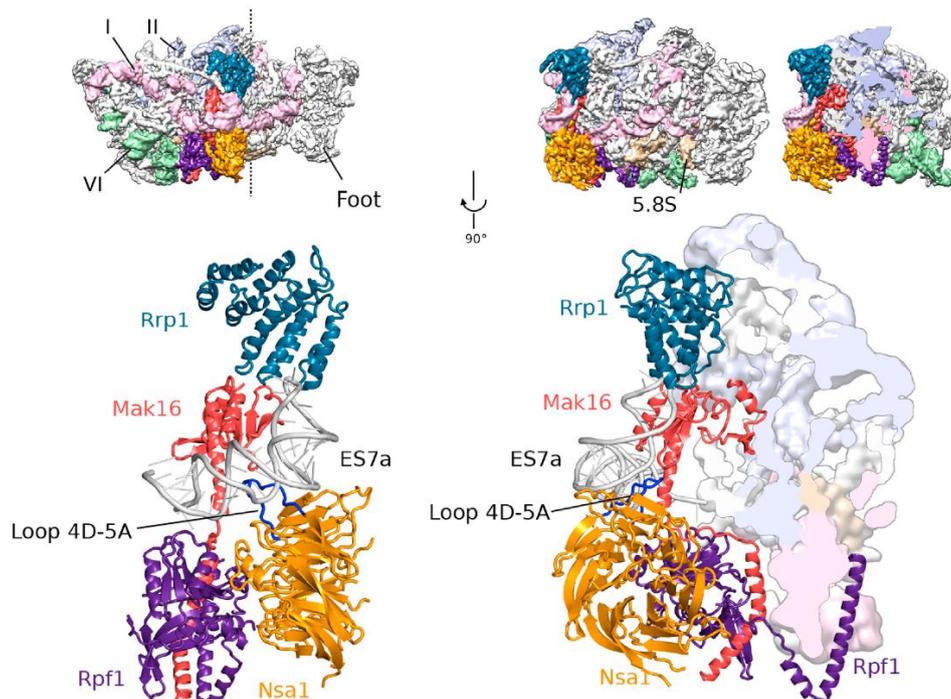


**Abbildung 8: rRNA Assemblierung mit der möglichen Stabilisierungsfunktion von Mak16.**

Anhand von Temperatursensitiven-Studien konnte eine mögliche Wirkweise von Mak16 am 27SB prä-rRNA Segment vorgezeigt werden (Pellett *et al.*, 2006). Eigene Darstellung, abgeleitet nach Klinge *et al.*, 2019.

Durch verschiedenste TAP-Aufreinigungen konnte gezeigt werden, dass Mak16 als ein früher Assemblierungsfaktor bei der Ribosomenbiogenese im Nukleolus beteiligt ist. Zusammen mit Rpf1, Nsa1 und Rrp1 bildet Mak16 das Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul und binden an die Verbindungsregion der Domänen I und II in der großen ribosomalen 60S Untereinheit. In späteren nukleoplasmischen prä-60S Stadien wurden diese Assemblierungsfaktoren nicht mehr vorgefunden. Die AAA+-Typ ATPase Rix7 entfernt Nsa1 und initiiert damit die Dissoziation des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls (Kressler *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2017; Kater *et al.*, 2017).

## Einleitung



**Abbildung 9: Kryo-EM-basierte Modellierung des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls.**

Das Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul besteht aus den Proteinen Mak16 (rot), Nsa1 (orange), Rpf1 (lila), und Rrp1 (blau) verbunden mit dem ES7a-Expansionssegment der RNA (hellgrau). Oben: Lokalisierung des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls und der RNA Domänen I, II und VI im prä-60S ribosomalen Partikel. Unten: Auszug des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls. (Kater *et al.*, 2017).

Mak16 nimmt hierbei die zentrale Rolle im Modul ein und besteht aus einem knotenähnlichen N-Terminus, einer zweischichtigen mittleren Domäne und einer verlängerten  $\alpha$ -Helix am C-Terminus. Die mittlere Domäne steht in direkter Verbindung mit dem Expansionssegment ES7a der rRNA und die  $\alpha$ -Helix bindet an das Brix-Domänprotein Rpf1 (Zhou *et al.*, 2019).

Die heutige Forschung zeigt, dass Mutationen von Proteinen, die den Erhalt der ribosomalen Struktur und die ribosomalen Funktionen gewährleisten, für die Entwicklung zahlreicher Krebsarten verantwortlich sind. Hervorzuheben sind hierbei Mutationen in MAK16, die das Stoppen des Zellzyklus in der G1 Phase verursachen. In dieser Phase stellt die Zelle mRNA und Proteine für die Zellteilung her (Vicuña *et al.*, 2019). Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen. Der Vergleich von Protein-Protein-Interaktionsstudien von 18 unterschiedlich exprimierten Proteinen, zwischen SLE Patienten und gesunden Freiwilligen, deutet an, dass diese 60S ribosomalen Proteine miteinander und mit Mak16 interagieren. Dies lässt darauf schließen, dass Mak16-IgG Antikörper wahrscheinliche gute Biomarker für die Diagnose von SLE wären. Anhand von Mikroarray

Experimenten konnten erstmals anti-MAK16 Antikörper mit SLE in Verbindung gebracht werden. Weitere Studien müssen nun die Funktion dieser Antikörper in dem krankheitserregenden SLE Prozess und den dazugehörigen Gewebeschäden genauer untersuchen (Ling *et al.*, 2020).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Im Folgenden soll nun auf das essentielle Hefe-Protein Mak16, ein neues noch unbekanntes Eisen-Schwefel-Protein, eingegangen werden, welches als Assemblierungsfaktor an der Reifung der 60S-rRNA in der Ribosomenbiogenese beteiligt ist. Vorläufige Ergebnisse zeigen die Anwesenheit eines essentiellen Eisen-Schwefel-Zentrums in eukaryotischen und humanen Mak16-Proteinen (Wittmaack (Duppe), 2018). Mittels Struktur- und Funktionsstudien von Mak16-Proteinen *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* wird die Auswirkung von geschwächten CIA-Maschinenproteinen in Verbindung mit einer eingeschränkten Eisen-Schwefel-Cluster-Koordination in Mak16-Mutanten auf den Phänotyp und dabei das Konzept der synthetischen Letalität untersucht. Durch die biochemische Charakterisierung von Mak16-Proteinen *in vitro*, soll die die Rolle des Eisen-Schwefel-Clusters in Mak16 und dessen Funktion in der Ribosomenbiogenese erforscht werden. Die Methoden umfassen dabei die UV/Vis-, ESR- und Mößbauer-Spektroskopie. Um die Essentialität des Eisen-Schwefel-Clusters von Mak16 für die Komplex-Bildung mit seinen Interaktionspartnern zu untersuchen, soll die Protein-Protein-Wechselwirkung mittels Immunopräzipitation von Wildtyp-Mak16 und Eisen-Schwefel-beeinträchtigten Mutanten durchgeführt werden. Ein einzigartiges Merkmal von Mak16 ist die stark basische C-terminale Domäne, die auf eine rRNA-Bindung hindeutet. Dieser Aspekt wird im Rahmen von Protein-RNA-Bindestudien mittels EMSA-Interaktionsassay (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) untersucht. Diese Forschung an Mak16 ist entscheidend, um die Rolle des Eisen-Schwefel-Clusters in der Ribosomenbiogenese auf molekularer Ebene zu verstehen.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Absorptions-Mikrotiterplatten-Lesegerät	ELx808™, BioTex
	Breath-Easy®, Diversified Biotech
Agarosegelkammer	Tetra Vertical Electrophoresis Cell Biostep®, Mini-Protean®,
Anaerobe Glove Box (Anaerobes Zelt)	Laboratory Products®, Coy
Autoklav	LVSA40/60, Zirbus
Brutschränke	Heratherm™ IMC 18, Thermo Scientific
	Heratherm™ IGS 100, Thermo Scientific
	INCU-LIN®, VWR
Chromatographiesystem	Äkta Start™, GE Healthcare
Digitalkamera	IXUS 155, Canon
Eismaschine	AF 80, Scotsman
Elektroden	InLab™ Easy-pH-Elektrode, Mettler Toledo™
	InLab™ Micro-pH-Elektrode, Mettler Toledo™
	InLab™ Redox Micro-Elektrode, Mettler Toledo™
Elektrophorese-Spannungsquelle	Power PAC™300, Bio-Rad
	Power Source 300V, VWR®
ESR und Zubehör	Bruker 122SHQE-W1/1017 Cavity
	Bruker Elexsys E580 Electron Paramagnetic
	Bruker ER 167FDS-Q Fingerdewar
	Bruker Netzteil ER 082 (155/45)
	Bruker Pulsed Microwave Bridge E580-1010
	Oxford Instrument ESR 900 helium continuous-flow cryostat Resonance Console

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Fraktionssammler	SC100, Beckman
	Frac30, GE Healthcare
Geldokumentationssystem	Fusion SL Lourmat, Vilber
	UPP 110, Sony
Geltrocknungsrahmen, MAXI-Set	Roth
Magnetrührer	IKA KMO 2, Janke & Kunkel
Mikrowelle	W401, Privileg
Mössbauer und Zubehör	CRYO Industries of America Inc. Helium closed-cycle Kryostat
	OptistatDN Stickstofffluss-Kryostat
	Oxford Instruments
	WissEl GmbH Analyser
Multipipette	12-Channel 5-50 µl, Flow Titertek
	12-Channel 50-300 µl, Flow Titertek
pH-Meter	pH 522, WTW
Pipetten	Research® plus 10, 100, 200, 1.000 µl, Eppendorf
Pipetboy	Accu-jet®pro, Brand
Pumpen	ProSilent a50, JBL GmbH & Co. KG
	Peristaltikpumpe P-1, Pharmacia Biotech
Redoxtitration	Seven Excellence™ Multiparameter, Mettler Toledo
Reinstwassersystem	Arium® pro VF Ultrapure Water System, Sartorius
Rotoren	Rotator SB3, Stuart™
	JA-10, Beckman
	JLA-8.1, Beckman
	JA-25.50, Beckman
	A-4-62, Beckman
	F-35-6-30, Beckman

## Materialien

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Schüttler/Inkubatoren	Excella E25®, New Brunswick
	Innova 4000, New Brunswick
	MaxQ™ 4000, Thermo Scientific
	Multitron Pro, INFORS HT
Schwingmühle	MM 400, Retsch
Spülmaschine	Mielabor Automatic G7733, Miele
	Professional PG 8581 mit PG 8596 AE Dosierschrank, Miele
Sterilbank	LaminAir HB 2448, Heraeus Instruments
	Msc-Advantage™, Thermo Scientific
Sonikator/Ultraschall-Homogenisator	Typ UW 2200 mit SpitzeK76, Bandelin electronic
Thermocycler	PCR Sprint Thermal Cycler, Hybaid Limited
	T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad
Thermomixer	<i>ThermoMixer® comfort™</i> , Eppendorf
	Thermomixer® 5436™, Eppendorf
Trockenschrank	T 5050, Heraeus
	KTG 800, Heraeus
UV/Vis-Spektrophotometer	Bio Photometer plus, Eppendorf
	UV-1280, Shimadzu
	UV-1900i UV-VIS, Shimadzu
	Genesys 10S™, Thermo Scientific™
Vortexer	RS-VA 10, Phoenix Instrument
	Minishaker MS1, IKA™
Waagen	L 610 D, Sartorius
	Feinwaage excellence, Mettler Toledo™
Western-Blot Turbo Transfer System	Trans-Blot®, Bio-Rad
Wippschüttler	Rocker 3D digital, IKA™

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Zentrifugen	Coulter Avanti®, Beckman
	J2–21 M/E, Beckman
	Centrifuge 5430 R, Eppendorf™
	5810 R, Eppendorf™
	MicroStar 17, VWR
	MicroStar 17R, VWR

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Bezeichnung
Cellophanbögen	Roth
Einmal–Mikropipette (96–Well)	Sarstedt
Einmal–Küvetten (1,5 ml halbmikro PS)	Sarstedt/Brand
Einwegimpfösen	Sarstedt
Eppendorf VIS/Küvetten	Sarstedt
Spritzenfilter 0,22 µm	Sarstedt / VWR
Spritzenfilter 0,45 µm	GE Helathcare
Glasperlen	Roth, 0,75–1,0 mm
Gummiwischer	Deutsch und Neumann
Kryoröhrchen 2,0 ml	Sarstedt
Open–Top Thinwall Polypropylen Zentrifugationsröhrchen	Beckman
Parafilm M	Bemis, WI 54956
Pasteurpipetten	Roth
Petrischalen ((ØxH) 92 x 16 mm, 150 x 20 mm)	Sarstedt
PD10–Säulen	GE–Healthcare
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Ultratip
Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio–one, 14 ml PP Tube Steril runder Boden

## Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Bezeichnung
Präzessionswischtücher	Kimtech Science, Kimberly Clark
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Cellstar Tubes, Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-one
Reaktionsgefäße PCR-Tubes	Greiner Bio-one
Rosettenzelle	Spezialanfertigung Glasbläserei TUK ähnlich zu Bandelin RZ2
Spritzen (5 ml, 10 ml, 50 ml)	B. Braun
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Ultrafiltrationseinheit	Pall, Macrosep Centrifugal Devices 10 K / 30 K
UV-Küvetten	Brand
Western-Blot Filterpapier	Thermo Scientific, Extra Thick Western Blotting (20 x 20 cm)
Western-Blot Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Amersham Protran NC (0,45 µm) 30 cm x 4 m

## 2.3 Software

**Tabelle 3: Software**

Software	Anwendung	Hersteller
AlphaFold	Proteinstruktur-Datenbank	Deepmind
BIOVIA Discovery Studio Visualizer	Simulierung und Modulierung von Proteinen	Dassault Systèmes
Chromas	DNA-Sequenz-Analyse	Technelysium (online)
Clustal Omega	DNA-Sequenz-Vergleich	EMBL-EBI
ExPASy	Gen → Protein Translation	SIB Swiss Institute of Bioinformatics
Labsolution UV/Vis	UV/Vis-Spektrophotometer	Shimadzu
Unicorn	Chromatographiesystem	GE Healthcare
VisionCapt	Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
VISIONLite	UV/Vis-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Xper	ESR-Spektrometer	Bruker

## 2.3 Chemikalien

**Tabelle 4: Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
Aceton	VWR Chemicals
Adeninsulfat	Sigma–Aldrich
Agar–Agar	Roth
Agarose LE	Genaxxon Bioscience
Agarose LE Molecular Biology grade, Ultrapure	Thermo Scientific
Ammoniak	Kraft
Ammoniumacetat	Riedel de Haen
Ammoniumeisen(II)–sulfat (Mohrsches Salz)	Riedel de Haen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma–Aldrich
Ampicillin (Amp)	AppliChem
L–Ascorbinsäure	Sigma–Aldrich
Benzylviologendichlorid	Sigma–Aldrich
Bradford–Reagenz	AppliChem
Bromphenolblau	Serva
BSA Albumin Fraktion V	Roth
Calciumchlorid	Roth
Chloroform	Thermo Scientific
Coomassie Brilliant Blue R–250	Roth
Cytochrom C	Sigma–Aldrich
N–Cyclohexyl–3–aminopropansulfonsäure (CAPS)	Roth
Desoxycholol (DOC)	Sigma–Aldrich
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP's)	New England Biolabs Inc.
Dextran (M <sub>r</sub> : ~1.500)	Sigma–Aldrich
N,N'–Dimethylphenylendiamin (DMPD)	Fluka

## Materialien

Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
1,4-Dithiolthreitol (DTT)	AppliChem
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich
<sup>57</sup> Eisenpulver	bereitgestellt von AG Schünemann RTPU
Essigsäure	Roth
Ethanol (absolut 99,8 %)	Roth
Ethanol (tech.)	Brenntag
Ethanol absolute for molecular biology	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Feren	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	AppliChem
Formiergas Arcal F5	Nippon Gases
D(+)-Galaktose	Roth
D(+)-Glukose	Roth
Glycerin	Roth
Geneticin (G 418)	Roth
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Roth
Helium (flüssig)	Air Liquid
L-Histidin	Sigma-Aldrich
Imidazol	AppliChem
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	J.T. Baker

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Kanamycin	AppliChem
Lachssperma–DNA	Invitrogen
LB–Medium (Luria, Bertani)	Roth
L–Leucin	Roth
Lithiumsulfid	Sigma–Aldrich
Luminol	Sigma–Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Manganchlorid Tetrahydrat	Fluka
β–Mercaptoethanol	Merck
Menadion	Roth
Methanol	Sigma–Aldrich
L–Methionin	Merck
Methylviologen	Sigma–Aldrich
Natriumanthrachinon–2–sulfonat	Sigma–Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Trinatriumcitrat–dihydrat	Merck
Natriumdithionit	Sigma–Aldrich
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma–Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat–Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
di–Natriumhydrogenphosphat–Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	J. T. Baker
Natriumpyrophosphattetrabasisch (PP <sub>i</sub> )	Sigma–Aldrich
Neutralrot	Sigma–Aldrich
Nourseothricin (CloNAT)	Werner BioAgents

## Materialien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Pepton	Roth
Phenosafranin	Sigma–Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma–Aldrich
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth
Ponceau S	AppliChem
2–Propanol Molecular Biology grade	AppliChem
Safranin O	Sigma–Aldrich
Salzsäure (konz.)	J. T. Baker
Schwefelsäure	Fluka
SOB–Medium	Roth
Sorbitol	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma–Aldrich
[Tris(hydroxymethyl)methylamino]propansulfonsäure (TAPS)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem
Tetracyclin Hydrochlorid	AppliChem
Triton X–100	Serva
L–Tryptophan	Sigma–Aldrich
Tween–20	Sigma–Aldrich
Uracil	Sigma–Aldrich
Hefe–Stickstoff (Basis)	Formedium
Wasserstoffperoxid	AppliChem
Zinkacetat	Sigma–Aldrich

## 2.4 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien

**Tabelle 5: Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien**

Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
Cut Smart Buffer	New England Biolabs Inc.
GelRed® (1000x)	Biotium
DNA–Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs Inc.
pH–Eichlösungen	AppliChem
Phusion HF Reaction Buffer (5x)	New England Biolabs Inc.
Pliwa® (Lösung zur Flächendesinfektion)	Hansa Trading
Protease-Inhibitor-Cocktail, cOmplete™, Mini, EDTA-frei	Roche
RNase–Away® (Lösung zur RNA–Inaktivierung)	Molecular Bio Products
T4 DNA Ligase Buffer (10x)	New England Biolabs Inc.
ThermoPol Buffer	New England Biolabs Inc.
Tri Reagent®	Sigma–Aldrich

## 2.5 Größenstandards

**Tabelle 6: Größenstandards**

Größenstandards	Hersteller
Blue Prestained Protein Standard (11–190 kDa) wurde geändert in Blue Prestained Protein Standard (11–250 kDa)	New England Biolabs Inc.
1 kb Plus DNA Ladder Name wurde geändert in 2–log DNA Ladder (0,1–10,0 kb)	New England Biolabs Inc.
Protein Marker III (6,5–212 kDa)	AppliChem
Roti®–Mark Standard (14–212 kDa)	Roth
RiboRuler High Range RNA Ladder (0,2–6,0 kb)	Thermo Scientific

## 2.6 Säulen und Säulenmaterialien

**Tabelle 7: Säulen und Säulenmaterialien**

Säulen und Säulenmaterialien	Hersteller
Ni-NTA-Agarose	Cube Biotech
Ni-NTA-Agarose HP 5 ml	GE Healthcare
HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR	GE Healthcare
HiTrap Heparin HP 5 ml	GE Healthcare
Sephadex G-25 M PD10 Columns	GE Healthcare
Sephadex G-200 Pulver	Pharmacia Fine Chemicals

## 2.7 Antibiotika

**Tabelle 8: Antibiotika**

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml Reinstwasser	100 µg/ml
Nourseothricin (CloNAT)	100 mg/ml Reinstwasser	100 µg/ml, 50 µg/ml
Geneticin (G418)	100 mg/ml Reinstwasser	500 µg/ml, 200 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml Reinstwasser	30 µg/ml
Tetracyclin Hydrochlorid	10 mg/ml EtOH 70 %	10 µg/ml

## 2.8 Antikörper

**Tabelle 9: Antikörper**

Antikörper	eingesetzte Verdünnungen	Herstellung	Quelle
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:5000 (BSA)	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
α-HA	1:2000 (BSA)	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
α-Myc	1:2000 (BSA)	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-mouse-HRP	1:10000 (Milch)	monoklonal	Prof. Roland Lill
α-His	1:1000 (Milch)	monoklonal	Invitrogen
α-Porin	1:2000 (Milch)	monoklonal	Prof. Roland Lill

## 2.9 Enzyme

**Tabelle 10: Enzyme**

Enzyme	Hersteller
DNase A	New England Biolabs Inc.
Phusion DNA–Polymerase	New England Biolabs Inc.
Restriktionsendonukleasen ( <i>Bam</i> HI–HF, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI–HF, <i>Hind</i> III–HF, <i>Nco</i> I–HF, <i>Nde</i> I, <i>Sac</i> I–HF, <i>Sal</i> I–HF, <i>Xho</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Pst</i> I–HF, <i>Bst</i> BI, <i>Spe</i> I–HF)	New England Biolabs Inc.
RNase A	AppliChem
T4 DNA–Ligase	New England Biolabs Inc.
Taq DNA–Polymerase	New England Biolabs Inc.
Zymolyase–100T ( <i>Arthrobacter luteus</i> )	Nacalai Tesque Inc.

## 2.10 Komplettsysteme

**Tabelle 11: Komplettsysteme**

Kit	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
NucleoSpin® Gel and PCR Clean–up	Macherey–Nagel
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	Macherey–Nagel

## 2.11 Oligonukleotide

### 2.11.1 Oligonukleotide zur klassischen Klonierung

**Tabelle 12: Oligonukleotide zur klassischen Klonierung**

Name	Sequenz (5' → 3')	Zur Klonierung von
<b>Mak16_BamHI_For</b>	GCA CTG <b>GGA TCC</b> GAT GTC CGA CGA AAT TGT TTG GCA AGT G	pETDuet-1-His <sub>6</sub> Mak16
<b>Mak16_PstI_rev</b>	GCA CTG <b>CTG CAG</b> TTA TTG TGC CAC TTC TTG CTC AGC	
<b>NdeI_Rpf1_Sc_For(2)</b>	GCA CTG <b>CAT ATG</b> GCT CTC GGT AAT GAG ATA AAC ATC	pETDuet-1-Rpf1,
<b>XhoI_Rpf1_Rev</b>	GCA CTG <b>CTC GAG</b> GTT TAC GAA TGG AAC ATA AAT AAA AC	pETDuet-1- His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1
<b>NdeI_Rpf1_Q58M_For</b>	GCA CTG <b>CAT ATG</b> ACG ATA GAG AAC ACT AGA GTG TAC G	pETDuet-1-
<b>XhoI_Rpf1_Rev</b>	GCA CTG <b>CTC GAG</b> GTT TAC GAA TGG AAC ATA AAT AAA AC	His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58-295</sub>
<b>NcoI_Rrp1_For</b>	CAT GCC <b>CAT GGC</b> AAT GGA GAC CTC CAA CTT TGT TAA AC	pColaDuet-1-Rrp1
<b>HindIII_Rrp1_Rev</b>	CAT GCA <b>AGC TTT</b> CAA AAT CCC TTC CAC TCT TCC TC	
<b>BamHI_Rrp1_For</b>	CAT GCG <b>GAT CCG</b> ATG GAG ACC TCC AAC TTT GTT AAA C	pColaDuet-1-HisRrp1
<b>HindIII_Rrp1_Rev</b>	CAT GCA <b>AGC TTT</b> CAA AAT CCC TTC CAC TCT TCC TC	
<b>NdeI_Nsa1_For</b>	GGA ATT <b>CCA TAT GAG</b> GTT ACT# AGT CAG CTG TGT GGA TAG	pColaDuet-1-Nsa1,
<b>XhoI_Nsa1_Rev</b>	CCG <b>CTC GAG</b> TTA AAT TTT GCT TTT CTT ACT GGC	pColaDuet-1-Rrp1/Nsa1, pColaDuet-1- His <sub>6</sub> Rrp1/Nsa1
<b>Twinstrep_XbaI</b>	ATG GTA <b>TCT AGA</b> AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GG	pETDuet-1-
<b>Twinstrep_BamHI</b>	ATG GTA <b>GGA TCC</b> GCC CTG GAA ATA CAA GTT TTC G	TwinStrepMak16/Rpf1
<b>Mak16_NP_SacI_F</b>	ATG GTA <b>GAG CTC</b> CGC AGA GAA GAA AGA CTG GAT C	p414-NP-Mak16
<b>Mak16_NP_PstI_R</b>	ATG GTA <b>CTG CAG</b> TTA TTG TGC CAC TTC TTG CTC AGC	
<b>Nsa1_NP_SacI_F</b>	ATG GTA <b>GAG CTC</b> CTT CAG AGC CAT CAT AAT ATC C	p414-NP-Nsa1
<b>Nsa1_New_Sall_R</b>	ATG GTA <b>GTC GAC</b> CAG CGT CGC GTT CAG GAA GTG C	
<b>Cic1_BstBI_NP-F</b>	ATG GTA <b>TTC GAA</b> ATG GAT ATT CAT CCA CTC AG	p414-NP-Cic1
<b>Cic1_PstI_NP_R</b>	ATG GTA <b>CTG CAG</b> TTA ACT TTT AGC CTT CTT GAC AGC	
<b>Cia1_NP_SacI_F</b>	ATG GTA <b>GAG CTC</b> CCG CCT GCT TAT TCG ACA TC	p416-NP-Cia1
<b>Cia1_NP_Sall_R</b>	ATG GTA <b>GTC GAC</b> CTA CGC TGC TTT TTC TAG AGA C	

Name	Sequenz (5' → 3')	Zur Klonierung von
Nbp35_NP_SacI_F	ATG GTA <b>GAG CTC</b> CGT CTA ACG ATG CAA TGT ACA C	p414–Met25–Nbp35ts
Nbp35_NP_PstI_R	ATG GTA <b>CTG CAG</b> CTA TAC ATC CCC CAC AGC ATC TCG C	
Rpf1_SpeI_For	GCT CGT <b>ACT AGT</b> ATG GCT CTC GGT AAT GAG ATA AAC	p414–Met25–Myc–Rpf1
Rpf1_EcoRI_Rev	GCT CGT <b>GAA TTC</b> CGA ATG GAA CAC TAT AAA TAA AAC	

## 2.11.2 Oligonukleotide zur Mutagenese

**Tabelle 13: Oligonukleotide zur Mutagenese**

Name	Sequenz (5' → 3')	Zur Mutagenese von
C28A_mut_for	GGT CAA AAT TTT GCC AGA AAT GAG TAT AAC G	pETDuet–1– His <sub>6</sub> Mak16(C28A)/Rpf1 <sub>58–295</sub>
C28A_mut_rev	CAT TTC TGG CAA AAT TTT GAC CAT TAG GTG CC	
C38A_mut_for	GGG TTG GCT ACA AGG CAA TCA TGC CCA CTT GCC AAC TCC	pETDuet–1– His <sub>6</sub> Mak16(C38A)/Rpf1 <sub>58–295</sub>
C38A_mut_rev	GCC TTG TAG CCA ACC CAG TGA CGT TAT ACT CAT TTC TG	
C38A/C43A_mut_for	GGT TGG CTA CAA GGC AAT CAG CCC CAC TTG CCA ACT CC	pETDuet–1– His <sub>6</sub> Mak16(C38A/C43A)/ Rpf1 <sub>58–295</sub>
C38A/C43A_mut_rev	GTG GGG CTG ATT GCC TTG TAG CCA ACC CAG TGA CG	
C55A_mut_for	GCA ACA GTG AAG GCT GAC AAT GGG AAA CTG TAC	pETDuet–1– His <sub>6</sub> Mak16(C55A)/Rpf1 <sub>58–295</sub>
C55A_mut_rev	CCA TTG TCA GCC TTC ACT GTT GCA TAC TTG G	
Mak16_192_f	GAT AAT GTA ACA AAT GGA AGA GGA GAA TTC TCA G	pETDuet–1–His <sub>6</sub> Mak16 <sub>1–192</sub> / Rpf1 <sub>58–295</sub>
Mak16_192_r	CCA TTT GTT ACA TTA TCT TCT TCC AGA CCT TTT CG	
Mak16_for_C38Y	CTG GGT TGT ATA CAA GGC AAT CAT GCC CAC TTG CC	p416–NP–Mak16ts
Mak16_rev_C38Y	GAT TGC CTT GTA TAC AAC CCA GTG ACG TTA TAC TC	
nbp35–mut–for	CAA GTG TAT GAG AGA ATC TGG C	p416–NP–Nbp35ts (Y204C) (nach Yarunin <i>et al.</i> 2005)
nbp35–mut–rev	CTC ATA CAC TTG TTT ATT GAG ATG TGC	
cf1–mut–for	TAT AAG TGA AAA CAT GTC AGG GTT TGT ATG C	p416–NP–Cfd1ts (I193S) Yarunin <i>et al.</i> 2005
cf1–mut–rev	TTT CAC TTA TAC CGA GGA TCT TTA AAT CG	

## 2.11.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden

**Tabelle 14: Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden**

Name	Sequenz (5' → 3')
Seq1_Mak16	GAT TCC CTC GCT AGA CAG G
Seq2_Mak16	GTC CGA CGA AAT TGT TTG GC
Seq3_Mak16_r	GGT TGT TAT TAT GGT ACA GTG CG
Nsa1_seq1	CTT CTT CCT CAT CCA GGT AG
Nsa1_seq2	GAC TGA CAC TTC CGT ACA ATC
Nsa1_Seq3	GTG GAA ATA GAT TCG AGT TTC C
Nsa1_4_r	CAG CGT CGC GTT CAG GAA GTG
Cic1_seq1	GCT ACC ACA CAA CGT CTG
Cic1_seq2	GAC AGC AGG CAG ATA AAC C
Cic1_seq3	GCA TAT GAG GCT AGA AAC GC
Ciq1_seq4_R	CAT ATG CAC CGC ACT CTA TG
Cia1_Seq1	GAA GCG CTT CGG AAT TCA G
Cia1_Seq2	CTC ACA CTT CGC TGT TAG C
Cia1_Seq3_R	GCG TTA TAG TGA TAC AAA GG
check-Rpf1-For	CCT TCG TGT AAT ACA GGG TCG
check-Rpf1-Rev	GGG CGT GAA TGT AAG CGT GAC
checkmut-nsa1-for	CTG ATA AAT ATA TAT TTG CAT ACG
checkmut-cfd1-for	AGT AAC TAC CCC ACA GAG TGT TGC
pRS_4xx_SacI	GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
T7_forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7_reverse	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG
Cyc-50_rev	GGA CCT AGA CTT CAG GTT G
His_seq310	CTC ACA GAC GCG TTG AAT TG

Oligonukleotide zur Identifikation der ts-Plasmide aus der Sammlung von Prof. Dr. Ed Hurt		
Seq_Cfd1_F	CAT CTC TGA CGT CGC CTG	1193S
Seq_Cfd1_R	CTC AGC TCC TCT GCA ATC G	
Seq_Nbp35_F	GAC ACC TGT CTA TGT GAC TG	Y204C
Seq_Nbp35_R	CCT CCA TAT AAT GGC GGA ATC	
Seq_Nsa1_F	CAC ATT CGT AGC TGC TAC	
Seq_Nsa1_R	CTC TCA TAT CCA ACC TGT CG	S43L, P375L, S405F, E428G
Seq_Nsa1_F2	CCG TGA ACC ATT ATC TCA G	
Seq_Cic1_F	CTG ACG ACA GTA TAG TTA C	V23I, T30A, E68G, L140V,
Seq_Cic1_R	GCA TGT GTT CTA ATT GAT ATA GG	I180V

## 2.11.4 Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von Hefestämmen

**Tabelle 15: Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von Hefestämmen**

Name	Sequenz (5' → 3')	Stamm
Mak16_S1	GTG ATT GGT ATA GAG GCA GAT ATT GCA TTG CTT AGT TCT TTC TTT TGA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	
Mak16_S4	CTA TGA GAG CAG AAA CTT TGA TTA ATC ACT TGC CAA ACA ATT TCG TCG GAC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	<i>GAL1-10-NBP35/GALL-</i>
Checkmak_F	GAT TCC CTC GCT AGA CAG G	<i>MAK16</i>
Checkmak_R	GTG CTA CAC CAA CGT AGT GTC	
Cic1_S1	CTG TGC TTC ACC GTT GCG TCA ATA AAT GTG AAG TTG ATG TCA CTT CAT ACA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	
Cic1_S4	GCTTGG TGT ACT TAC AGG CGT AGA TTT CTT TGA GTT ACT CTT TTT AGC CAT CGA TGA ATT CTC TGT CG	<i>GALL-CIC1</i>
Check_Cic1_for	GAG GGC TGG TCA CAG ATT ACC	
Check_Cic1_rev	CCT TAA CCG CTG TTG CAC TGG	
Gal1_orf_Nbp35	CTG CTG GTA GCA CTT CGT CGT TTA CAT GTG GTA GTA TCT CAG TCA TCG AAT TCC TTG AAT TTT C	
Gal1_prom_Nbp35	CGC ATT CAT TAA TGG TGT AAT TAG TAA TGC GTA GAA ATA TTT TGA TCG ATG AAT TCG AGC TC	<i>GAL1-10-NBP35</i>
Check_Nbp35_for	CAC AAT TCT CTC AGT TCT ATG C	
Check_Nbp35_rev	AAG TGC CCA ACT TAG CAT TGC	

## Materialien

Name	Sequenz (5' → 3')	Stamm
<b>GalCfd1His_Prom</b>	GAA ATA ACT GGA AAT ACA ATT ACA AAG CGA TAA TTA CGG GAT CTT TGG TTC CTA TCG ATG AAT TCG AGC TC	
<b>GalCfd1His_Nterm</b>	TTT ATT CCT GCC AAA GAG GCC GCA GGA ACG CCT ATC TCC TGT TCC TCC ATC GAA TTC CTT GAA TTT TC	<i>GAL1-10-CFD1/GALL-</i>
<b>Cfd1_prom_control</b>	CAC ATC GAT AAG AGT GAA ACA TAT CC	<i>MAK16</i>
<b>Cfd1_354rev</b>	CAT AGA AGT CTT CTT AGG ACC C	
<b>GalCia1His_Prom</b>	CTA ATT GTA GAA ACG TTT GAA TTT AAG GAA TCT GAC TCT GAT GTG CAT AGC AGT GTG ATG AAT TCG AGC TC	
<b>GalCia1His_Nterm</b>	CAT ATC TTT TCC TTG TAA AGT TTC AAA GAC TTA ATC AGA TTG ATA GAC GCC ATC GAA TTC CTT GAA TTT TC	<i>GAL1-10-CIA1/GALL-MAK16</i>
<b>PromCia1_control</b>	GCA CTT CTA TCT TGT TTT GTG TTG C	
<b>Hisfor_control</b>	TGC AGT GTG ATG ATC ATC GAT G	
<b>Gall_Rpf1_S1</b>	CGA TTG AAC ACCT AA GGA AGA GGT AAA GCA GGC TTA ATA TAT TGA AAT ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	
<b>Gall_Rpf1_S4</b>	TCT TGC CTC TTT AGC TTG TTT GTG ATG TTT ATC TCA TTA CCG AGA GCC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	<i>GALL-RPF1</i>
<b>Rpf1_331rev</b>	CAA ATT CAT AAG CGC TCT TCT TAG CG	
<b>Rpf1_-169for</b>	TCA GTG CAT TTT TCA TTT TCG CGT TCG	

## 2.12 Plasmide

### 2.12.1 Ausgangsplasmide

**Tabelle 16: Ausgangsplasmide**

Ausgangsplasmid	Beschreibung	Promotor	Tag	Marker	Referenz
<b>pFA6a-natNT2</b>	zur Amplifikation des <i>GAL1-10</i> -Promotors	<i>GAL1-10</i>	–	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>HIS3MX6</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
<b>pYM_N27_His</b>	zur Amplifikation des <i>GALL</i> -Promotors	<i>GALL</i>	–	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>HIS3MX6</i>	(Greth, 2018)
<b>pYM_N27</b>	zur Amplifikation des <i>GALL</i> -Promotors	<i>GALL</i>	–	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>natNT2</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
<b>p416_MET25</b>	ohne Insert	<i>MET25</i>	–	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>URA3</i>	(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)
<b>p414_MET25</b>	ohne Insert	<i>MET25</i>	–	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>TRP1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
<b>P414_Met25_Myc_Nbp35</b>	<i>S. cerevisiae</i> Nbp35, N-terminaler 1xMyc-Tag	<i>MET25</i>	1xMyc	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>TRP1</i>	Netz <i>et al.</i> , 2012

Ausgangsplasmid	Beschreibung	Promotor	Tag	Marker	Referenz
pETDuet-1	ohne Insert, His <sub>6</sub> -Tag	T7	His <sub>6</sub>	Amp <sup>R</sup>	Novagen
pColaDuet-1	ohne Insert, His <sub>6</sub> -Tag	T7	His <sub>6</sub>	Kan <sup>R</sup>	Novagen

## 2.12.2 Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*

**Tabelle 17: Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae***

Name	Beschreibung	Promotor	Marker	Referenz
p414-NP-Mak16	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 aus W303	MAK16	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit
p414-NP-Mak16ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgenden Punktmutationen: C15R, E107K, N109K, E150K, G168D, V191M, L200Q, G222D, A244E mittels Klonierung	MAK16	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit, (Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008)
p414_NP_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 aus W303	CIA1	Amp <sup>R</sup> , TRP1	(Greth, 2018)
p414-NP-Nsa1	<i>S. cerevisiae</i> Nsa1 aus W303	NSA1	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit
p414-NP-Nsa1ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Nsa1 mit folgender Punktmutation: W230R mittels Mutagenese	NSA1	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit, (Kressler <i>et al.</i> , 2017)
p414-NP-Cic1	<i>S. cerevisiae</i> Cic1 aus W303	CIC1	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit
p414-NP-Cic1ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Cic1 mit folgenden Punktmutationen: V23I, T30A, E68G, L140V, D143L, I180V, T221S, K227R, G252E, S265L, P267S, A287P, E331K, I354K mittels Klonierung	CIC1	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit, (Gadal <i>et al.</i> , 2001)
p414-Met25-Myc-Nbp35	<i>S. cerevisiae</i> Nbp35, C-terminaler Myc-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , TRP1	Netz <i>et al.</i> , 2012
p414-Met25-Myc-Nbp35ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Nbp35 mit folgender Punktmutation: Y204C mittels Mutagenese, C-terminaler Myc-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit, (Gadal <i>et al.</i> , 2001)
p414-Met25-Nbp35ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Nbp35 mit folgenden Punktmutationen: D201G, L302Q mittels Klonierung	Met25	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit, (Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008)
p414-Met25-Myc-Rpf1	<i>S. cerevisiae</i> Rpf1 aus W303, C-terminaler Myc-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , TRP1	diese Arbeit
p416-NP-Cfd1	<i>S. cerevisiae</i> Cfd1	CFD1	Amp <sup>R</sup> , URA3	Netz <i>et al.</i> , 2012
p416-NP-Cfd1ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Cfd1 mit folgender Punktmutation: I193S mittels Mutagenese	CFD1	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit. (Gadal <i>et al.</i> , 2001)
p416-NP-Nbp35	<i>S. cerevisiae</i> Nbp35	Nbp35	Amp <sup>R</sup> , URA3	Netz <i>et al.</i> , 2012
p416-NP-Nbp35ts	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Nbp35 mit folgender Punktmutation: Y204C mittels Mutagenese	NBP35	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit, (Gadal <i>et al.</i> , 2001)

## Materialien

Name	Beschreibung	Promotor	Marker	Referenz
<b>p416–NP–Cia1</b>	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 aus W303	CIA1	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–NP–Cia1ts</b>	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Cia1 mit folgender Punktmutation: L10S mittels Klonierung	CIA1	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit, (Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008)
<b>p416–NP–Mak16</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 aus W303	MAK16	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–NP–Mak16ts</b>	Temperatursensitives <i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgender Punktmutation: C38A mittels Mutagenese	MAK16	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit, (Pellett <i>et al.</i> , 2006)
<b>p416–Met25–3HA–Yal025c</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–Met25–3HA–Yal–C15A</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgender Punktmutation: C15A, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–Met25–3HA–Yal–C28A</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgender Punktmutation: C28A, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–Met25–3HA–Yal–C38A</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgender Punktmutation: C38A, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–Met25–3HA–SC–Mak16–C15A/C38A</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgenden Punktmutationen: C15A und C38A, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
<b>p416–Met25–3HA–Yal–C55A</b>	<i>S. cerevisiae</i> Mak16 mit folgender Punktmutation: C55A, C-terminaler 3HA-Tag	Met25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

### 2.12.3 Plasmide zur Expression in *E. coli*

**Tabelle 18: Plasmide zur Expression in *E. coli***

Name	Beschreibung	Schnittstelle	Marker	Referenz
<b>pETDuet–1–His<sub>6</sub>Mak16</b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag	Mak16 in MCSI: BamHI/PstI	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet–1–His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1</b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1	Mak16 in MCSI: BamHI/PstI Rpf1 in MCSII: NdeI/XhoI	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pColaDuet–1–His<sub>6</sub>Rrp1/Nsa1</b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Rrp1, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Nsa1	Rrp1 in MCSI: BamHI/HindIII Nsa1 in MCSII: NdeI/XhoI	Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pColaDuet–1–Rrp1/Nsa1</b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Rrp1 MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Nsa1	Rrp1 in MCSI: NcoI/HindIII Nsa1 in MCSII: NdeI/XhoI	Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet–1–His<sub>6</sub>Mak16<sub>1–192</sub>/Rpf1</b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, C-Terminal trunkiert, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1	Mak16 in MCSI: BamHI/PstI Rpf1 in MCSII: NdeI/XhoI	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet–1–His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub></b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1, N-Terminal trunkiert	Mak16 in MCSI: BamHI/PstI Rpf1 in MCSII: NdeI/XhoI	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Schnittstelle	Marker	Referenz
<b>pETDuet-1-His<sub>6</sub>Mak16(C28A)/Rpf1<sub>58-295</sub></b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Cysteinmutante, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1, N-Terminal trunziert	Mak16 in MCSI: <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I Rpf1 in MCSII: <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	<i>Amp</i> <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet-1-His<sub>6</sub>Mak16(C38A)/Rpf1<sub>58-295</sub></b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Cysteinmutant, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1, N-Terminal trunziert	Mak16 in MCSI: <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I Rpf1 in MCSII: <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	<i>Amp</i> <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet-1-His<sub>6</sub>Mak16(C38A/C43A)/Rpf1<sub>58-295</sub></b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Cysteinmutant, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1, N-Terminal trunziert	Mak16 in MCSI: <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I Rpf1 in MCSII: <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	<i>Kan</i> <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pETDuet-1-His<sub>6</sub>Mak16(C55A)/Rpf1<sub>58-295</sub></b>	MCSI: <i>S. cerevisiae</i> Mak16, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Cysteinmutant, MCSII: <i>S. cerevisiae</i> Rpf1, N-Terminal trunziert	Mak16 in MCSI: <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I Rpf1 in MCSII: <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	<i>Kan</i> <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>pCDFDuet-1_ES7a</b>	<i>S. cerevisiae</i> Expansionssegment ES7a	ES7a vor T7 Promotor-1 und in MCSII: <i>Eco</i> NI/ <i>Kpn</i> I	<i>Sm</i> <sup>R</sup>	diese Arbeit

## 2.13 Zellstämme

### 2.13.1 *E. coli* Stämme

Tabelle 19: *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Eigenschaften und Anwendungen
<b>NEB<sup>®</sup> 5-alpha (DH5α)</b>	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44</i> <i>Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i>	hohe Replikations- und große Transformationseffizienz für Plasmide kleiner und mittlerer Größe
<b>NEB<sup>®</sup> 10-beta</b>	<i>Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16</i> <i>galE15 e14-φ80dlacZΔM15 recA1 endA1 nupG</i> <i>rpsL (StrR) rph spot1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Derivat von NEB5α mit höherer Transformationseffizienz für größere Plasmide
<b>NEB<sup>®</sup> 5-alpha F'I<sup>q</sup></b>	F' <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> / <i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44</i> <i>Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i>	eine starke Expressionskontrolle durch <i>lacI<sup>q</sup></i> ermöglicht das Klonen potenziell toxischer Gene
<b>T7 express lysY/I<sup>q</sup></b>	MiniF <i>lysY lacI<sup>q</sup>(Cam<sup>R</sup>)</i> / <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> <i>[lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-Tet<sup>S</sup>) endA1</i> <i>Δ(mcrC-mrr) 114::IS10</i>	Verbessertes BL21-Derivate für die T7-Expression, die durch die strenge Kontrolle der T7-RNA-Polymerase (durch Lysozym) die Expression toxischer Gene ermöglicht

2.13.2 *S. cerevisiae* StämmeTabelle 20: *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Hintergrund Stamm	Vorlage (Marker)	Referenz
<b>W303-1A</b>	<i>MATa leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1, can1-100, ade2-1, ura 3-1</i>	–	–	(Thomas <i>et al.</i> , 1989)
<b>GALL-MAK16</b>	<i>W303-1A pMAK16:: natNT2-pGALL</i>	W303-1A	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-MAK16/GAL1-10-NBP35</b>	<i>W303-1A pMAK16:: natNT2-GALL, pNBP35::HIS3-pGAL1-10</i>	GALL-MAK16	pFA6a-natNT2 ( <i>Amp<sup>R</sup>, HIS3MX6</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-MAK16/GAL1-10-CIA1</b>	<i>W303-1A pMAK16:: natNT2-pGALL, pCIA1::HIS3-pGAL1-10</i>	GAL1-10-CIA1	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-MAK16/GAL1-10-CFD1</b>	<i>W303-1A pMAK16:: natNT2-pGALL, pCfd1::HIS3-pGAL1-10</i>	GAL1-10-CFD1	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-CIC1</b>	<i>W303-1A pCic1:: natNT2-pGALL</i>	W303-1A	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-CIC1/GAL1-10-NBP35</b>	<i>W303-1A pCIC1:: natNT2-pGALL, pNBP35::HIS3-pGAL1-10</i>	GALL-CIC1	pFA6a-natNT2 ( <i>Amp<sup>R</sup>, HIS3MX6</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-CIC1/GAL1-10-CIA1</b>	<i>W303-1A pCIC1:: natNT2-pGALL, pCIA1::HIS3-pGAL1-10</i>	GAL1-10-CIA1	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-CIC1/GAL1-10-CFD1</b>	<i>W303-1A pCIC1:: natNT2-pGALL, pCfd1::HIS3-pGAL1-10</i>	GAL1-10-CFD1	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>GALL-MAK16/GALL-RPF1</b>	<i>W303-1A pMAK16:: natNT2-pGALL, pRPF1::HIS3-pGAL1-10</i>	GALL-MAK16	pYM_N27 ( <i>Amp<sup>R</sup>, natNT2</i> )	diese Arbeit
<b>CIA1-ts</b>	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0 can1Δ::LEU2-MFA1pr::His3-pCIA1-ts::URA3</i>	–	–	Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008
<b>NBP35-ts</b>	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0 can1Δ::LEU2-MFA1pr::His3-pNBP35-ts::URA3</i>	–	–	Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008
<b>MAK16-ts</b>	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 met15Δ0 can1Δ::LEU2-MFA1pr::His3-pMAK16-ts::URA3</i>	–	–	Ben-Aroya <i>et al.</i> , 2008

### 3. Methoden

Alle gentechnischen Schritte wurden gemäß den Verordnungen des Gentechnikgesetzes unter Berücksichtigung der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Alle gentechnisch veränderten Organismen und kontaminierte Gefäße, sowie Lösungen und Medien wurden zur Entsorgung autoklaviert und dadurch unschädlich gemacht. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit einer Ethanol-Lösung (70 % v/v) desinfiziert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden in Reinstwasser gelöst, wenn nötig der gewünschte pH-Wert durch Zugabe von HCl-, NaOH- bzw. KOH-Lösungen eingestellt und anschließend autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

#### 3.1 Mikrobiologische Arbeiten

##### 3.1.1 Medium zur Kultivierung von *E. coli*

<b>LB-Medium</b>	
Hefeextrakt	5,00 g/l
NaCl	10,0 g/l
Trypton	10,0 g/l

Anschließend autoklavieren.

##### 3.1.1.1 Flüssigmedium-Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium mit den entsprechenden Selektionsmarkern bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator (Thermo Scientific, MaxQ™ 4000) über Nacht.

##### 3.1.1.2 Festmedium-Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium erfolgte auf LB-Agar Platten. Dafür wurde das LB-Nährmedium mit Agar-Agar (20 g/l) in Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde bei ca. 60 °C das entsprechende Antibiotikum dem Medium hinzugefügt, jeweils 25 ml in Petrischalen gegossen und nach der Abkühlung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.2 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

#### YP (Voll)–Medium

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g

Auffüllen mit Reinstwasser auf 900 ml und autoklavieren.  
Medium auf 60 °C abkühlen.

Glukose/Galaktose	20 % (w/v)
-------------------	------------

Zugabe von 100 ml der jeweiligen Zuckerlösung.  
Zugabe der Adeninsulfatlsg. (siehe Aminosäuren–Mix) auf eine  
Endkonzentration von 2 % (v/v).

#### SC (Minimal)–Medium

Ammoniumsulfat	5,00 g
Yeast Nitrogen Base	1,90 g

Auffüllen mit Reinstwasser auf 900 ml und autoklavieren.  
Medium auf 60 °C abkühlen.

Glukose/Galaktose	20 % (w/v)
-------------------	------------

Zugabe von 100 ml der jeweiligen Zuckerlösung.  
Zugabe des Aminosäuren–Mix auf eine  
Endkonzentration von 2 % (v/v).

#### Aminosäuren–Mix

Adeninsulfat	A	600 mg
L–Histidin	H	150 mg
L–Leucin	L	500 mg
L–Tryptophan	W	300 mg
Uracil	U	150 mg

Auffüllen mit Reinstwasser auf 150 ml und autoklavieren.

### 3.1.2.1 Flüssigmedium–Kultivierung

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgt in YP– oder SC–Medium. Um eine Karamellisierung des Zuckers zu vermeiden wurde das Medium ohne Zuckerzusatz in Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde der Zucker, je nach Auxotrophie die entsprechenden Aminosäuren und die benötigten Antibiotika zur Selektion hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator (INFORS HT, Multitron Pro). Die Dauer der Kultivierung wurde in jedem Experiment explizit angegeben.

### 3.1.2.2 Festmedium–Kultivierung

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte ebenfalls auf YP– oder SC–Medium mit Agar–Agar (20 g/l), einer Kohlenstoffquelle, den nötigen Aminosäuren und Antibiotika. Diese wurden nach der Abkühlung des Nährmediums auf 60 °C hinzugegeben, in Petrischalen gegossen und nach der Abkühlung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.3 Optische Dichte

Das Wachstum von *E. coli* und *S. cerevisiae* Zellen kann durch die Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 600$  nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt werden. Bei dieser Wellenlänge ist die Streuung nur von den vorhandenen Zellen in der Kultur abhängig. Je konzentrierter die Zellsuspension, desto höher ist die Absorption bei  $OD_{600}$ . Ab einer  $OD_{600} = 0,3$  wurden Verdünnungen (1:5 oder 1:10) hergestellt und vermessen. Auf diese Weise kann das Wachstum regelmäßig überprüft werden.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase–Kettenreaktion ist ein von Kary Mullis (1983) entwickeltes *in vitro* Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäuresequenzen. Die DNA–Polymerase benötigt passende Oligonukleotide (Primer), um mit den hinzugegebenen Deoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die einzelsträngige DNA (Vorlage) zu Doppelsträngen zu synthetisieren. Diese Reaktion wird in mehreren Zyklen wiederholt, bei denen die synthetisierte DNA jeweils als Vorlage für einen neuen Zyklus verwendet wird und damit eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs–DNA liefert. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Schritten.

## Methoden

1. Denaturieren: Bei einer Temperatur von 98 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Doppelstrang aufgebrochen und dadurch zwei Einzelstränge erhalten.

2. Primerhybridisierung: Die Primer werden an die komplementären Einzelstränge angelagert. Die Temperatur orientiert sich dabei an den Schmelzpunkten der Oligonukleotide und sollte dabei 5 °C unter dem Schmelzpunkt liegen.

3. Elongation: Die DNA-Polymerase verlängert bei 72 °C das 3'-Ende der angelagerten Oligonukleotide zu einem komplementären DNA-Strang, sodass ein neuer Doppelstrang gebildet wird.

In dieser Arbeit wurden für die Amplifikation von Genen für eine Klonierung hauptsächlich die Q5- und die Phusion-Polymerasen (*New England Biolabs Inc*) mit den entsprechenden Puffern verwendet. Diese Polymerasen zeichnen sich durch ihre sehr geringen Fehlerraten aus. In der Tabelle 21 ist ein typisches Pipettierschema eines PCR-Ansatzes dargestellt und das dazugehörige PCR-Programm ist in Tabelle 22 gezeigt. Bei der Verwendung von Plasmid-DNA als Vorlage wird eine Denaturierungszeit von 3 min gewählt, während die Dauer der Denaturierung auf 5 min erhöht wurde, wenn genomische DNA eingesetzt wurde. Die Dauer der Elongation wurde der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz angepasst.

**Tabelle 21: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes**

Nuklease-freies Wasser	X µl
Q5-/Phusion-Polymerase-Puffer	10 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	2,5 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	2,5 µl
Plasmid-DNA (bzw. 1 µl 1:10 verd. chromosomale DNA)	30 ng
dNTP's	1,0 µl
Q5-/Phusion-Polymerase	0,5 µl
Gesamtvolumen von 50 µl	

Tabelle 22: PCR-Programm für Q5/Phusion-Polymerasen

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	98 °C	2,0 min (Plasmide)
		5,0 min (genomische DNA)
35 x	98 °C	10 s
	51–65 °C	30 s
	72 °C	30 s/kb
1 x	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Für die Überprüfung von Klonierungen, ohne vorheriger Isolation der DNA, wurden die Klone mittels Kolonie-PCR auf „positive Klone“ untersucht. Dieses Verfahren erlaubt es eine größere Anzahl an Klonen gleichzeitig auf das Gen von Interesse zu untersuchen. Dafür wurde eine minimale Menge eines *E. coli* Klons mit Hilfe einer 10 µl Pipettenspitze aufgenommen und in dem, bereits mit dem PCR-Ansatz ohne Polymerase, gefüllten PCR-Tube resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe der Taq-Polymerase und der Start des PCR-Programmes.

Tabelle 23: Pipettierschema eines Kolonie-PCR-Ansatzes

Nuklease-freies Wasser	X µl
ThermoPol Puffer	2,5 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,5 µl
1 Pipettenspitze	Zelle
dNTP's	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,125 µl
Gesamtvolumen von 25 µl	

**Tabelle 24: Kolonie-PCR-Programm**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	95 °C	3,0 min
	95 °C	20 s
35 x	55–68 °C	30 s
	68 °C	1,0 min/kb
1 x	68 °C	5,0 min
	4 °C	∞

### 3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer Größe auftrennen. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller als größere Fragmente wandern. Zur Visualisierung wird GelRed als Farbstoff verwendet, der nach der Bindung an die Fragmente unter UV-Licht fluoresziert. Ein 1%-iges Agarosegel wurde mit 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1x) hergestellt. Um die Agarose vollständig zu lösen, wurde sie 2 x 1 min in der Mikrowelle erhitzt und anschließend zu einem Gel gegossen. Eine analytische Probe bestand aus 1–2 µl PCR-Produkt, 1/10 GelRed (1000x) und 1/6 Gel Loading Buffer, aufgefüllt mit Reinstwasser auf 20 µl. Die Menge für eine präparative Probe wurde dem DNA-Volumen entsprechend angepasst, mit einem Gesamtvolumen von max. 75 µl. Durch die Verwendung eines Standard-Markers (1 kb plus/2 log DNA-ladder) können die Größen und die Menge der untersuchten DNA-Fragmente aufgrund der Lage und der Intensitäten der Banden zugeordnet und abgeschätzt werden. Zur Auftrennung wurde die Elektrophorese für 45–60 min bei 100 V durchgeführt.

#### TAE-Puffer (50x)

Tris-Base	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM

Die Puffer-Lösung besitzt einen pH-Wert von ca. 8,5.

### 3.2.3 Reinigung von DNA aus PCR Ansätzen und Agarosegelen

DNA aus PCR-Ansätzen und präparativen Agarosegelen wurde mit dem Kit „*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*“ von Agarose, Enzymen und Nucleotiden gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 15–30 µl Elutions-Puffer (TE) eluiert.

### 3.2.4 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau ist das gezielte Zerschneiden von DNA in kleinere, definierte Stücke mittels Restriktionsenzymen. Diese Restriktionsenzyme erkennen ihre spezifischen Schnittstellen, schneiden innerhalb dieser Sequenzen und bilden dabei Fragmente mit einem 5' Phosphat- bzw. einem 3' OH-Ende. Dabei können entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überstehende Enden (*sticky ends*) generiert werden, die mit einer anschließenden Ligation chemisch verknüpft werden können. Der Restriktionsverdau wird sowohl für die Klonierung, als auch für das Überprüfen von Klonen auf eine erfolgreiche Klonierung verwendet. Ein typische Restriktionsverdau-Ansatz ist in Tabelle 25 dargestellt. Der Verdau wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C für 2 h inkubiert (INCU-Line®, VWR) und anschließend mit dem „*Clean Up*“ Kit aufgereinigt.

**Tabelle 25: Restriktionsverdau-Ansatz für Vektor und Insert**

Nuklease-freies Wasser	X µl
CutSmart Puffer	1/10 des gesamten Volumens
Restriktionsenzym 1	1,5 µl
Restriktionsenzym 2	1,5 µl
DNA	~2 µg (Insert), ~1 µg (Vektor)
Gesamtvolumen von 100 µl (Insert) und 60 µl (Vektor)	

### 3.2.5 Ligation

Bei der Ligation werden zwei zuvor verdaute DNA-Fragmente unter der Ausbildung einer Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft. Dadurch ist es möglich, eine gezielte DNA-Sequenz in einen Vektor einzubauen und mittels T4-DNA-Ligase zu verknüpfen, sofern die Übergänge der beiden Moleküle kompatibel sind. Die Ligationen in dieser Arbeit wurden mit der T4-DNA-Ligase und dem T4-Ligase-Puffer durchgeführt. Der Ansatz wurde, wenn nicht anders vermerkt, bei 22 °C für 1 h ligiert. Die Menge des Vektors betrug 100 ng und die Menge des benötigten Inserts ist abhängig von dessen Größe, der Größe des Vektors und errechnet sich mit folgender Formel:

$$ng \text{ Insert} = \frac{100 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Größe des Inserts in kb}}{\text{Größe des Vektors in kb}} \cdot X_{(\text{Verhältnis})}$$

Standardgemäß wurden die Verhältnisse 1:1, 1:3 und 1:5 (Vektor:Insert) getestet. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Im Folgenden ist ein typisches Pipettierschema einer Ligation dargestellt.

**Tabelle 26: Pipettierschema einer Ligation**

Nuklease-freies Wasser	X µl
Insert (DNA)	X ng
Ligase	1,0 µl
Ligase-Puffer	2,0 µl
Vektor (DNA)	100 ng
Gesamtvolumen von 20 µl	

### 3.2.6 Transformation in *E. coli*

Die Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA aus dem umgebenden Medium in kompetente Zellen (Bakterien-bzw. Hefezellen). Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen (100 µl) wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut (15 min), anschließend Plasmid-DNA (5– 20 ng) bzw. der komplette Ligations-bzw. Mutationsansatz hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Mittels eines Hitzeschocks bei 42 °C für 30 s, wird das Eindringen der Fremd-DNA in die Zellen ermöglicht und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von

sterilem LB-Medium (950 µl) wurden die Zellen bei 37 °C für 45 min–1 h und 850 rpm inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort). Im Anschluss wurden die Zellen bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert (MicroStar 17, VWR) und das Medium (ca. 950 µl) verworfen. Das Zellpellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und mit einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Inkubationszeit der *E. coli* Zellen betrug bei 37 °C, wenn es nicht anders angegeben wurde, 16 h über Nacht (INCU-Line®, VWR).

### 3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine Übernachtskultur von 6 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika mit einer Kolonie inokuliert. Diese wurde bei 37 °C und 200 rpm 16 h über Nacht inkubiert (Innova 4000, New Brunswick). Am nächsten Morgen erfolgte die Isolierung der DNA mit dem „NucleoSpin® Plasmid“ Kit von Macherey–Nagel. Die DNA wurde mit dem Ansatz der „low copy plasmids“ isoliert und in 30 µl Elutions-Puffer von der Säule eluiert. Die erhaltene DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem *Eppendorf BioPhotometer plus* durch die Messung der Absorption bei  $\lambda = 260$  nm und 280 nm bestimmt. Die isolierte DNA konnte anschließend mit einem Kontrollverdau auf eine erfolgreiche Klonierung untersucht werden.

### 3.2.8 Sequenzierung

Potenzielle positive Klone wurden abschließend durch Sequenzierung auf Richtigkeit und Vollständigkeit in der Abfolge der Nukleotide überprüft. Für eine Sequenzierungsprobe wurden 500 ng DNA mit 1 µl des entsprechenden Sequenzierungsprimers (10 µM) gemischt, auf 5 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und zur Firma SEQ-IT in Kaiserslautern eingeschickt, wo die Analyse nach Sanger durchgeführt wurde (1977). Für die Sequenzierung bei Eurofins wurden ebenfalls 500 ng DNA (> 1000 bp) mit 2,5 µl Sequenzierungsprimer (10 µM) gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden abgeschickt und die Analyse nach Sanger durchgeführt (1977). Mit einer Sequenzierung konnte ca. 700–800 Nukleotide zuverlässig untersucht werden. Die Auswertung der enthaltenen Daten erfolgte mit den Programmen Chromas und Clustal Omega.

### 3.2.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Bei der ortsgerichteten Mutagenese kann die DNA gezielt verändert werden. Dabei können einzelne Nukleotide eines Gens, mit speziell angefertigten Primern ausgetauscht, entfernt oder inseriert werden. Diese Primer bestehen aus einem ca. 20 Basen langen komplementären Bereich, der in der Mitte die gewünschte Mutation beinhaltet, sowie einem ca. 10 Basen langen Überhang an der 3'-Seite, zur Hybridisierung mit der Vorlage (Zheng et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden mittels gezielter Mutagenese bestimmte Aminosäuren durch Alanin ersetzt, um so deren Wichtigkeit für das Protein von Interesse zu überprüfen. Nach der Amplifikation wird der Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, um die methylierte Ausgangs-DNA von dem mutierten PCR-Produkt abzutrennen, denn das mutierte PCR-Produkt liegt unmethyliert vor. Die Mutagenese verlief über zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen. Das Pipettierschema ist in der Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27: Pipettierschema einer gezielten Mutagenese**

	<b>A</b>	<b>B</b>
Nuklease-freies Wasser	34 µl	34 µl
Phusion-Puffer	10 µl	10 µl
Vorwärtsprimer	2,5 µl	–
Rückwärtsprimer	–	2,5 µl
Plasmid (ca. 30 ng)	2,0 µl	2,0 µl
dNTP's	1,0 µl	1,0 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl	0,5 µl

In der ersten PCR-Reaktion wurden zunächst zwei Einzelstränge durch komplementäre Primer, die die Mutation enthielten, amplifiziert (1. PCR). Anschließend wurden je 25 µl aus den Ansätzen A und B miteinander vereinigt, 0,5 µl Phusion-Polymerase hinzugegeben und die zweite PCR durchgeführt (2. PCR), bei der die Einzelstränge zu Doppelstränge hybridisiert wurden.

**Tabelle 28: 1. PCR (gezielte Mutagenese)**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	98 °C	30 s
	98 °C	15 s
8 x	55 °C	30 s
	72 °C	1,0 min/kb
	4 °C	∞

**Tabelle 29: 2. PCR (gezielte Mutagenese)**

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	98 °C	30 s
	98 °C	15 s
18 x	55 °C	30 s
	72 °C	1,0 min/kb
1 x	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Im Anschluss an die zweite PCR–Reaktion wurde der Mutageneseansatz mit 1 µl *DpnI* zum Verdau der Vorlagen–DNA versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert (INCU–Line®, VWR). Nach anschließender Aufreinigung (Kapitel 3.2.3) und Transformation in *E. coli* (Kapitel 3.2.6) wurde eine Übernachtskultur mit einer Kolonie inokuliert und für 16 h über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert (Innova 4000, New Brunswick). Die Plasmid–DNA konnte am nächsten Morgen isoliert und aufgereinigt (Kapitel 3.2.7), die Konzentration photometrisch bestimmt und durch Sequenzierung (Kapitel 3.2.8) die Mutation der DNA bestätigt werden.

### 3.3 Isolierung und Reinigung von RNA

Alle verwendeten Gegenstände wurden zum Entfernen von RNasen mit einer  $\leq 1\%$  Natriumhypochlorit-Lösung oder *RNase Away* eingesprüht, verrieben und mit Reinstwasser abgespült und es wurden bereits RNase-freie Verbrauchsmaterialien erworben. Danach durften die Gegenstände und Materialien nur noch mit RNase freien Handschuhen und im gereinigten RNA Bereich verwendet werden. Alle Lösungen wurden mit einer autoklavierten DEPC-Reinstwasser-Lösung angesetzt.

<b>DEPC-Reinstwasser-Lösung</b>	
DEPC	1 ml
Wasser	1 l

30 min – 1 h im Abzug rühren, anschließend autoklavieren.

#### 3.3.1 Isolierung von RNA (ES7a) mittels Sephadex G-200

Ca. 0,5 g gewaschene Hefezellen wurden in Lysis-Puffer (50 mM  $\text{PP}_i$ , 300 mM NaCl, pH = 9,0, 1 Protease Inhibitor Tablette auf 15 ml) im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kugelform in flüssigen Stickstoff getropft und schockgefroren. Die Zellkugeln wurden mittels einer Retsch Schwingmühle MM 400 aufgeschlossen, wie in Kapitel 3.5.2 beschreiben. Das aufgeschlossene, gefrorene Zellpulver wurde mit Lysis-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt und abwechselnd mittels Vortex und Eisbad (20s vortex, 30s Eisbad) getaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem „Open-Top Thinwall Polypropylen“-Beckman Zentrifugationsröhrchen bei 4 °C für 30 min und 16.000 rpm zentrifugiert (Rotor JA-25.50, Beckmann Coulter Avanti). Der Überstand wurde vorsichtig entnommen, ohne die Fettschicht aufzuwirbeln oder einzuziehen und in ein neues Falcon (15 ml) gegeben. Das Falcon wurde bei 4 °C für 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-62). Der klare, leicht bräunliche Überstand wurde ohne Fettschicht und Zelltrümmer entnommen und in ein neues Falcon (15 ml) pipettiert. Eine bei 4 °C über Nacht gequollene Sephadex G-200 Suspension (500 mg Sephadex G-200 in 40 ml Lysis-Puffer) wurde in dem Verhältnis 1:2 (Sephadex : Überstand) zu dem Überstand hinzugegeben. Das Überstand-Sephadex-Gemisch wurde langsam rotierend bei 4 °C für 1 h homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch in 15 ml Falcons bei 4 °C für 5 min und 4.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-62) und der Überstand entnommen. Die Sephadex-Beads wurden mit Lysis-Puffer

im Batchprozess bis zu dreimal gewaschen. Im Anschluss wurden die Sephadex–Beads mit dem Elutions–Puffer (200 mg/ml Dextran in Lysis–Puffer) versetzt und langsam rotierend bei 4 °C für 30 min homogenisiert. Die Bead–Suspension wurde bei 4 °C für 5 min und 4.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A–4–62) und der Überstand wurde in ein RNase–freies Reagenzgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde die RNA aus der Probe extrahiert (Kapitel 3.3.2–3.3.3) und aufkonzentriert. Die isolierte RNA wurde mittels einem UREA–Acrylamidgel (10 %) überprüft.

### 3.3.2 RNA–Extraktion von Lysat/Eluat/Trägermaterial mittels TriReagent®

Zu 500 µl Lysat/Eluat oder eine geeignete Menge an Trägermaterial (Beads) wurden 1500 µl TRIzol gegeben. Zur maximalen Auftrennung der Phasen wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und das Gemisch 15 s gevortext. Nach einer Ruhezeit von 15 min wurde das Gemisch bei 4 °C für 15 min und 11.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17R, VWR). Die obere Phase konnte vorsichtig entnommen, mit 500 µl 2–Propanol versetzt und gemischt werden. Nach einer Ruhezeit von 10 min wurde das Gemisch bei 4 °C für 10 min und 11.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17R, VWR) und ein weißes bis farbloses Pellet konnte am Rand des Reagenzgefäßes und am Boden erhalten werden. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet mit 1,5 ml Ethanol (75 %) gevortext und für 5 min und 9.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Nachdem der Überstand entfernt wurde, konnte das Pellet an Luft getrocknet werden. Zuletzt wurde das getrocknete Pellet in einer angemessenen Menge an RNase–freiem Reinstwasser gelöst (Vortex). Sollte sie das Pellet nicht direkt lösen, kann nach Kapitel 3.3.3 verfahren werden. Die RNA Konzentration konnte anschließend spektroskopisch mittels  $\lambda = 260/280\text{nm}$  Ratio gemessen und durch ein UREA–Polyacrylamidgel (10 %, Tabelle 30) verifiziert werden.

#### TBE–Puffer (10x)

Tris (pH =7,6)	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA (pH = 8,0)	20 mM

pH–Wert auf 8,3 mit HCl einstellen.

**Tabelle 30: Pipettierschema eines UREA–Polyacrylamidgel (10 %)**

40 % Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	2,5 ml
30 % APS	33 µl
Harnstoff	4,8 g
10x TBE	1 µl
TEMED	4 µl
RNase–freies DEPC Reinstwasser	X ml

Auffüllen mit Reinstwasser auf 10 ml.

**TBE–Laufpuffer (0,5x)**

10x TBE	5 % (v/v)
RNase–freies H <sub>2</sub> O	95 % (v/v)

**Ladepuffer (2x)**

Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
Formamid	90 % (v/v)
EDTA	20 mM

In Aliquoten (–20 °C) einfrieren.

Der Laufpuffer wurde mit RNase–freiem Reinstwasser angesetzt. Die Glasplatten wurden zusammengesetzt, die Polyacrylamidlösung vollständig hinein pipettiert und der Kamm sofort vorsichtig eingesetzt. Die Gelpolymerisation betrug 30–60 min. Anschließend wurde das Gel in die Kammer gesetzt und mit dem Laufpuffer gefüllt und bei 40 V für 60 min vorgeheizt, um den überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Die Proben wurden mit 2x Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 90 °C erhitzt. Bevor die Taschen des Gels beladen werden konnten, mussten diese gründlich mit dem Laufpuffer durchgespült werden, indem mit einer Pipette der Laufpuffer gründlich in die Taschen pipettiert wurde. Nun konnten die Taschen beladen und das Gel bei 40 V für 15 min gestartet werden. Anschließend wurde die Spannung auf 80 V erhöht und für 2 h laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit RNase–freiem Reinstwasser abgespült und in einer GelRed/DEPC–Wasser–Lösung für 1 Stunde geschwenkt.

Die RNA konnte anschließend unter UV-Strahlung im Fusion SL Lourmat-Imager detektiert werden.

#### **GelRed/DEPC-Reinstwasser-Lösung**

GelRed (1000x)	3 $\mu$ l
DEPC-Reinstwasser	10 ml

### 3.3.3 Lösen des RNA Pellets

Zu der schockgefrorenen RNA wurden 500  $\mu$ l Isopropanol gegeben und dieses Gemisch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 1 h inkubiert. Das Gemisch wurde invertiert, für 10 min und 12.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR) und der Überstand vorsichtig entnommen. Das Pellet wurde zweimal mit 700 ml Ethanol gewaschen, für 5 min und 12.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17R, VWR) und Luft getrocknet. Anschließend kann das Pellet in vorgewärmten RNase-freiem Reinstwasser ( $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gelöst (Vortex) werden.

### 3.3.4 EMSA-Interaktionsassay

Der Gelelektrophorese-Mobilitätsverschiebungstest (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*–EMSA) wird zum Nachweis von Proteinkomplexen mit gebundener Nukleinsäuren verwendet. Das Protein wird mit der RNA (bzw. DNA) inkubiert und das Gemisch mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend der Größe aufgetrennt. Bindet das Protein an die RNA, ist eine Verschiebung der Bande zu beobachten. Alle Lösungen mussten immer frisch angesetzt werden und konnten nur einmal verwendet werden. Gele mussten frisch gegossen und konnten nicht im Kühlschrank gelagert werden. Es wurde ein natives TBE-Polyacrylamidgel (5 %) nach folgendem Rezept vorbereitet (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Pipettierschema eines EMSA–TBE–Polyacrylamidgel (5 %)**

Acrylamid (30 %)	1,7 ml
APS (10 %)	70 µl
RNase–freies DEPC Reinstwasser	7,3 ml
5x TBE	1,0 ml
TEMED	3,5 µl

Auffüllen mit Reinstwasser auf 10 ml.

Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war (ca. 30 min) wurde es in die Gelkammer gespannt und bei 40 V für 1 h im Laufpuffer ohne Proben laufen gelassen (dieser Schritt konnte beliebig verlängert werden).

#### EMSA–Bindungspuffer

DDT	1 mM
Igepal	0,01 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub> (x 6 H <sub>2</sub> O)	1 mM
NaCl	300 mM
PP <sub>i</sub> –Puffer (pH = 9,0)	50 mM

Nach der Herstellung des Puffers und den Verdünnungen wurden RNase–freie Reagenzgefäße vorbereitet und beschriftet. Anschließend wurden 10 µl RNA (1,3 µg) in die Reagenzgefäße (1,5 ml) pipettiert und das Protein in den unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2 µl Glycerol versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zwei Proben wurden mit dem Ladegelmix (Ladepuffer (2x)) versetzt, weshalb alle anderen Proben farblos waren und langsam pipettiert werden mussten. Das Gel mit den Proben wurde bei 60 V für ca. 1 1/2 h, bis die dicken blauen Banden den unteren Rand des Gels erreicht hatten, gefahren. Nach erfolgreicher Elektrophorese, wurde das Gel aus den Glasscheiben gelöst und für 1 h in einer GelRed/DEPC–Reinstwasser–Lösung (Kapitel 3.3.2) sanft geschwenkt. Zuletzt kann die RNA im Gel mittels UV–Bestrahlung im Fusion SL Lourmat–Imager visualisiert werden.

### 3.4 Zellbiologische Methoden

#### 3.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zellen sind kompetent, wenn sie in der Lage sind Fremd-DNA aufzunehmen. Diese Zellen sind die Voraussetzung, damit Plasmid-DNA durch Transformation in die Zelle aufgenommen werden kann. Zur Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen wurde eine LB-Übernachtskultur (25 ml) mit dem gewünschten *E. coli* Stamm bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert (New Brunswick Innova 4000). Am nächsten Morgen wurde eine vorgewärmte SOB-Großkultur (500 ml) mit 1 % (5 ml) der Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm inkubiert (New Brunswick Innova 4000), bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min und 3.000 rpm zentrifugiert (Beckman JA-21 M/E, Rotor JA-10) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in eisgekühltem, filtriertem TB-Puffer (50 ml) resuspendiert und anschließend für 10 min auf dem Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen unter Rühren mit 1,75 ml DMSO versetzt und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### TB-Puffer

CaCl <sub>2</sub>	15 mM
HEPES (pH = 6,7)	10 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM

pH-Wert auf 6,7 einstellen.

#### SOB-Medium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
KCl	2,5 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

pH-Wert auf 7,0 einstellen und autoklavieren.

### 3.4.2 Glycerinkulturen *E. coli*

Zur Herstellung von Lagerungskulturen wurden 500 µl Übernachtskultur (LB-Medium) mit 500 µl Glycerin (50 %, v/v) versetzt, gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.4.3 Transformation in *S. cerevisiae* und homologe Rekombination

Um Plasmide mittels Transformation oder lineare DNA-Fragmente mittels homologer Rekombination in das Hefegenom einzuführen wurde die Lithiumacetat-Methode angewandt. (Gietz & Woods, 2002; Ito *et al.*, 1983). Übernachtskulturen (YP-Medium mit Zucker) der Hefezellen wurden am nächsten Morgen in 25–50 ml frischem YP-Medium mit Zucker auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 inokuliert und bei 30 °C und 150 rpm inkubiert (Multitron Pro, INFORS HT), bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6–1,0 erreicht wurde. Die Zellen wurden geerntet, indem sie für 3 min und 3500 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-62) und mit 10 ml sterilem Reinstwasser gewaschen wurden. Das Pellet wurde in 1 ml Lithiumacetat-Lösung resuspendiert, in ein neues Reagenzgefäß überführt und für 2 min und 7.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in dem der OD<sub>600</sub> entsprechendem Volumen (0,6–1,0) in der Lithiumacetat-Lösung resuspendiert. Je Transformation wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen, mit 2,5 µl Lachssperma-DNA (denaturiert bei 95 °C für 5 min und anschließend direkt auf Eis gelagert) bei einer Plasmid-Transformation oder 10 µl Lachssperma-DNA bei einer homologen Rekombination. Außerdem wurden lineare DNA (100 ng) oder verdünntes Plasmid sowie 700 µl PEG-Lösung hinzugegeben und der Ansatz bei 30 °C für 30 min und 550 rpm inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort). Bei einer Plasmid-Transformation folgte anschließend ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min (Thermomixer Eppendorf comfort), bei einer homologen Rekombination wird der Hitzeschock auf 45 min verlängert. Danach folgte bei der homologen Rekombination die Erholungsphase, indem die Zellen pelletiert, in 1 ml YP-Medium resuspendiert und 2–3 h bei 30 °C und 550 rpm inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort) wurden. Danach wurden die Zellen für 5 min und 5.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR) und mit 1 ml sterilen Reinstwasser gewaschen und erneut pelletiert. Zuletzt wurden die Zellen (Plasmid-Transformation und homologe Rekombination) in 100 µl sterilen Reinstwasser resuspendiert und auf SC-Platten mit Zucker und dem entsprechenden Selektionsdruck ausgestrichen.

Die Inkubation erfolgt bei 30 °C für 2–4 Tage (Thermo Scientific, Heratherm IGS100), mit anschließendem Überimpfen der einzelnen Kolonien auf frische Selektionsplatten.

#### **Lithiumacetat–Lösung**

EDTA (pH = 8,0)	1 mM
Lithiumacetat Dihydrat	100 mM
Tris (pH = 7,5)	10 mM

Steril filtrieren (0,22 µm).

#### **PEG–Lösung**

PEG 4000	40 % (w/v)
----------	------------

In Lithiumacetat–Lösung. Steril filtrieren (0,22 µm).

Lachssperma: 10 mg/ml

### 3.4.4 Chromosomale DNA–Isolierung aus Hefe

Aus einer 10 ml Übernachtkultur (YP–Medium mit Zucker) erfolgt die Isolierung der chromosomalen Hefe–DNA, indem die Zellen zuerst für 10 min und 3.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A–4–62) bei Raumtemperatur geerntet wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,9 ml Sorbitol–Puffer resuspendiert und in ein neues Reagenzgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend wurden 0,1 ml Zymolyase (2 mg/100 µl) und 1 µl β–Mercaptoethanol im Abzug hinzugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort). Daraufhin wurde für 5 min und 5.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR), der Überstand verworfen und das Pellet in 0,4 ml TE–Puffer mit RNase A (20 µg/ml) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 30 µl TES–Puffer hinzugegeben, das Reagenzgefäß vorsichtig invertiert und bei 60 °C für 30 min inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort). Danach wurden 80 µl Kaliumacetat–Lösung hinzugegeben, erneut vorsichtig invertiert und 1 h auf Eis gekühlt. Es folgt eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 13.000 rpm (MicroStar 17R, VWR), mit anschließendem Verwerfen des Überstandes und der Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol (100 % v/v) wurde die DNA gefällt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die DNA bei 4 °C für 15 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17R, VWR).

## Methoden

Das DNA–Pellet wurde mit 500 µl kaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min und 13.000 rpm (MicroStar 17, VWR), wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 300 µl TE–Puffer mit RNase A gelöst.

### Sorbitol–Puffer

EDTA (pH = 8,0)	100 mM
Kpi–Puffer (pH = 7,4) (4:1 Mischung von 1 M K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	10 mM
Sorbitol	900 mM

### TES–Puffer

EDTA (pH = 8,0)	278 mM
SDS	2,2 % (w/v)
Tris (pH = 8,0)	222 mM

### TE–Puffer

EDTA (pH = 8,0)	1 mM
Tris (pH = 8,0)	10 mM

Kaliumacetat–Lösung: 4,91 g mit 10 ml Reinstwasser auffüllen und autoklavieren.

### 3.4.5 Glycerinkulturen *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Lagerungskulturen wurden 1,2 ml Übernachtskultur (YP–Medium) mit 400 µl Glycerin (70 %, v/v) versetzt, gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen wurden bei –80 °C gelagert.

### 3.4.6 Isolierung von *S. cerevisiae* Gesamtzellextrakt

Für die Gesamtzellextraktion wurden ca. 100 ml Großkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bei 30 °C über Nacht inkubiert (INFORS HT, Multitron Pro). In der Regel wurden so 0,5 g Zellen mittels Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 min und 3.500 rpm geerntet (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A–4–62) und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde

mit einer entsprechenden Menge eisgekühltem TNETG–Puffer (0,5 g Zellen benötigten 500 µl Puffer), 10 µl PMSF und Glasperlen (ca. 1 ml) versetzt und in ein Falcon (15 ml) überführt. Die Zellen wurden mechanisch mit Glasperlen lysiert (Woontner *et al.*, 1990; Pierik *et al.*, 2009), indem das Falcon auf dem Kopf für 60 s gevortext und anschließend direkt 60 s auf Eis gekühlt wurde. Dieser Vorgang wurde dreimal hintereinander durchgeführt. Danach wurden die Falcons für 5 min und 4.500 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor A–4–62) und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß (1,5 ml) überführt. Nach Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 13.000 rpm (MicroStar 17R, VWR) wurde der Überstand erneut entnommen und in ein neues Reagenzgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend konnte die Gesamtproteinkonzentration bestimmt werden (Kapitel 3.5.8–3.5.9).

#### TNETG–Puffer

EDTA (pH = 7,4)	2,5 mM
Glycerin	10 % (v/v)
NaCl	150 mM
Tris (pH = 7,4)	10 mM
Triton X–100	0,5 % (v/v)
PMSF in EtOH	0,2 M

#### 3.4.7 Wachstumstest–„Tüpfeltest“ von *S. cerevisiae*

Bei einem „Tüpfeltest“ wird der Einfluss eines überexprimierten Gens auf den Wachstumsphänotyp einer Hefepopulation bestimmt. Mit dieser Art des Wachstumstests ist es möglich, den Einfluss von einer Cysteinmutante des Proteins von Interesse in einem Depletionsstamm zu analysieren. Dafür wurde von einer exponentiell wachsenden Hefekultur die OD<sub>600</sub> bestimmt, ein Aliquot von der OD<sub>600</sub> = 0,5 entsprechenden Menge in 1 ml entnommen und für 10 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem Reinstwasser resuspendiert. Anschließend wurde in einer Mikrotiterplatte eine serielle Verdünnung (fünfmal 1:10) hergestellt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden je 5 µl der Verdünnungen auf eine SC–Agarplatte mit Zucker und geeigneten Auxotrophiemarkern „getüpfelt“ und die Platten wurden bei 30 °C für 2–3 Tage inkubiert (Heratherm IGS100, Thermo Scientific).

### 3.4.8 Wachstumstest–„Tüpfeltest“ von *S. cerevisiae* mit Redox–Stressoren

*GALL–MAK16* Hefezellen wurden mit den folgenden Plasmiden p416–Met25 ( $\emptyset$ ), 416–NP–Mak16 (WT) und 416–NP–Mak16–C38A (C38A) transformiert. Übernachtskulturen wurden auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und für 2–3 h kultiviert. Nach dem Erreichen von einer  $OD_{600} = 0,4$  wurden die Zellen mit den entsprechenden Redox-Stressoren unterschiedlicher Konzentrationen induziert und für weitere zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurde ein Aliquot von der  $OD_{600} = 0,5$  entsprechenden Menge in 1 ml entnommen und für 10 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem Reinstwasser resuspendiert. Anschließend wurde in einer Mikrotiterplatte eine serielle Verdünnung (fünfmal 1:10) hergestellt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden je 5  $\mu$ l der Verdünnungen auf eine SC–Agarplatte mit entsprechendem Zucker und geeigneten Auxotrophiemarkern „getüpfelt“ und die Platten wurden bei 30 °C für 2 Tage inkubiert (Heratherm IGS100, Thermo Scientific).

**Tabelle 32: Redox–Stressoren**

<b>Redox–Stressor</b>	<b>Stammlösung</b>
DTT	1000 mM in Reinstwasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 mM in Reinstwasser
Paraquat	100 mM in Reinstwasser
Vitamin K <sub>3</sub> (Menadion)	100 mM in Ethanol

### 3.4.9 Wachstumskurve und Verdopplungszeit von *S. cerevisiae*

Das Zellwachstum erfolgt durch sich wiederholende Zellteilungen, was zu einer Zellvermehrung führt. Um Hefestämme phänotypisch miteinander zu vergleichen, wurde das Zellwachstum für mehrere Stunden verfolgt. Dafür wurde eine SC–Übernachtskultur mit Zucker in 25 ml frischem SC–Medium mit Zucker auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 inokuliert. Für eine manuelle Überwachung wurde über den gesamten Tag jede Stunde eine Probe entnommen und die  $OD_{600}$  verfolgt. Für die automatische, maschinelle Überwachung wurde ein Absorptions–Mikrotiterplatten–Lesegeräte (BioTek ELX808) verwendet. Dafür wurden die Zellsuspensionen auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 mit SC–Medium mit jeweiligem Zucker verdünnt (max. 100  $\mu$ l) und in

eine sterile 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde in das Lesegerät eingelegt und bei 30 °C wurde alle 10 min die Platte für 3 s geschüttelt und die Proben bei einer OD<sub>630</sub> gemessen. Durch das Erstellen einer Wachstumskurve können die verschiedenen Stämme verglichen und die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt werden. Die Verdopplungszeit wurde mit den folgenden Formeln berechnet:

$$t_v = \frac{\ln(2)}{\ln(q)}$$

mit  $\ln(q)$  definiert als:

$$\ln(q) = \frac{\ln(2)}{\frac{\Delta \ln(OD_{600})}{\Delta t}}$$

$t_v$  = Verdopplungszeit,  $\ln(q)$  = Wachstumsrate

## 3.5 Proteinbiochemische Methoden

### 3.5.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Plasmide von Interesse wurden in *E. coli* T7-Express LysY/I<sup>q</sup> Zellen transformiert (Kapitel 3.2.6), die Agarplatten erst bei 30 °C für 16–32 h und anschließend bei 25 °C weitere 8 h inkubiert (Thermo Scientific, Heratherm IMC 18). Nach erfolgreicher Transformation wurde eine Übernachtskultur in 6–12 l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert (2 % Inokulum). Die Zellen wurden bei 37 °C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 kultiviert und bei Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,5 auf 20 °C reduziert (New Brunswick Excella E25). Daraufhin wurde direkt IPTG (0,5 mM Endkonzentration) hinzugegeben, um die Expression zu starten. Das Wachstum der Zellen erfolgte über Nacht für 16 h. Die Zellen wurden am nächsten Morgen durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 4.000 rpm (Beckmann Coulter Avanti, Rotor JLA-8.1) geerntet und das Pellet bis zum Aufschluss bei –20 °C gelagert.

### 3.5.2 Zellaufschluss mittels Retsch Schwingmühle MM 400

Für den Zellaufschluss mit der Retsch Schwingmühle MM 400 musste das Zellpellet in Lysis-Puffer resuspendiert (0,5:1-Puffer:Zellen) und in Form von Kügelchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Dafür wurde die Zell-Lysis-Puffer-Suspension mit einer 10 ml Pipette direkt in den flüssigen Stickstoff getropft, wodurch Zellkügelchen entstanden. Der Metalllysisbehälter (50 ml), die Metallkugeln ( $\emptyset$  25 mm), ein Metallspatel und ein Kunststofftrichter, sowie ein 50 ml Falcon wurden vorgekühlt, indem sie für einige Minuten in flüssigen Stickstoff gelegt wurden. Anschließend wurde der Lysisbehälter mit einer Zange aus dem flüssigen Stickstoff gehoben und der sich im Metallbehälter befindliche flüssige Stickstoff ausgegossen. Anschließend wurden die Metallkugel und die Zellkügelchen (maximales Zellkügelchenvolumen von 17 ml in einem 50 ml Falcon) zügig in den Behälter gegeben und dieser inklusive Teflon-Dichtungsring verschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte zweimal für je 2 min bei einer maximalen Frequenz von 30 Hz, mit einer 1 min Pause zwischen den Durchgängen. In dieser Pause wurde der Metall-Lysisbehälter 1 min in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem erfolgreichen Zellaufschluss wurde das Pulver mittels Spatel und Kunststofftrichter in ein 50 ml Falcon gegeben und bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Lysis-Puffer

DTT	1 mM
Glycerin	5 % (w/v)
Igepal	0,1 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	100 mM
100 mM PMSF	1 mM
Tris (pH = 7,5)	50 mM

Je 15 ml 1x Protease-Inhibitor-Tablette.

### 3.5.3 Zellaufschluss mittels Sonikator/Ultraschall-Homogenisator

Das *E. coli* Zellpellet wurde im anaeroben Zelt auf Eis getaut und in einem anaeroben Lysis-Puffer (Lysis-Puffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8,0) für die Reinigung der Proteine mittels Ni-NTA-Agarose resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im

anaeroben Zelt bei 4 °C für 15 min und 5.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5430R, Rotor F-35-6-30) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50–100 ml Lysis-Puffer resuspendiert und je eine Spatelspitze Lysozym und DNase hinzugegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurde den Zellen eine halbe Spatelspitze PMSF, gelöst in 1 ml Lysis-Puffer, hinzugegeben und durch 3 min Beschallung (30 s Beschallung – 20 s Pause) mittels Ultraschall-Homogenisator (55 % Power, UW 2200-K76, Bandelin SONOPULS) anaerob auf Eis aufgeschlossen. Zum Entfernen der Zelltrümmer folgte im Anschluss an den Aufschluss eine Zentrifugation bei 4 °C für 1 h und 20.000 rpm (Beckman Coulter Avanti, JA-25.50).

### 3.5.4 Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Der nach dem Zellaufschluss erhaltende Überstand wurde zuerst filtriert (0,22 µm), um eine Verstopfung der Säule durch kleinere Partikel zu vermeiden und anschließend gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung einer vorgepackten 5 ml Ni-NTA-Säule mit dem Äkta Start-Chromatographiesystem auf die Ni-NTA-Säule aufgezogen (2 ml/min). Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit dem Wasch-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH =8,0) für ca. 1 h gewaschen (1 ml/min) und danach mit dem Elutions-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH-Wert von 8,0) eluiert. Die Proteine wurden unmittelbar nach der Elution unter Verwendung einer PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare), die zuvor mit dem PD-10 Entsalzungs-Puffer (25 mM PPi, 300 mM NaCl, pH = 9,0) äquilibriert wurde, vom Imidazol getrennt (entsalzt) und in PD-10 Entsalzungs-Puffer eluiert. Zur Charakterisierung wurde das Eluat unmittelbar nach dem Entsalzen mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert (Kapitel 3.5.15). Für weitere Messungen wurden die Proben schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 3.5.5 Proteinaufkonzentration durch Zentrifugieren

Um die Proteinkonzentration nach dem Eluieren zu erhöhen, wurden Membrankonzentratoren verwendet. Durch die Wahl einer geeigneten Porengröße (30 kDa), können kleineren Moleküle durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5430R, Rotor F-35-6-30) die Membran passieren, wohingegen größere Proteine auf der Membran bleiben und somit aufkonzentriert werden. Anschließend wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C in Glasfläschchen gelagert.

### 3.5.6 Reinigung von Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie

Die chromatographische Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe in Lösung wird als Größenausschlusschromatographie bezeichnet. Im Gegensatz zu anderen Chromatographiemethoden gibt es bei der Größenausschlusschromatographie keine Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der stationären Phase der Säule. Mittels dieser Methode können Aggregate oder andere Kontaminationen, die zum Beispiel durch Abbau entstanden sind, von den Proteinen von Interesse getrennt werden. Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR-Säule im Äkta Start Proteinaufreinigungssystem verwendet. Mit dieser Säule ist eine Auftrennung von Proteinen der Größen 5 bis 250 kDa möglich. Die Chromatographie wurde anaerob mit entgastem Puffer durchgeführt. Im ersten Schritt muss die Säule, durch das Auftragen von Proteinen bekannter Größen, kalibriert werden. Im Allgemeinen wurde die Säule für die Kalibrierung und Auftrennung von Proteinen mit 1 CV (318 ml, 1 ml/min) G-Puffer äquilibriert, gefolgt von der Beladung mit dem Protein(komplex) von Interesse (1–5 ml, 1 ml/min) und der Elution mit 1,5 CV (1 ml/min) G-Puffer. Erfolgte eine Absorptionsänderung von 0,1 mAU wurden mit dem Fraktionssammler Fraktionen von 2 ml Eluat gesammelt und Spektren bei  $\lambda = 280$  nm (Proteinabsorption) und  $\lambda = 420$  nm (Eisen-Schwefel-Cluster) gemessen. Eluatfraktionen des gleichen Maximums wurden anschließend vereinigt und mittels Membrankonzentratoren bei 4 °C und 7.000 rpm aufkonzentriert (Eppendorf Centrifuge 5430 R, Rotor F-35-6-30) (Kapitel 3.5.5).

#### G-Puffer

CAPS (pH = 10,0)	25 mM
NaCl	200 mM

pH-Wert von 9,0 einstellen und autoklavieren.

### 3.5.7 Reinigung von Proteinen mittels Heparin–Sepharose

Heparin–Sepharose ist ein sehr gutes Säulenmaterial zur Trennung von DNA–Bindepoteinen. Der Ligand der Heparin–Sepharose ist ein Polysaccharid aus D–Glucosamin und D–Glucuronsäure, welche jeweils 2–3 Sulfatgruppen tragen. Die DNA–Bindepoteine binden aufgrund ihrer stark positiv geladenen Domänen an die Heparin–Sepharose und durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Puffers können die DNA–Bindepoteine wieder eluiert werden. Die Heparin–Sepharose wurde an das Äkta Start Chromatographiesystem angeschlossen und mit dem H–Puffer äquilibriert. In dieser Arbeit wurden die Proteineluate auf die Heparin–Sepharose geladen und durch Erhöhung der Ionstärke eluiert (1 M NaCl–Lösung). Es wurden Spektren bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (Proteinabsorption) und  $\lambda = 420 \text{ nm}$  (Eisen–Schwefel–Cluster) gemessen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse mittels SDS–PAGE bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### H–Puffer

CAPS (pH = 10,0)	50 mM
NaCl	200 mM

pH–Wert von 10,0 einstellen und autoklavieren.

### 3.5.8 Proteinbestimmung mittels Micro–Biuret–Methode

Die Micro–Biuret–Methode ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Peptiden und Proteinen (Goa, 1953). In der Biuret–Reaktion koordinieren  $\text{Cu}^{2+}$ –Ionen mit vier Stickstoffatomen einer Peptidbindung im alkalischen Milieu, wodurch ein blauvioletter Komplex gebildet wird. Dieser Komplex kann photometrisch bei  $\lambda = 545 \text{ nm}$  vermessen werden und die gemessene Extinktion ist proportional zum Proteingehalt des Eluats. Durch das Erstellen einer Kalibriergeraden mit einer definierten Proteinkonzentration des BSA–Standards, kann die Konzentration des Proteins bestimmt werden. Das zu vermessende Protein wurde in unterschiedlichen Verdünnungen vermessen und die Kalibriergerade wurde nach folgendem Pipettierschema angefertigt.

Tabelle 33: Micro-Biuret Pipettierschema

	Blank	BSA-Standard (2 mg/ml)					Proteinprobe		
Reinstwasser ( $\mu\text{l}$ )	1000	950	900	850	800	700	950	900	850
Protein ( $\mu\text{l}$ )	0	50	100	150	200	300	50	100	150

Zu jeder Probe wurden 100  $\mu\text{l}$  einer DOC-Lösung (0,15 %, w/v) hinzugegeben, invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  TCA-Lösung (70 %, w/v) wurden die Proben gemischt, für 10 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR) und der Überstand vorsichtig entfernt. Nach der Zugabe von 950  $\mu\text{l}$  NaOH-Lösung (3 %, w/v) wurde das Pellet mittels Vortexen gelöst und anschließend 50  $\mu\text{l}$  Micro-Biuret-Reagenz hinzugefügt, invertiert und für 15 min unter Lichtausschluss inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei einer Wellenlänge  $\lambda = 545 \text{ nm}$  in Einmalküvetten vermessen.

#### Micro-Biuret-Reagenz

Kupfersulfat	70 mM
Natriumcarbonat	0,94 M
Trinatriumcitrat-Dihydrat	0,59 M
Auffüllen mit Reinstwasser auf 100 ml.	

### 3.5.9 Proteinbestimmung mittels Bradford

Die alternative Proteinbestimmung mittels dem Bradford-Test ist eine quantitative Bestimmung von Proteinen im Mikrogrammbereich (Bradford, 1976). Aufgrund dieser hohen Empfindlichkeit dient diese Methode zum Beispiel zur schnellen Überprüfung von nichtfarbigen Eluat-Fraktionen oder um die Proteinkonzentration in Zellextrakten zu bestimmen. Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue R-250 an die unpolaren Seitenketten der Proteine. In saurem Milieu führt diese Bindung zu einem Farbumschlag, welcher sein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  hat. Auch im Bradford-Test ist die gemessene Extinktion proportional zum Proteingehalt der Probe. Zur Kalibrierung wurde BSA-Standard gewählt und die eingesetzten Proben auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Das Pipettierschema ist der Tabelle 34 zu entnehmen, wobei immer Duplikate angesetzt wurden. Jede Verdünnung wurde mit 900  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz versetzt, für 10 min inkubiert und die Extinktion bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  vermessen.

Tabelle 34: Bradford Pipettierschema

	Blank	BSA-Standard (0,1 mg/ml)					Proteinprobe		
Reinstwasser ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0	99	95	90
Protein ( $\mu\text{l}$ )	0	20	40	60	80	100	1	5	10

### 3.5.10 Eisen-/Schwefelbestimmung

Um die Stöchiometrie des Eisen-Schwefel-Clusters zu analysieren, wurde der Eisen- und säure-labile Schwefelgehalt des Proteins bestimmt. Die Eisenbestimmung nach Lovenberg *et al.* (1963) detektiert nur den Eisengehalt von nicht-Häm-gebundenen Eisenionen. Diese Methode basiert auf der Freisetzung des Eisens aus dem Protein und der Umwandlung zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. Mit der Verwendung des eisensensitiven Farbstoffs Feren kommt es anschließend zur Chelatisierung mit den  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und der dabei entstandene blaufarbige Komplex kann bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 593 \text{ nm}$  photometrisch vermessen werden. Dabei werden keine absoluten Werte ermittelt, sondern es wird eine Kalibriergerade mit Ammoniumeisen(II)-sulfat erstellt, mit der der Eisengehalt ermittelt wird. Zur Erstellung der Kalibriergerade und der Probenvorbereitung wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet. Die Proteinproben können pur oder entsprechend verdünnt verwendet werden.

Tabelle 35: Eisenbestimmung Pipettierschema

	Blank	Eisenstandard (0,2 mg/ml)						Proteinprobe		
Reinstwasser ( $\mu\text{l}$ )	100	90	80	60	40	20	0	90	80	70
Reagenz ( $\mu\text{l}$ )	0	10	20	40	60	80	100	10	20	30

Zu den pipettierten Reaktionsansätzen wurden  $100 \mu\text{l}$  HCl (1 %, w/v) gegeben und für 10 min bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert (Thermomixer Eppendorf comfort). Nach dem Abkühlen, wurden  $500 \mu\text{l}$  Ammoniumacetat (7,5 %, w/v) hinzugegeben, durch Vortexen gemischt und  $100 \mu\text{l}$  Ascorbinsäure (4 %, w/v) hinzu pipettiert.  $100 \mu\text{l}$  SDS (2,5 %, w/v) und  $100 \mu\text{l}$  Feren (1,5 %, w/v) wurden hinzugegeben und der Ansatz für 7 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Der Überstand wurde anschließend bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 593 \text{ nm}$  vermessen.

Die Schwefelbestimmung nach Fogo & Popowsky (1949) ermöglicht die Bestimmung von säure-labilem Schwefel. Dabei wird der Schwefel von Methionin oder Cystein nicht detektiert,

## Methoden

sondern der Eisen–Schwefel–Cluster des Proteins wird mit Zinkacetat und Natriumhydroxid zu Zinksulfat umgesetzt und als  $S^{2-}$ -Ionen aus dem Protein gelöst und zu Schwefelwasserstoff umgewandelt. Als Kalibrierstandard wurde Lithiumsulfid (2 mM in 10 mM NaOH) verwendet, um eine Kalibrierungsgerade zu erstellen und den säure–labilen Schwefelgehalt des Proteins zu bestimmen. Die Kalibriergerade und die Probenvorbereitung wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt. Die Proteinproben können pur oder entsprechend verdünnt verwendet werden.

**Tabelle 36: Sulfidbestimmung Pipettierschema**

	<b>Blank</b>	<b>Sulfidstandard (2 mM)</b>					<b>Proteinprobe</b>		
<b>Reinstwasser (µl)</b>	200	195	190	185	180	175	190	180	170
<b>Reagenz (µl)</b>	0	5	10	15	20	25	10	20	30

600 µl Zinkacetat (1,0 %, w/v) und 50 µl Natriumhydroxid (7,0 %, w/v) wurden zu dem Pipettieransatz gegeben, 15 min inkubiert und für 15 s und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR). Nach anschließender Umsetzung im sauren Milieu zum Schwefelwasserstoff, konnte dieser mit 150 µl DMPD (0,1 %, w/v) unter oxidativen Bedingungen und 150 µl  $FeCl_3$  (10 mM in 1 M HCl) den Farbstoff Methyleneblau bilden. Nach 20 min Inkubationszeit wurde die Probe für 7 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17, VWR) und der Überstand bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 670$  nm vermessen.

### 3.5.11 TCA–Präzipitation

Die Trichloressigsäure (TCA)–Präzipitation von Proteinen ist eine biochemische Methode zur Proteinaufkonzentration und Abtrennung von Verunreinigungen der Proteine. Zur Fällung wurden 25 µl Hefezelleextrakt in 175 µl vorgekühlte TCA–Lösung (30 %) gegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteinpräzipitate bei 4 °C für 10 min und 12.000 rpm zentrifugiert (MicroStar 17R, VWR) und dreimal mit je 500 µl –20 °C–kaltem Aceton gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets wurden für 15 min luftgetrocknet, bevor sie in 60 µl 1 x Laemmli–Lade–Puffer (Kapitel 3.5.12) gelöst wurden. Kurz vor der Verwendung der Proben wurde diese bei 95 °C für 10 min denaturiert, gefolgt von dem Abkühlen auf Eis und einer kurzen Zentrifugation (MicroStar 17R, VWR).

### 3.5.12 Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS–PAGE)

Die SDS–PAGE ist eine biochemische Trennmethode von Laemmli *et al.* (1970) die zur Identifizierung von Molekülmassen und zur Reinheitskontrolle von Proteinen dient. Das Prinzip beruht auf die unterschiedlichen Laufeigenschaften verschiedener Proteine im elektrischen Feld. Hierzu wurden die Proben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten, damit die Laufeigenschaft der Proteine im Gel allein von der molekularen Proteingröße abhängig ist. Dabei wandern große Proteine langsamer, während kleinere Fragmente weitaus schneller durch das elektrische Feld zur Anode wandern. In dieser Arbeit wurde die SDS–PAGE zur Auswertung einer Proteinreinigung und für die Durchführung eines Western–Blots verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgt über ein Polyacrylamidgel. Dieses Gel setzt sich aus einem großporigen Sammel– und einem engporigen Trenngel zusammen. Je höher der Anteil an Acrylamid im Gel, desto geringer ist die Porengröße. Das Sammelgel dient zur Aufkonzentration der Proteine an der Gelgrenze zum Trenngel, so dass die Proteine nicht schon während des Auftragens in das Trenngel diffundieren können. Die Auftrennung erfolgt bei Anlegen einer Spannung rein nach der Größe (Länge) der Aminosäure–Ketten (AS–Ketten). Kurze AS–Ketten passen besser durch das engmaschige Netz, wandern also schneller als lange AS–Ketten durch das Gel. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Ethanol überschichtet bis die Polymerisation eintrat. Der Alkohol wurde entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und eine vollständige Polymerisation abgewartet. In der vorliegenden Arbeit wurden SDS–PAGEs mit 12,5 % Trenngelen verwendet. Der Elektrophorese–Lauf–Puffer (1x) wurde in die Kammer gegeben, sodass die Gele bedeckt waren. Die Proben wurden mit Lade–Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben aufgetragen (max. 20 µl) und eine Spannung von 75 V wurde für die ersten 15 min angelegt. Bei dem Erreichen der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Durch einen mitlaufenden Standard, konnten die molekularen Massen bestimmt werden.

#### Trenngel–Puffer (4x)

Tris (pH = 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

***Tabelle 37: Pipettierschema des Trenngels (12,5 %) für 2 Mini-Gele***

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	5,00 ml
APS-Lösung 10 % (w/v)	100 µl
Reinstwasser	3,90 ml
TEMED	10,0 µl
Trenngel-Puffer (4x)	3,00 ml

**Sammelgel-Puffer (4x)**

Tris (pH = 6,8)	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

***Tabelle 38: Pipettierschema des Sammelgels für 2 Mini-Gele***

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	0,60 ml
APS-Lösung 10 % (w/v)	50,0 µl
Reinstwasser	2,73 ml
Sammelgel-Puffer (4x)	1,13 ml
TEMED	5,00 µl

**Elektrophorese-Laufpuffer (1x)**

Glycin	0,19 M
SDS	0,1 % (w/v)
Tris	25 mM

Der pH-Wert beträgt etwa 8,3.

**Laemmli–Probenpuffer (5x)**

Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Tris (pH = 6,8)	125 mM
DTT	80 mM

In 100 µl Aliquote einfrieren.

Proteine, die in ausreichender Menge vorliegen ( $\geq 0,5 \mu\text{g}$ ), können durch Gelfärbung direkt im Gel visualisiert werden. Hierzu wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau verwendet, der sich unspezifisch an basische Aminosäureseitenketten anlagert. Dafür wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und für mindestens 1 h in eine Coomassie–Färbelösung gelegt und auf einen Wippschüttler gestellt. Danach wurde das Gel mit der Coomassie–Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich hervortraten und der Hintergrund nur noch schwach blau gefärbt war. Um die Gele zu lagern, wurden sie anschließend in die Coomassie–Konservierungslösung eingelegt. Diese Konservierungslösung entfärbte den Hintergrund komplett und machte die Färbung der Banden haltbar. Im letzten Schritt wurden die Gele zwischen zwei Bögen Geltrocknungsfilm aus Cellophan in einem Geltrocknungsrahmen gespannt, für mindestens 3 Tage getrocknet, danach ausgeschnitten und zuletzt eingescannt.

**Coomassie–Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blue R–250	0,25 % (w/v)
Essigsäure	5 %
Ethanol	50 %

**Coomassie–Entfärbelösung**

Essigsäure	10 %
Ethanol	30 %

**Coomassie–Konservierungslösung**

Ethanol	20 %
Glycerol	5 %

**3.5.13 Western–Blot**

Der Western–Blot ist ein spezifischer Nachweis für die auf eine SDS–PAGE aufgetragenen Proteine, mittels Antigen–Antikörperreaktion von Towbin, H. *et al.* (1979) und Burnette, W.N. (1981). Zunächst wurden Proteine von der SDS–PAGE auf eine Nitrocellulose–Membran (0,45 µm) übertragen (Trans–Blot® Turbo Transfer System) um sie den Antikörpern zugänglich zu machen. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine in der SDS–PAGE, wandern diese bei einer angelegten Spannung zur Anode und bilden dabei hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran aus. Mit dem Transfer–Puffer wurden zwei Western–Blot Filterpapiere angefeuchtet und eins davon auf die Anodenplatte platziert. Die ebenfalls angefeuchtete Nitrocellulose–Membran wurde auf das Filterpapier gelegt, die SDS–PAGE vorsichtig, blasenfrei auf die Membran gelegt und diese mit dem zweiten Filterpapier bedeckt. Abschließend wurde die Kathodenplatte auf den Stapel gelegt, die Schublade geschlossen, in die Apparatur geschoben und die Übertragung für 30 min bei 25 V / 1 A gestartet. Vereinzelt wurde die Nitrocellulose–Membran im Anschluss für einige Minuten in einer Ponceau–S–Lösung inkubiert, um einen Überblick über die Gesamtverteilung der Proteine zu bekommen. Die gefärbte Membran wurde fotografiert und mit TBST–Puffer wieder entfärbt. Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4 °C für 1 h in 25 ml Blocklösung in einem Rotator inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Die Blocklösung wurde abgegossen und die Inkubation mit der Primärantikörper–Lösung erfolgte bei 4 °C im Rotator über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBST–Puffer auf einem Wippschüttler gewaschen, bevor die Membran in der Sekundärantikörper–Lösung für mindestens 1 h inkubierte. Nach weiteren drei Waschschritten (je 15 min) in TBST–Puffer wurde die Membran mit der ECL (*enhanced chemiluminescent*)–Lösung (Peroxid–Lösung: Luminol/Enhancer–Lösung (Verhältnis 1:1)) entwickelt. Die Aufnahme erfolgte mit der Fusion SL Vilber Lourmat Dokumentationsmaschine mit der, von dem Gerät vorgeschlagenen Zeit.

**Transfer-Puffer**

Ethanol	20 % (v/v)
5x Trans-Blot Turbo®	20 % (v/v)

**Ponceau S-Lösung**

TCA	3 % (w/v)
Ponceau S	0,2 % (w/v)

**TBS-Puffer (10x)**

NaCl	1,37 M
Tris	200 mM

pH-Wert von 7,4 einstellen.

**TBST-Puffer (1x)**

TBS (10x)	10 % (v/v)
Tween 20	1,0 % (v/v)

**BSA-Blocklösung**

BSA Albumin Fraktion V	1 % (w/v)
------------------------	-----------

In TBST-Puffer (1x)

**Milch-Blocklösung**

Magermilchpulver	5 % (w/v)
------------------	-----------

In TBST-Puffer (1x)

### 3.5.14 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation (CoIP) und *Pulldown-Assays* sind eng verwandte Methoden, welche stabile Protein-Protein-Wechselwirkungen identifizieren. Beide Methoden beziehen sich auf die Immunpräzipitation, die die spezifische Isolation eines Proteins aus einem Gesamtzellextrakt ermöglicht. Der Nachweis der Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgt *in vitro* mit Hilfe von Trägermaterial (Beads), an denen das Protein von Interesse samt seinen Interaktionspartnern aus einem Gemisch heraus präzipitiert wird. Dabei wird das Protein über einen Tag an die Beads gekoppelt und mittels Zentrifugation abgetrennt. Dadurch wird das Protein zusammen mit seinen gebundenen Interaktionspartnern separiert und der Überstand mit nicht gebundenen Proteinen kann entfernt werden. Es wurden 20 µl Myc-/HA-Immunobeads zu 200 µl Gesamtzellextrakt gegeben und bei 4 °C für 1 h unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 4 °C für 5 min und 3.000 rpm zentrifugiert (Micro Star 17 R, VWR) und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurden die Beads dreimal mit je 500 µl TNETG-Puffer gewaschen und zur Detektion wurde das Pellet in 50 µl 1 x Lade-Puffer resuspendiert. Bevor die Proben auf die SDS-PAGE aufgetragen werden konnten, wurden diese bei 95 °C für 5 min denaturiert und direkt auf Eis gekühlt.

### 3.5.15 UV/Vis-Spektroskopie

Die Spektren wurden im Wellenlängenbereich von  $\lambda = 250$  nm bis  $\lambda = 650$  nm aufgenommen und die Proteinprobe so verdünnt, dass das Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 280$  nm zwischen 0,5 und 1,5 lag. Als Blank wurde der Entsalzungs-Puffer ohne Protein verwendet. Bei einem [4Fe-4S]-Cluster zeigte sich im sichtbaren Bereich bei  $\lambda = 410$ -430 nm ein deutlicher schulterartiger Verlauf. Anhand des Verhältnisses der Absorptionen bei  $\lambda = 410$  nm und  $\lambda = 280$  nm kann der Clustergehalt im Protein mit folgender Formel abgeschätzt werden:

$$\frac{\text{Absorption bei } 410 \text{ nm} * 4}{\text{Absorption bei } 280 \text{ nm}} * 100 = \% [4Fe - 4S] - \text{Clustergehalt}$$

### 3.5.16 ESR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz wird die Absorption von Mikrowellen im X-Band-Bereich einer Probe mit freien Elektronen gemessen, die sich im statischen Magnetfeld befinden (Zavoisky, 1945). Mit dieser Methode wurde in dieser Arbeit die Clusterart eines Eisen-Schwefel-Proteins und das elektrochemische Potential eines Proteins bestimmt. Je

nach Redoxzustand und Typ des Clusters werden charakteristische Spektren erhalten. Um den im gereinigten Protein enthaltenen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster vermessen zu können, wurden die Proben vor der Messung unter anaeroben Bedingungen mit Natriumdithionit versetzt und zu einem  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster reduziert. Zur Messung wurden 300  $\mu\text{l}$  Probe mit Natriumdithionit (2 mM, Endkonzentration) versetzt, in ein ESR-Röhrchen gegeben, verschlossen und nach einer Inkubationszeit von 3 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei 10 K (unter flüssiger Heliumkühlung), einer Modulationsfrequenz von 100 kHz, einer Modulationsamplitude von 1,5 mT, einer Mikrowellenleistung von 0,21 mW und einer Mikrowellenfrequenz von 9,42 GHz mit 2 Scans vermessen. In der Regel wurden die Protein-Proben auch als „*as isolated*“ und oxidiert gemessen. Für die „*as isolated*“ Probe wurden 300  $\mu\text{l}$  der Protein-Probe in ein Röhrchen gefüllt, schockgefroren und für die oxidierte Probe wurden 300  $\mu\text{l}$  mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (1 mM) versetzt und 2 min inkubiert, bevor die Probe in ein Röhrchen gefüllt und schockgefroren wurde. Die Proben wurden bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.5.17 Manuelle Redoxtitration

Zur Bestimmung des elektrochemischen Potentials wurde eine Redoxtitration unter anaeroben Bedingungen im anaeroben Zelt durchgeführt. Für die Redoxtitration wurde ein Ansatz aus Mediatormix 1,  $\text{PP}_i$ -Puffer und Proteinprobe verwendet.

**Tabelle 39: Redoxtitrationsansatz**

Protein	ca. 3 mg/ml
$\text{PP}_i$ -Puffer	200 mM
Mediatormix 1	40 $\mu\text{M}$
Endvolumen von 3,00 ml.	

## Methoden

Der Mediatormix 1 bestand aus Mediatoren, die unter Sauerstoffausschluss gelöst wurden und dient dazu das elektronische Potential in der Lösung zu puffern. Das Potential des Gemisches wurde langsam verringert, indem definierte Mengen an einer frisch angesetzten Natriumdithionit-Lösung (2 mM, 20 mM, 50 mM in 200 mM  $\text{PP}_i$ -Puffer, pH = 9,0) hinzugegeben wurde und dabei das Potential der Probe mit einer Redoxelektrode (Silber/Silberchlorid, +207 mV) gemessen wurde. Somit wurde das Potential des Gemisches schrittweise verringert und an verschiedenen Punkten wurde jeweils eine Probe (300  $\mu\text{l}$ ) entnommen, in ein ESR-Röhrchen überführt, mit Gummistäbchen versiegelt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Sicherstellung, dass das Protein zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahme noch funktionsfähig und voll reduzierbar war, wurde eine weitere Probe entnommen und diese mit einem Überschuss an Natriumdithionit vollständig reduziert, in ein Röhrchen gefüllt und schockgefroren. Von diesen Proben wurden anschließend ESR-Spektren gemessen.

### Mediatormix 1

Safranin O	-289 mV
Neutralrot	-329 mV
Benzylviologen	-358 mV
Methylviologen	-449 mV

### 3.5.18 Automatisierte Redoxtitration

Die automatische Redoxtitration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie begleitet, indem alle 3 min ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen wurde, während parallel das Potential gemessen wurde. Zur Reduktion wurden alle 4 min 15  $\mu\text{l}$  Natriumdithionit-Lösung (15  $\mu\text{l}$ , 0,3 mM, in 200 mM  $\text{PP}_i$ -Puffer) für 1 min mittels einer P1-Pumpe zu dem Protein-Mediatormix 2 (Mediatormix 2: 186  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{M}$  Endkonz.) in der UV-Küvette im Photospektrometer titriert, 2 min unter Rühren homogenisiert, anschließend ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen ( $\lambda = 200\text{--}850$  nm, 2 min) und gleichzeitig das Redoxpotential vermessen.

**Tabelle 40: Ablauf der automatischen Redox Titration**

1 min	Zugabe von 15 µl/min Natriumdithionit-Lösung (0,3 mM)
2 min	Homogenisierung durch Rühren
2 min	Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums und das dazugehörige Potential

Bevor die Protein-Redox Titration gestartet wurde, wurde eine Blind-Redox Titration ohne Protein ausschließlich mit Mediatormix 2 durchgeführt. Vor dem Start der automatischen Titration, wurde das Protein in  $PP_i$ -Puffer von  $\lambda = 250-800$  nm, sowohl vor als auch nach der Zugabe des Mediatormix 2 (10 µM Endkonz.), vermessen. Danach wurde die Titration nach dem Ablauf der automatischen Redox Titration in Tabelle 40 gestartet und für insgesamt 20 aufeinander folgenden Durchgänge vollzogen.

#### Mediatormix 2

Neutral Rot	-329 mV
Benzylviologen	-358 mV
Methylviologen	-449 mV

### 3.5.19 Mößbauer-Spektroskopie

Die Mößbauer-Spektroskopie ist eine wichtige Untersuchungsmethode um Kernzustände auf ihre elektronische und magnetische Umgebung zu untersuchen (Mößbauer, 1958). Hierbei erfolgt die Emission und Absorption von  $\gamma$ -Quanten rückstoßfrei. Um eisenhaltige Verbindungen messen zu können, wird eine  $^{57}\text{Fe}$ - $\gamma$ -Strahlungsquelle und das  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop benötigt. Dieses liegt allerdings nur in einer sehr geringen Menge natürlich vor und muss deshalb explizit bei der Züchtung der Kulturen eingebaut werden. Zum Einbau von  $^{57}\text{Fe}$  wurde zunächst eine  $^{57}\text{Fe}$ -Ammoniumeisencitratlösung angefertigt. Dafür wurde  $^{57}\text{Fe}$  (33,5 mg) in ein kleines Pillenglas eingewogen und in 1 ml HCl (8 M) über Nacht, mit Parafilm verschlossen gerührt. Das Parafilm wurde mit kleinen Löchern versehen, um das Entweichen des entstehenden  $\text{H}_2$  zu ermöglichen. Am nächsten Morgen wurde zu der hellgelben Lösung 4 ml Reinstwasser und Trinatriumcitrat-dihydrat (200 mg) hinzugegeben. Mit Ammoniak (12,5 %) wurde anschließend ein pH-Wert zwischen 5 und 6 eingestellt. Die  $^{57}\text{Fe}$ -Ammonium-eisencitratlösung wurde aliquotiert und bei  $-20$  °C gelagert. Im nächsten Schritt folgte der Einbau von  $^{57}\text{Fe}$  in den Eisen-Schwefel-Cluster während dem Zellwachstum. Dafür wurde die

## Methoden

$^{57}\text{Fe}$ –Ammoniumeisencitratlösung (50  $\mu\text{M}$ ) dem Zellmedium der Großkultur zugesetzt und wie in den Kapiteln 3.5.1–3.5.4 beschrieben, mit dem Wachstum und Zellaufschluss wie üblich weiter verfahren. Die Eluatprobe wurde auf ein maximales Volumen von 400  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert (Kapitel 3.5.5), in ein Mößbauerprobentöpfchen pipettiert und in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert. Die Aufnahme der Spektren wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Schünemann von Dr. Christina Müller und Dipl. Biophys. Jonathan Oltmanns aufgenommen. Es wurden Messungen bei 77 K und 4,2 K durchgeführt, sowie Messungen im externen Magnetfeld.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss des Eisen–Schwefel–Clusters von Hefe–Mak16

In allen Organismen sind bereits viele wichtige Eisen–Schwefel–Zielproteine bekannt, deren Cluster für die Funktion der Proteine, in den meisten Fällen, essentiell sind (siehe Einleitung). In der folgenden Arbeit wurde ein noch unerforschtes Eisen–Schwefel–Zielprotein untersucht und spektroskopisch charakterisiert. Es handelt sich hierbei um das ribosomale Reifungsprotein Mak16.

#### 4.1.1 Überexpression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16

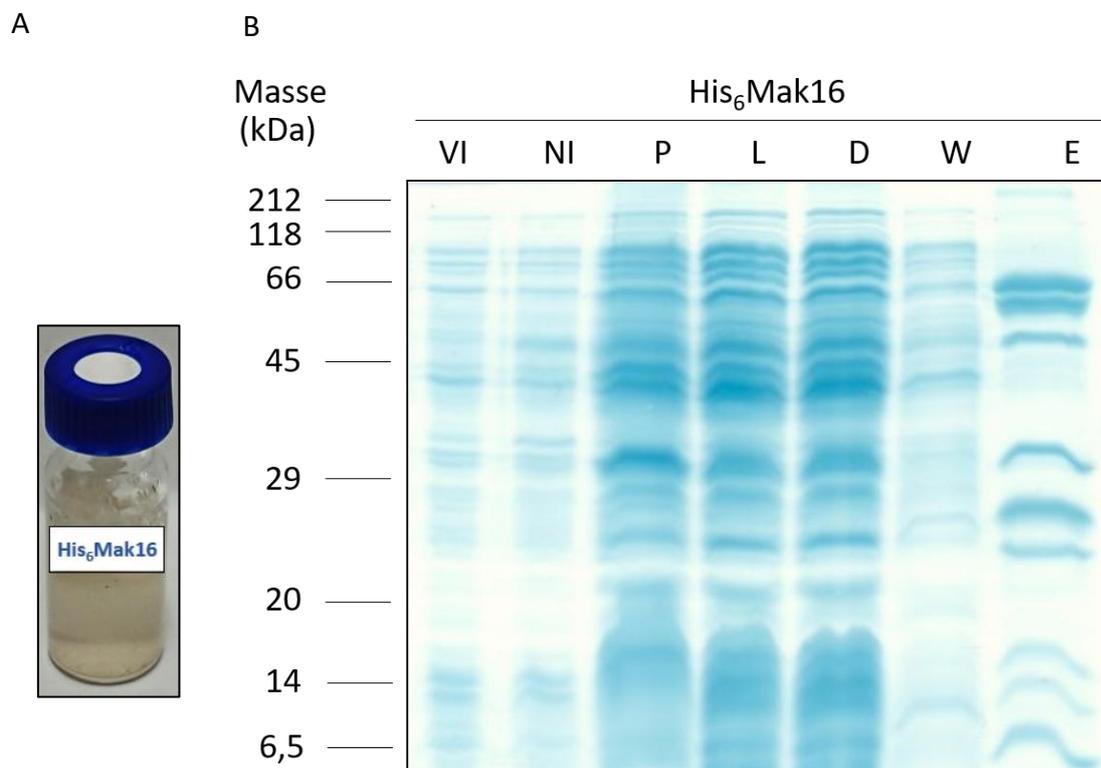
Für ein besseres Verständnis der Wichtigkeit des Mak16–Proteins während der Ribosomenbiogenese, wurde in der vorliegenden Arbeit das eukaryotische Mak16–Protein aus *S. cerevisiae*, auch als Hefe–Mak16 benannt, genauer untersucht.

Um das Hefe–Mak16 mit spektroskopischen Methoden charakterisieren zu können, ist eine Methode zur Isolierung des Proteins in Milligramm–Mengen nötig. Weit verbreitet ist hierfür die heterologe Proteinexpression. Das *MAK16*–Gen wurde dafür in die multiple Klonierungsstelle I des Expressionsvektors pETDuet–1 kloniert. Aufgrund der beobachteten Toxizität von überexprimierten Hefe–Mak16 gegenüber *E. coli* Zellen, waren besondere Bedingungen zur erfolgreichen Überexprimierung erforderlich, wie die Verwendung eines streng kontrollierten Klonierungsstammes von *E. coli* (NEB 5 alpha F'<sup>lq</sup>) und niedrige Temperaturen (25–30 °C), sowohl auf den Nährmedium–Platten als auch im flüssigen Medium (Kapitel 3.2.1–3.2.7). Die Verifizierung der Klonierung erfolgte nach der Plasmid–Isolierung und –Aufreinigung mit einem Testverdau und einer anschließenden Sequenzierung des Plasmids durchgeführt von der Firma SEQ–IT (Kapitel 3.2.8). Für die Überexprimierung wurde das designte Konstrukt pETDuet–1–His<sub>6</sub>MAK16 in *E. coli* T7 Express *lysY/l<sup>q</sup>* Zellen transformiert. Am nachfolgenden Tag wurde das LB–Amp–Medium einer Großkultur mit einer Übernachtkultur (2 % v/v) inokuliert. Das Zellwachstum und die Überexpression erfolgten wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben und die Zellen wurden anschließend im anaeroben Zelt durch Beschallung mittels Ultraschall–Homogenisator aufgeschlossen (Kapitel 3.5.3). Die Isolierung von His<sub>6</sub>Mak16 erfolgte mittels Ni–NTA–Agarose ebenfalls unter sauerstofffreien

## Ergebnisse

Bedingungen (Kapitel 3.5.4). Das farblose Eluat wurde im Tris–Elutionspuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH = 8,0) bereits nach wenigen Minuten trüb.

Die Verwendung eines Phosphat–Puffers (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 8,0 mit Konzentrationen an Imidazol wie bei den Tris–Puffern) während der gesamten Aufreinigung verbesserte die Stabilität des Proteins, sodass erstmals nicht–präzipitiertes His<sub>6</sub>Mak16–Eluat erhalten wurde. Das Eluat ist in Abbildung 10 (A) gezeigt und wies eine leicht beige Farbe auf (Ausbeute: 3,15 mg Protein pro Liter LB-Medium), was auf die Anwesenheit eines Chromophors hindeutet.



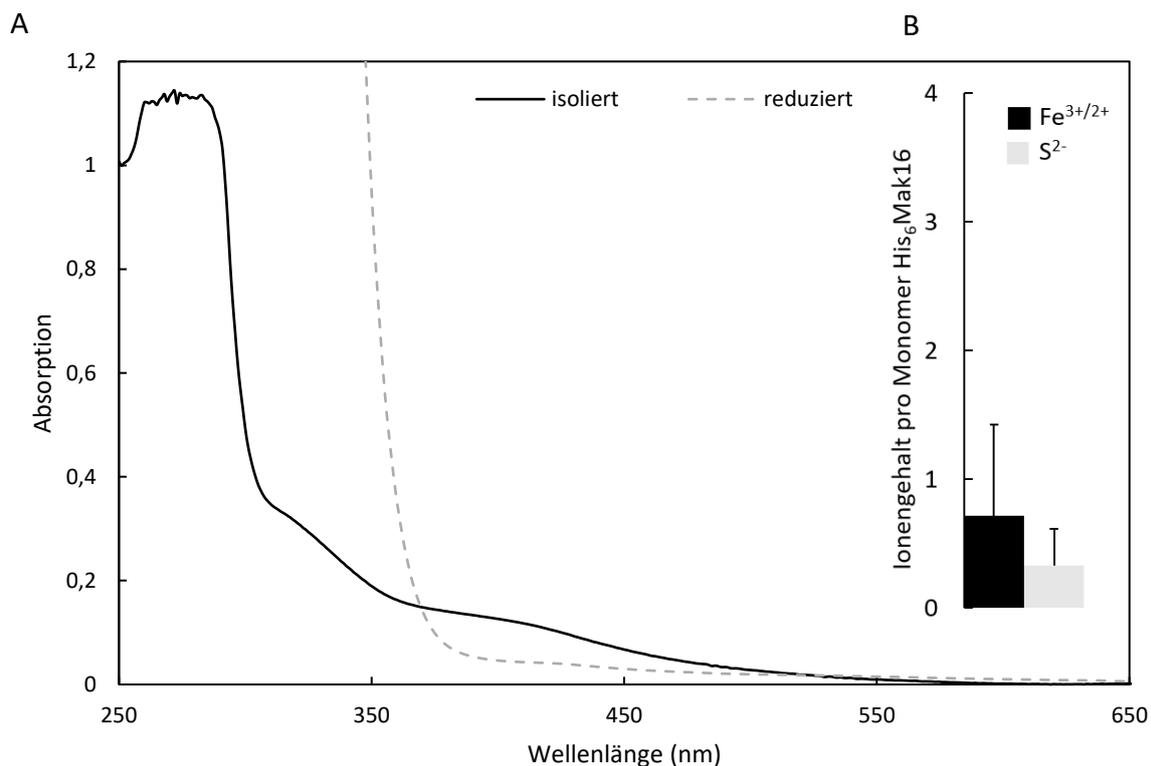
**Abbildung 10: Charakterisierung von gereinigtem His<sub>6</sub>Mak16.**

(A) Eine Photographie des gereinigten Proteins ist abgebildet. (B) Die mit Coomassie gefärbte SDS–PAGE zeigt die während der Aufreinigung entnommenen Proben sowie dem Eluat (ca. 3,5 µg). Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), Eluat (E). Marker: Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa, NEB #P7702). Dateinamen: SDS–PAGE His<sub>6</sub>Mak16 20190220.jpg, Eluat His<sub>6</sub>Mak16 20190220.jpg.

Während der Expression, Isolierung und Aufreinigung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und anschließend mit Hilfe der SDS–PAGE (12,5 %) untersucht (Kapitel 3.5.12). Das Ergebnis ist in Abbildung 10 (B) dargestellt. In der dargestellten Reinigung, sowie bei wiederholter Reinigung unter identischen Bedingungen, zeigte sich eine Bande bei etwa

50 kDa, sowie zwei weitere Bande bei ca. 70 kDa und einige Abbauprodukte oder kontaminierende Proteine unter 30 kDa.

Abbildung 11 (A) zeigt das aufgenommene UV/Vis-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 330$  und  $410\text{--}430$  nm. Durch eine Reduktion mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.), konnte das Vorkommen eines Redox-aktiven Eisen-Schwefel-Clusters nachgewiesen werden. Dazu betrachtet man die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 410\text{--}420$  nm. Bei dieser Wellenlänge nimmt durch die Reduktion des Clusters die Absorption um ca. 50 % ab (Abbildung 11 (A), grau gestrichelte Linie) (Mukund *et al.*, 1990). His<sub>6</sub>Mak16 zerfiel anschließend innerhalb sehr kurzer Zeit, wodurch eine deutliche Trübung des Eluats entstand. Diese Instabilität erschwerte weitere spektroskopische Untersuchungen. Abbildung 11 (B) zeigt die gemessenen Eisen- und säure-lablen Schwefelwerte pro Monomer His<sub>6</sub>Mak16 von ca.  $0,7 \pm 0,7$  Eisen- und  $0,3 \pm 0,3$  Sulfidionen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von His<sub>6</sub>Mak16 in einer labilen, hauptsächlich semi-Apo-Form von Mak16 resultierte.

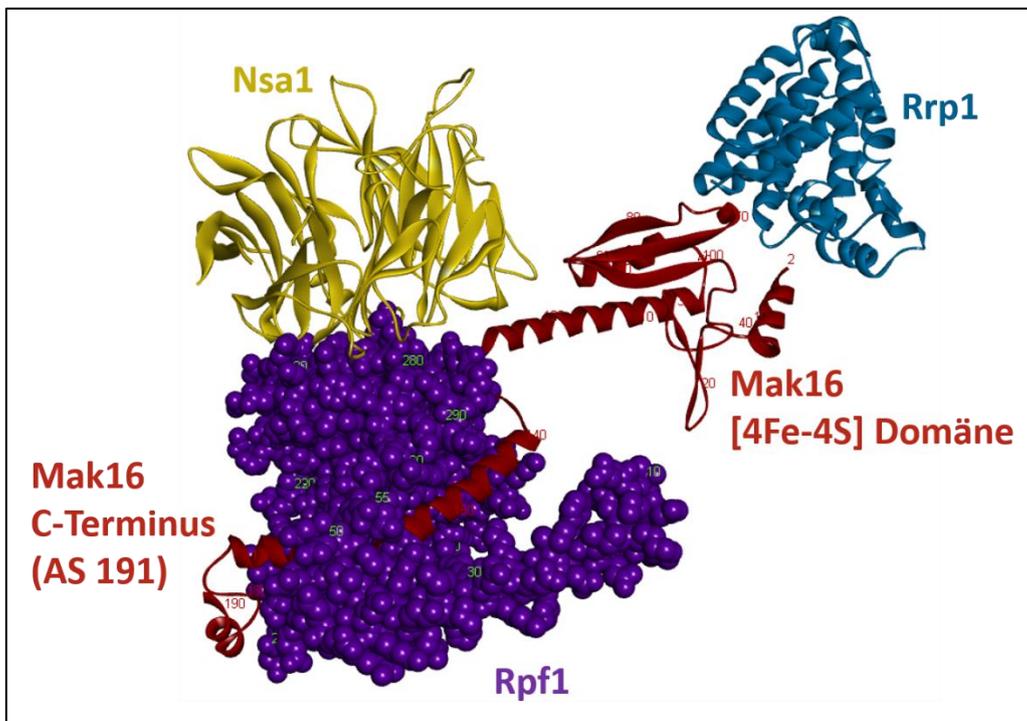


**Abbildung 11: UV/Vis-Spektrum von His<sub>6</sub>Mak16.**

(A) Dargestellt sind die UV/Vis-Spektren der isolierten (0,5 mg/ml Proteinkonz.) und mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduzierten Proben im Bereich von  $\lambda = 250\text{--}650$  nm. Als Blindwert diente der Entsalzungspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 8,0). (B) Gezeigt wird der Eisen- und säure-labile Schwefelgehalt von His<sub>6</sub>Mak16 pro Proteinmonomer [ $n=2$ ]. Dateinamen: UV-Vis His<sub>6</sub>Mak16 20190220.xlsx, Eisen-Schwefelgehalt His<sub>6</sub>Mak16 20190220-20180406.xlsx, [ $n=2$ ].

## Ergebnisse

Parallel zu meiner Forschung wurden erste Kryo-EM-Strukturen von Mak16 veröffentlicht (Kater *et al.*, 2017). Diese gaben Aufschluss über die Struktur des N-terminalen Teils von Mak16 mit einer maximalen Länge von 191 Aminosäuren (PDB-Nr: 6COF). Das Fehlen des C-terminalen Teils ab AS 191 deutet auf proteolytischen Abbau oder eine ungeordnete, sehr flexible Struktur hin. Anhand dieser neuen Erkenntnisse und mit Hilfe von *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* wurde die Struktur des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls visualisiert. Hierbei wurde die Bindung zwischen Mak16 und Rpf1 deutlich. Abbildung 12 zeigt wie die lange  $\alpha$ -Helix des BAP-Proteins (*Brix domain associated protein*) Mak16 (AS: Lys 140 bis Ser 172) durch das Brix-Protein Rpf1 ragt. Ein nahegelegenes  $\beta$ -Faltblatt von Rpf1 vervollständigt diese Brix-Bindung. Demnach lag eine Überexpression der beiden Bindungspartner zur Stabilisierung von Mak16 als nächster Schritt nahe (Kater *et al.*, 2017).



**Abbildung 12: Strukturmodell des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls visualisiert mit BIOVIA Visualizer.**

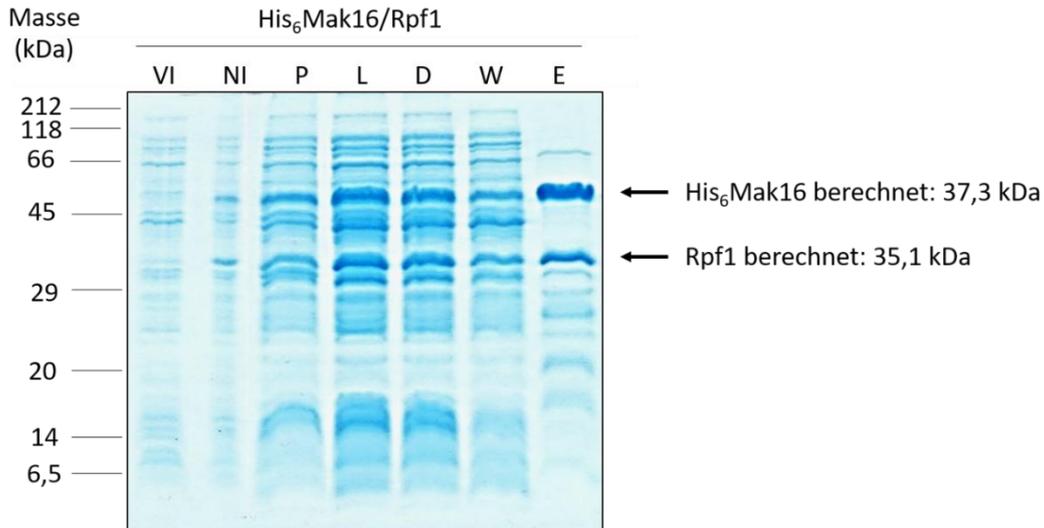
Gezeigt ist die 3D-Struktur des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls erstellt nach dem Eintrag der PDB Bank: 6COF. Gelb: Nsa1, Blau: Rrp1, Rot: Mak16 (1-191) und Lila: Rpf1. Zur besseren Veranschaulichung der Bindung zwischen Rpf1 und Mak16 wurde Rpf1 im CPK (space filling spheres: raumfüllende Kugeln) Stil und Mak16 im Bänderstil dargestellt. Eigene Darstellung mit BIOVIA Discovery Studio 2019.

#### 4.1.2 Überexpression und Aufreinigung des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplexes

Die Gene *MAK16* und *RPF1* aus Hefe wurden in die multiplen Klonierungsstellen des T7-Expressionsvektor pETDuet-1 kloniert. Die Familie der Duet-Vektoren tragen kompatible Eigenschaften um in einem geeigneten Wirtsstamm maximal acht Zielgene gleichzeitig zu koexprimieren. Sie tragen kompatible Replikons, unterschiedliche Antibiotikaresistenzen und besitzen jeweils zwei Multiple Klonierungsstellen. In einem ersten Klonierungsschritt wurde *RPF1* in die MSC II (*XhoI/NdeI*) und in einem zweiten Schritt *MAK16* in die MCS I (*BamHI/PstI*) kloniert (Kapitel 3.2.1–3.2.8). Die Überexpression der beiden Proteine über den pETDuet-1-*His<sub>6</sub>MAK16/RPF1*-Vektor erfolgte ebenfalls über Nacht in *E. coli* T7-Express *lysY/l<sup>q</sup>* Zellen. Jedoch wurde die Temperatur von 30 °C auf 20 °C reduziert, um ein langsames Wachstum zu gewährleisten. Die Aufreinigung erfolgte erneut mittels Ni-NTA-Agarose unter anaeroben Bedingungen. Als Lysis-Puffer wurde 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8,0 verwendet. Der Wasch- und der Elutions-Puffer enthielten dagegen 20 mM und 250 mM Imidazol, die anderen Komponenten waren identisch (Kapitel 3.5.4). Die SDS-PAGE (Abbildung 13) zeigte, mit Ausnahme zur der Vor-Induktionsprobe (VI), in allen während der Aufreinigung gesammelten Proben (NI, P, L, D, W) zwei Hauptbanden mit apparenten Massen von 35 und 52 kDa. Die Eluatprobe (E) zeigt ebenfalls zwei ausgeprägte Hauptbanden und weiterhin einige Abbauprodukte oder kontaminierende Proteine unter 30 kDa. Hierbei zeigt His<sub>6</sub>Mak16 (berechnete Masse: 37,3 kDa) ein irreguläres, elektrophoretisches Laufverhalten mit einer ungefähren Masse von 52 kDa, während die Masse von Rpf1 (berechnete Masse: 35,1 kDa) erwartungsgemäß bei 35 kDa detektiert wurde. Dieses außerordentliche Laufverhalten von His<sub>6</sub>Mak16 ist durch den relativ hohen Anteil negativ-geladener Reste bedingt. Eine einfache Erklärung für diese Beobachtung ist, dass stark saure Domänen in der Struktur von Mak16 SDS elektrostatisch abstoßen. Dies führt zu einer relativ geringen SDS-Bindung und folglich zu einer niedrigen elektrophoretischen Mobilität.

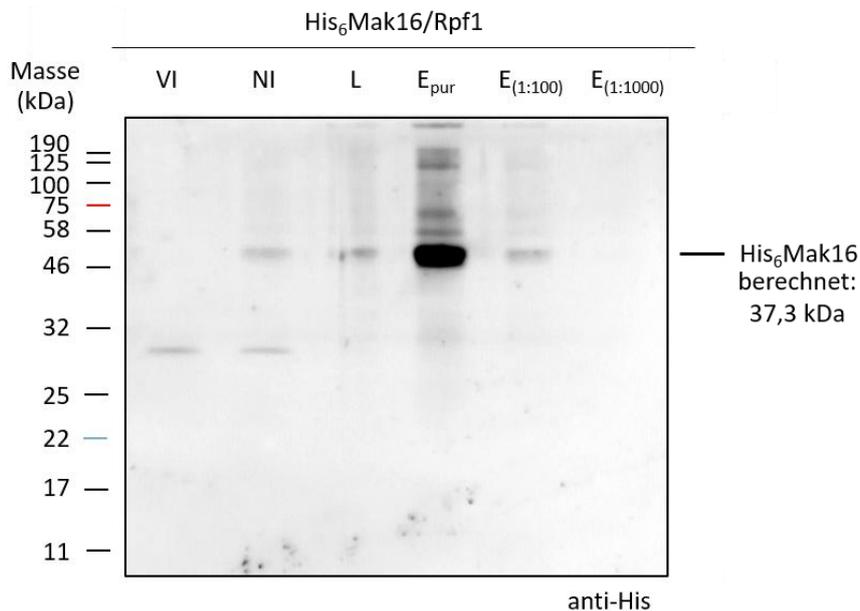
Zur Verifizierung ob His<sub>6</sub>Mak16 tatsächlich mit der Proteinbande bei 52 kDa korreliert, wurde eine Western-Blot-Analyse mit monoklonalem Antikörper gegen den His<sub>6</sub>-Tag des His<sub>6</sub>Mak16-Proteins durchgeführt (Abbildung 14).

## Ergebnisse



**Abbildung 13: SDS-PAGE von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1.**

Die SDS-PAGE zeigt die während der Aufreinigung entnommenen Proben sowie dem Eluat (ca. 5 µg). Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), Eluat (E). Marker: Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa, NEB #P7702). Dateiname: SDS-PAGE His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1 20190321.jpg.

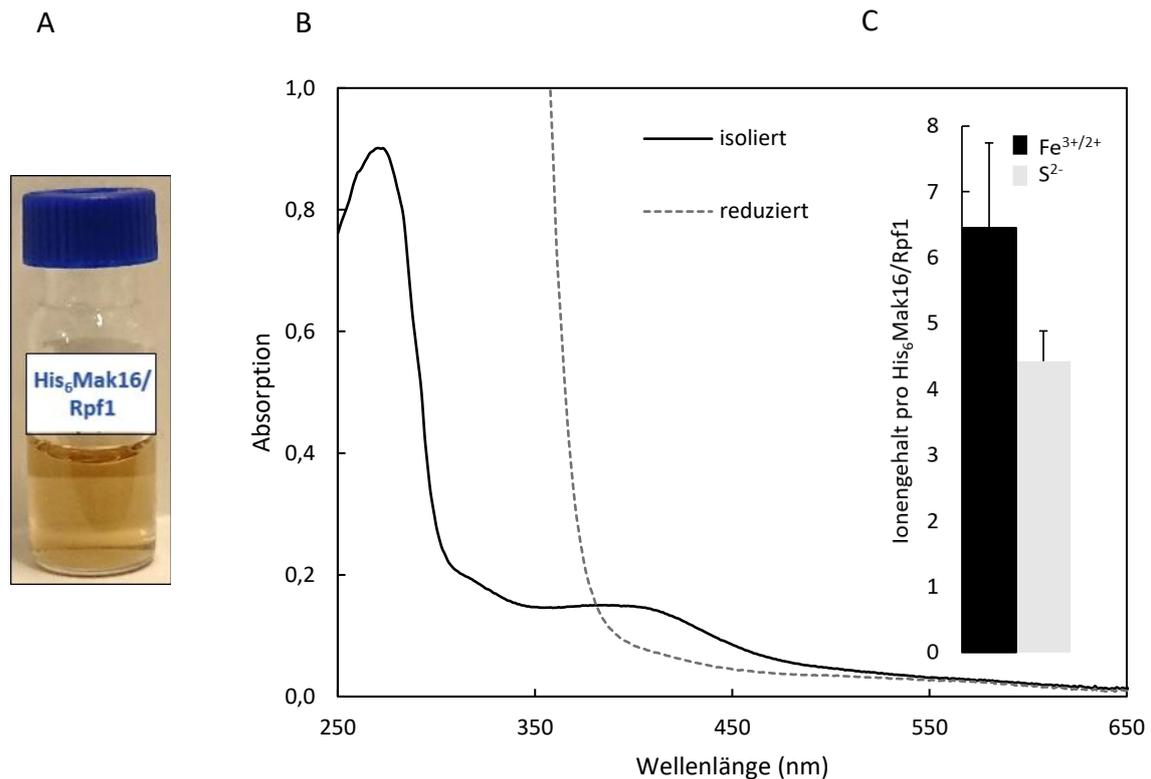


**Abbildung 14: Nachweis von His<sub>6</sub>Mak/Rpf1 mittels Western-Blot.**

Es wurden Proben, die während der Aufreinigung entnommenen wurden, das Eluat (E<sub>pur</sub>: 3 µg) und Verdünnungen (1:100, 1:1000) des Eluats, untersucht. Der Nachweis von His<sub>6</sub>Mak16 erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung des His-Antikörpers (6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) Invitrogen) mittels Western-Blot. Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), Eluat (E: Eluat nach Größenausschlusschromatographie (Maximum 2, siehe Abbildung 25)), sowie die Eluat Verdünnungen 1:100 und 1:1000. Marker: Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11–190 kDa, NEB #P7706). Belichtung: 20 min. Dateiname: Western-Blot His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1 anti-His.jpg, [n=1].

Die Analyse der verschiedenen während der Aufreinigung entnommenen Proben belegt, im Eluat sowie in den Eluat-Verdünnungen (100x, 1000x), das außerordentliche Laufverhalten von His<sub>6</sub>Mak16 bei ca. 52 kDa.

Die Aufreinigung lieferte eine Ausbeute von 3,46 mg Protein pro Liter LB-Medium als klares bräunliches Eluat (Abbildung 15 (A)), wobei ein Teil des Protein-Komplexes an das Säulenmaterial gebunden blieb, was auf Aggregation des Proteins hinweist. Nach der Entsalzung (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 8,0), zur Entfernung des Imidazols, blieb erstmals eine Trübung des Eluats aus. Die entsalzten Fraktionen wurden vereinigt und mit einem Konzentrator der Ausschlussgröße von 10 kDa aufkonzentriert (Kapitel 3.5.5). Das UV/Vis-Spektrum (Abbildung 15 (B)) des gereinigten His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplexes zeigte ebenfalls die Absorptionsmaxima von His<sub>6</sub>Mak16, jedoch mit einer breiteren strukturierten Schulter mit höherer Absorption im Bereich von 410–420 nm, im Vergleich zu His<sub>6</sub>Mak16 (Abbildung 11). Die gemessenen Eisen- und säure-labilen Schwefelwerte zeigten eine deutliche Steigerung des Ionengehaltes pro Monomer Protein im His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplex im Vergleich zu His<sub>6</sub>Mak16, mit Werten von ca.  $6,4 \pm 1,3$  Eisen- und  $4,4 \pm 0,4$  Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 (Abbildung 15 (C)). Diese Werte sind jedoch nicht mit nur einem intakten [4Fe-4S]-Cluster in His<sub>6</sub>Mak16 erklärbar. Sie können auch darauf hindeuten, dass zusätzliches Eisen an Protein-Aggregaten des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplexes gebunden ist.

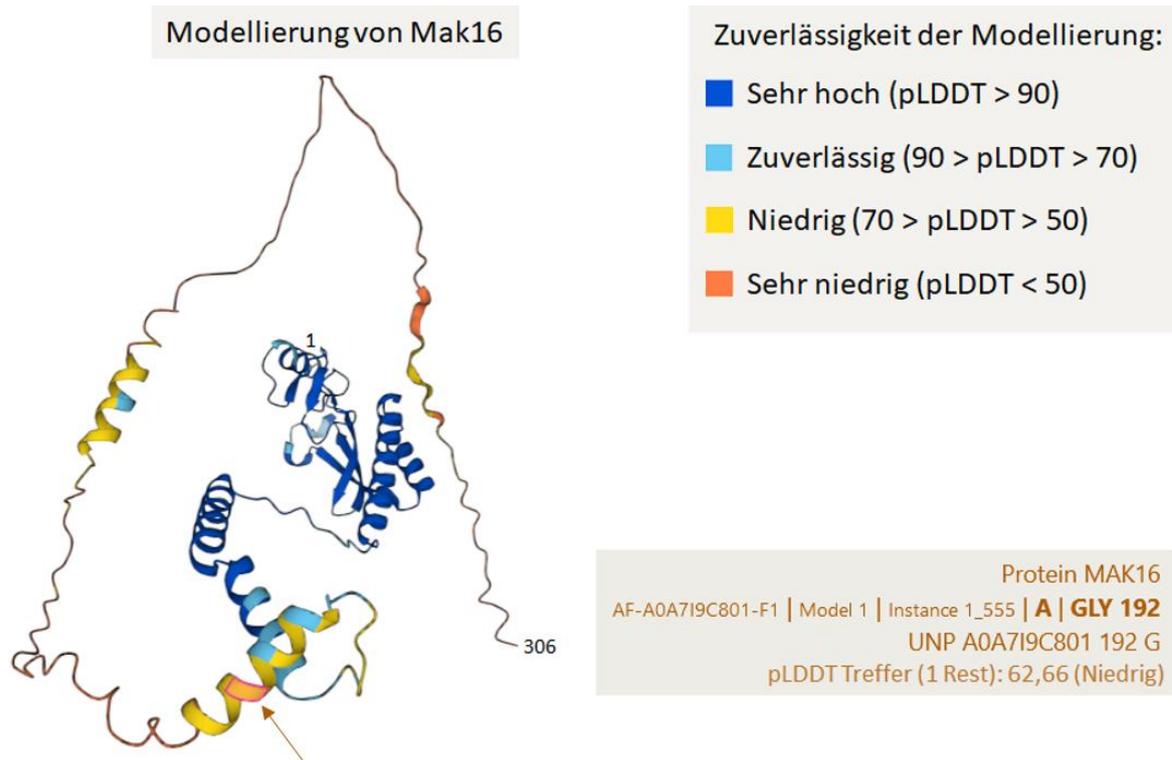


**Abbildung 15: Charakterisierung von gereinigtem His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplex.**

(A) Eine Fotografie des gereinigten Proteinkomplexes ist abgebildet. (B) Die UV/Vis-Spektren der isolierten (0,6 mg/ml Proteinkonz.) und mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduzierten Proben sind im Bereich von  $\lambda = 250 \text{ nm} - 650 \text{ nm}$  dargestellt. Als Blindwert diente der Entsalzungspuffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH = 8,0). (C) Gezeigt wird der Eisen- und säure-labile Schwefelgehalt von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1. Dateinamen: Eluat His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1 20190208.jpg, UV-Vis His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1 20190321.xlsx, Eisen-Schwefelgehalt His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1 20190208-20190321-20191106, [n=3].

#### 4.1.3 Überexpression und Aufreinigung des His<sub>6</sub>Mak16<sub>1-191</sub>/Rpf1-Komplexes

Zur Optimierung des Proteinkomplexes His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 im Hinblick auf die vermutlich sichtbaren Proteinabbau-Banden auf der SDS-PAGE Abbildung 13, wurde die Struktur von Mak16 in Kryo-EM-Daten erneut betrachtet. Mittels der *AlphaFold Protein Structure Database* konnte der räumliche Aufbau von Mak16 visualisiert werden (Abbildung 16). Solche flexiblen Regionen sind strukturell gesehen anfälliger für den proteolytischen Abbau während der Überexpression und Aufreinigung in *E. coli*. Daher wurde ein Konstrukt entworfen, bei dem dieser Teil von Mak16 entfernt wurde, um weitere Untersuchungen durchzuführen.



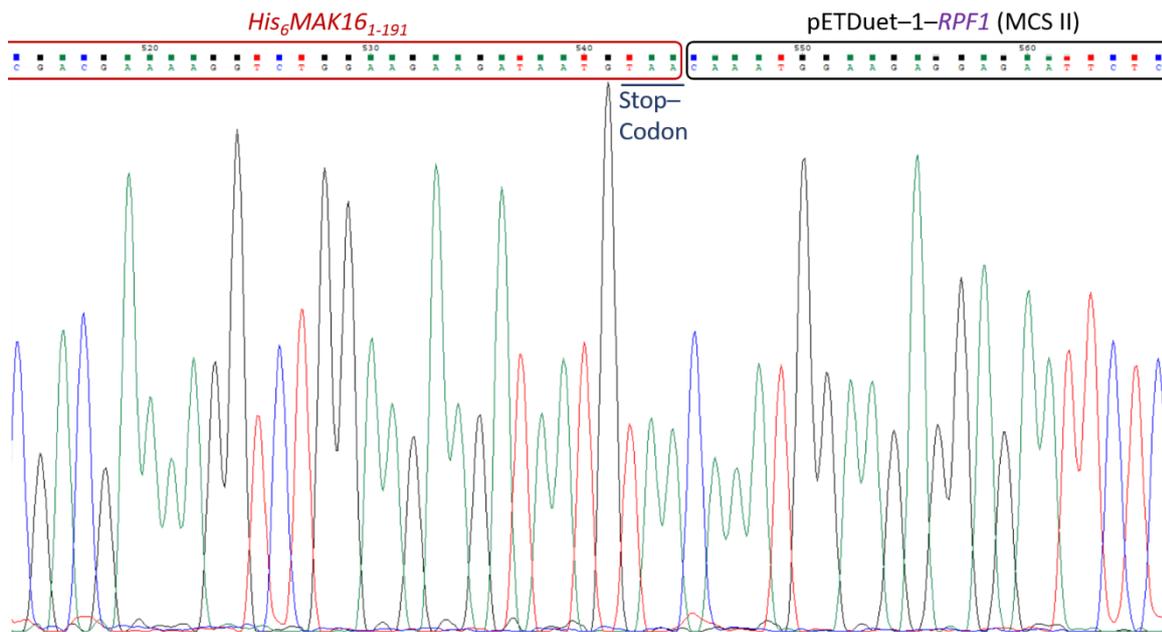
### Einführung eines STOP Codons (AS 192)

#### Abbildung 16: 3D-Modellierung von Hefe-Mak16.

Gezeigt ist die 3D-Modellierung von Mak16 (1–306 AS) mittels AlphaFold. Zur besseren Veranschaulichung der Zuverlässigkeit dieses Modells sind die einzelnen Abschnitte nach der Zuverlässigkeit der Strukturvorhersage farblich gekennzeichnet. Die Aminosäure an der 192. Stelle wurde hervorgehoben und zeigt die Stelle, an der das STOP Codon eingeführt wurde. (AlphaFold Protein Structure Database)

Dafür wurde im nächsten Schritt mittels zielgerichteter Mutagenese ein TAA STOP Codon an die Stelle des Codons für Glycin 192 in das *MAK16* Gen in pETDuet–1–*His<sub>6</sub>MAK16/RPF1* eingeführt (Kapitel 3.2.9). Die erfolgreiche Einführung wurde mittels Sequenzierung der isolierten Plasmid–DNA bestätigt (Abbildung 17).

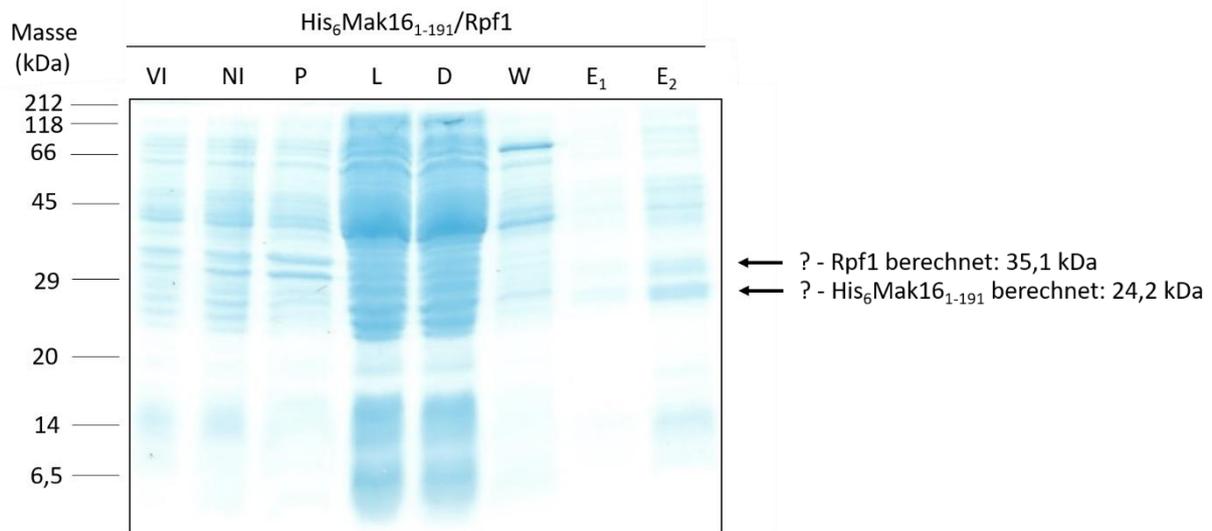
## Ergebnisse



**Abbildung 17: Sequenzierungsauszug von *His<sub>6</sub>Mak16* mit erfolgreicher Stop-Codon Mutation.**

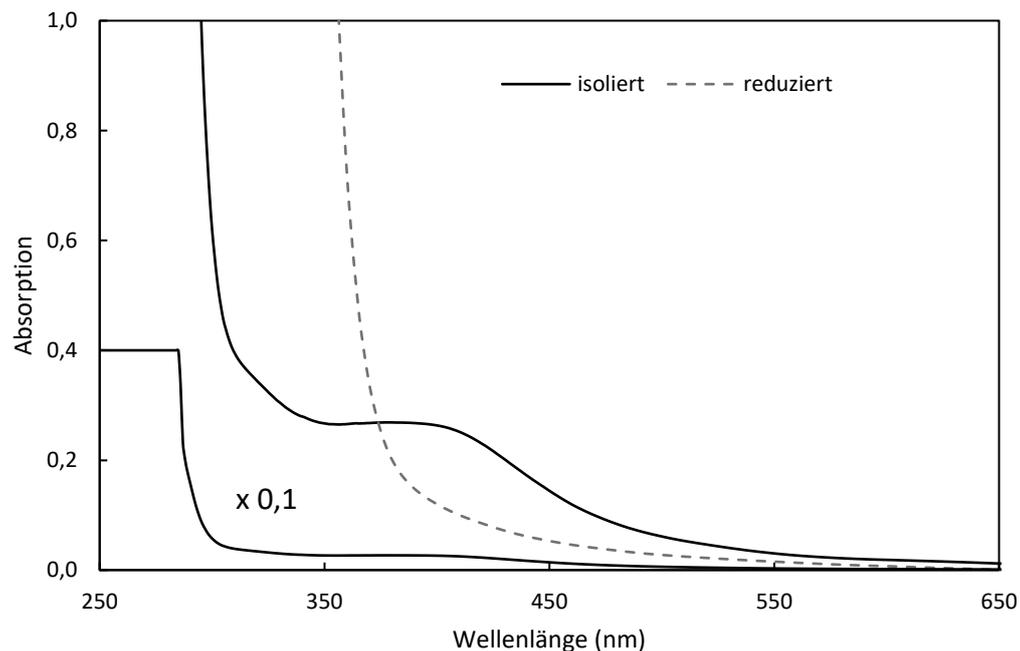
Die von der Firma SEQ-IT analysierte Probe wurde mit der Chromas Software ausgewertet.

Die anschließende Überexpression und Aufreinigung wurde analog zum beschriebenen Prozedere der Reinigung von *His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1* durchgeführt (Kapitel 3.5.1, 3.5.3 und 3.5.4). Bereits visuell konnte nach dem Zellaufschluss mit anschließender Zentrifugation, ein sehr heller Überstand beobachtet werden, welcher auf eine geringe Proteinexpression und/oder geringen Eisen-Schwefel-Cluster Einbau hindeutet. Die anschließende Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose lieferte ein hellgelbes Eluat. Eine Analyse mittels SDS-PAGE zeigte keine markanten Unterschiede zwischen Vor und Nach Induktion und im Eluat werden geringe Mengen an Proteinen (E2) und Kontaminanten angereichert (Abbildung 18). Das UV/Vis-Spektrum in Abbildung 19 zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 340 und 410–420 nm für das Eluat, was auf eine kleine Menge an isoliertem *His<sub>6</sub>Mak16<sub>1-191</sub>* hindeutet. Das Protein wurde unverdünnt vermessen und der geringe Anteil an Cluster (410–420 nm) konnte mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduziert werden. Bereits nach kurzer Zeit zeigte sich jedoch eine Trübung der Probe, die auf Präzipitation der Proteine hindeutete, weshalb dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde ([n=2]).



**Abbildung 18: SDS-PAGE von His<sub>6</sub>Mak16<sub>1-191</sub>/Rpf1.**

Die mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE zeigt die während der Aufreinigung entnommenen Proben sowie dem Eluat. Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), verdünntes Eluat (E<sub>1</sub>), Eluat (E<sub>2</sub>). Marker: Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa, NEB #P7702). Dateiname: SDS-PAGE His<sub>6</sub>Mak16<sub>(1-191)</sub>-Rpf1 20190709.jpg.

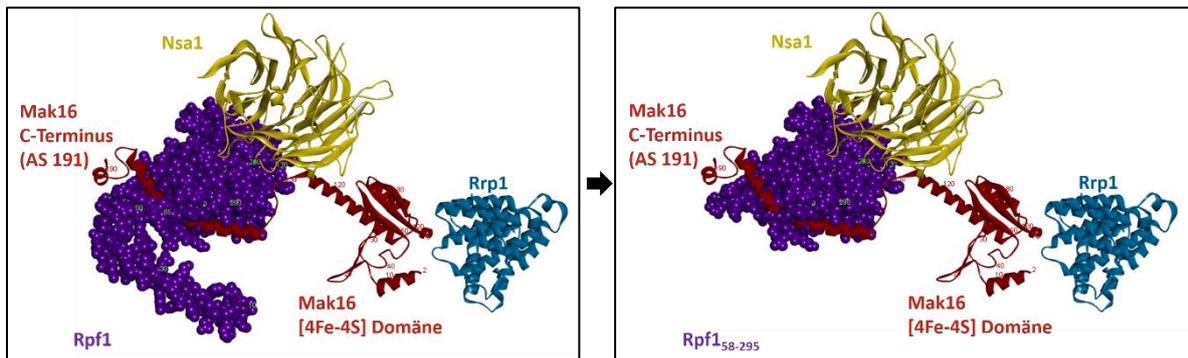


**Abbildung 19: UV/Vis-Spektrum von His<sub>6</sub>Mak16<sub>1-191</sub>/Rpf1.**

Die UV/Vis-Spektren von His<sub>6</sub>Mak16<sub>1-191</sub>/Rpf1 isoliert und mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduziert sind dargestellt. Das Gesamtspektrum der isolierten Probe wurde verkleinert eingefügt (x 0,1). Die Absorption unter 290 nm war für eine zuverlässige Aussage zu hoch. Als Blindwert diente der Entsalzungspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 8,0). Dateinamen: UV-Vis His<sub>6</sub>Mak16<sub>(1-191)</sub>-Rpf1 20190709.xlsx.

#### 4.1.4 Überexpression und Aufreinigung des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>-Komplexes

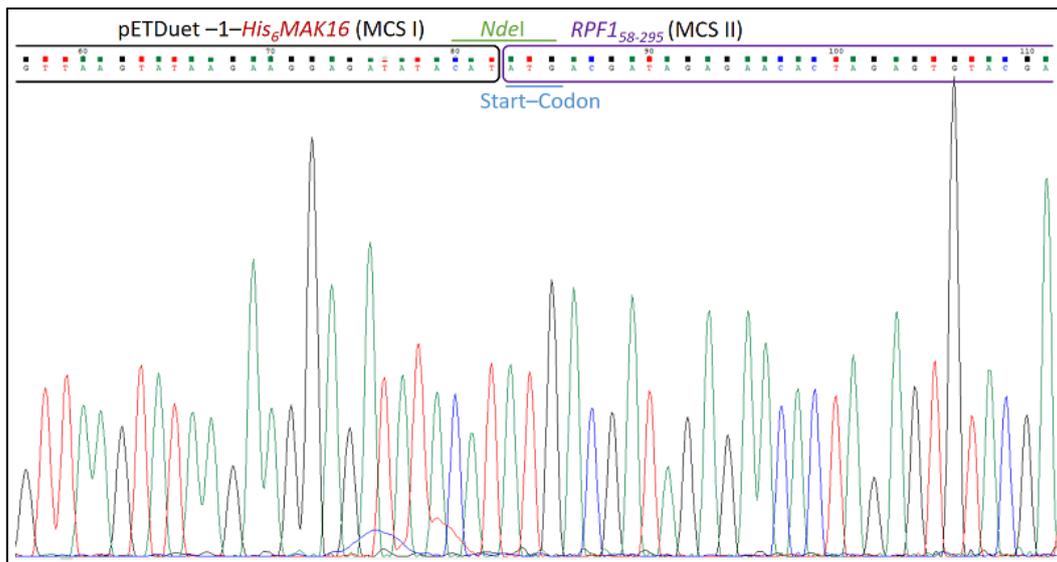
In einem weiteren Versuch wurde der N-Terminus von Rpf1 gekürzt. Die Visualisierung der Sekundärstruktur der Proteine des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16-Moduls mittels *BIOVIA Visualizer* lässt eine N-terminale flexible Verlängerung von Rpf1, die aus den Aminosäuren 1 bis 58 besteht, erkennen. In Abbildung 20 wird die Entfernung der Extension von Rpf1 im Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16-Modul dargestellt.



**Abbildung 20: Entfernung des N-Terminus von Rpf1 im Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16-Modul.**

Die Abbildung zeigt das Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16-Modul vor und nach der visuellen Entfernung des N-Terminus von Rpf1 (PDB– Nr. 6C0F). Gelb: Nsa1, Blau: Rrp1, Rot: Mak16<sub>1–191</sub>, Lila links: Rpf1 und Lila rechts Rpf1<sub>58–295</sub>. Eigene Darstellung mit der Software BIOVIA, 2019.

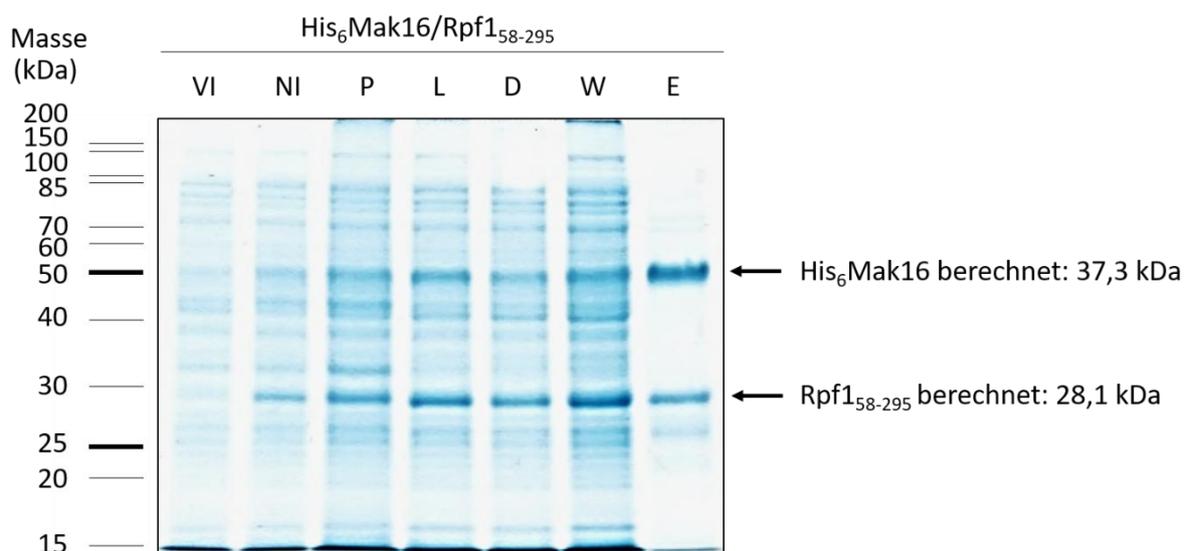
Dafür wurde das *RPF1*<sub>58–295</sub> Gen von der genomischer DNA (W303) mit entsprechenden Primern amplifiziert. Der „forward“-Primer war so designt, dass er die Schnittstelle *NdeI* (CAT ATG) und anschließend als komplementäre Basen (Nukleotide) zum genomischen Rpf1 die Codons, die für die Aminosäuren 59–66 kodieren, enthielt. Das Codon 58 von Rpf1 ist ATG und wird durch die *NdeI* Schnittstelle kodiert. Aus dem Plasmid pETDuet–1–His<sub>6</sub>MAK16/RPF1 wurde mittels Restriktionsverdau (*NdeI* und *XhoI*) das Vollhängen–*RPF1* aus der MCS II entfernt und anschließend das gekürzte *RPF1*<sub>58–295</sub> Gen, welches mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurde, in das Plasmid ligiert (Kapitel 3.2.1–3.2.8). Das neue Konstrukt pETDuet–1–His<sub>6</sub>MAK16/RPF1<sub>58–295</sub> konnte mittels anschließender Sequenzierung verifiziert werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Sequenzierungsauszug für die Deletion der Aminosäuren 1–57 von Rpf1.**

Die von der Firma SEQ-IT analysierte Probe wurde mit der Chromas Software geöffnet und ausgewertet (Chromas).

Die Überexpression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die vorherigen Aufreinigungen mit der Verwendung des Phosphat-Puffers (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10–250 mM Imidazol, pH = 9,0). Die SDS-PAGE (Abbildung 22) zeigte, dass durch die Entfernung der freibeweglichen Verlängerung von Rpf1, niedermolekulare Eluatbanden (E) deutlich reduziert werden konnten.

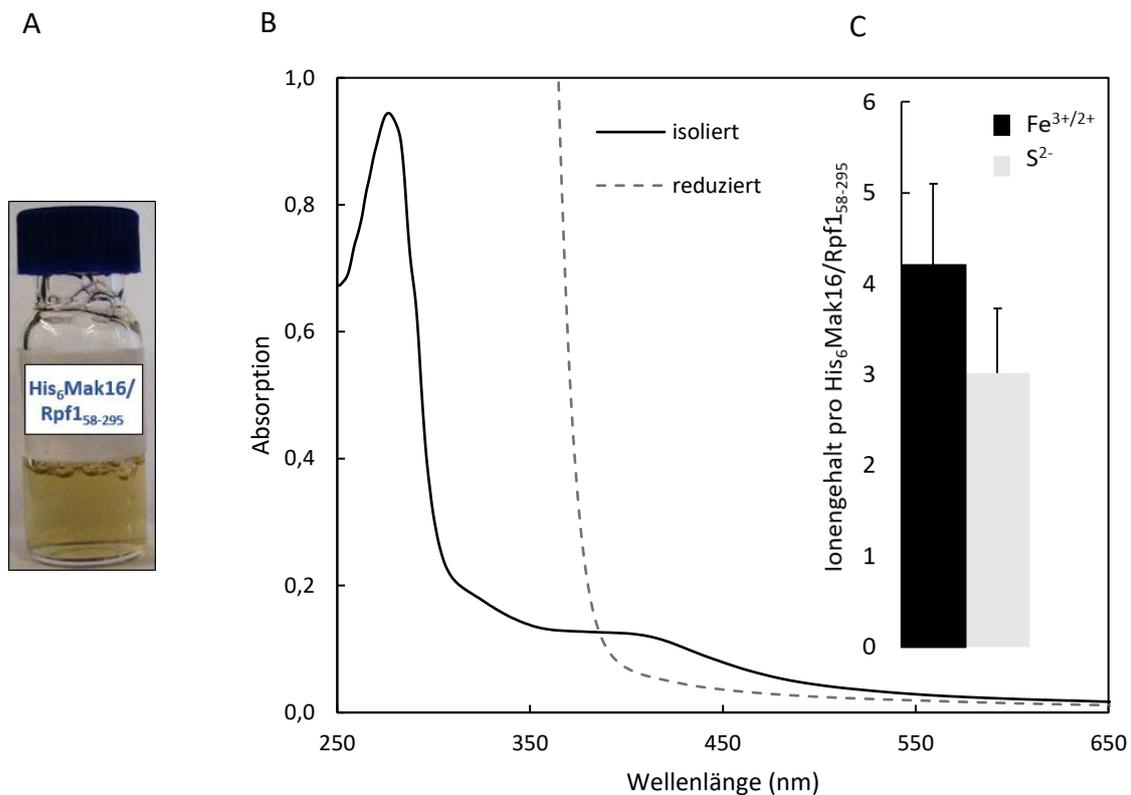


**Abbildung 22: SDS-PAGE von gereinigtem His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>.**

Die mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE zeigt die während der Aufreinigung entnommenen Proben sowie dem Eluat (ca. 10 µg). Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), Eluat (E). Marker: Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa, NEB #P7717). Dateiname: SDS-PAGE His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58-295</sub> 20210127 (WT2).jpg.

## Ergebnisse

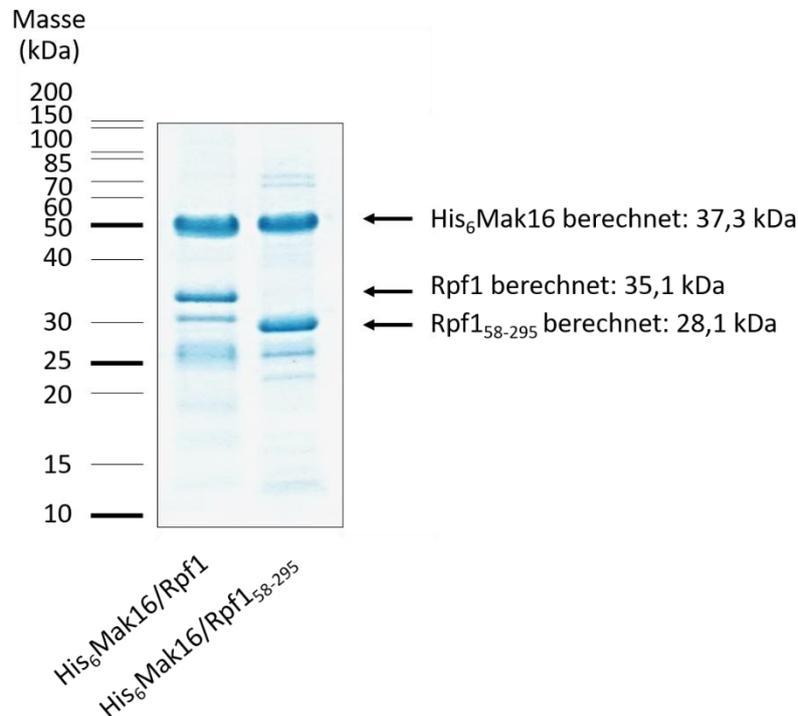
Es wurden  $2,6 \pm 1,4$  mg His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> pro Liter LB-Medium als klares, braunes Eluat erhalten (Abbildung 23 (A)). Das UV/Vis-Spektrum (Abbildung 23 (B)) ähnelt dem des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplexes mit zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 280$  nm und 410–420 nm. Die Probe ließ sich mit Natriumdithionit (4 mM) auf ca. 50 % der gemessenen Absorption bei  $\lambda = 410–420$  nm reduzieren. Die Metallanalyse des Komplexes zeigt, mit  $4,2 \pm 0,9$  Eisen- und  $3,0 \pm 0,7$  Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> ähnliche Menge an Eisen und Sulfid, wie die im His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplex gemessenen Werte (Abbildung 23 (C)).



**Abbildung 23: Charakterisierung von gereinigtem His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>-Komplex.**

(A) Eine Photographie des gereinigten Proteinkomplexes ist abgebildet. (B) Die UV/Vis-Spektren der isolierten (1,3 mg/ml Proteinkonz.) und mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduzierten Proben sind im Bereich von  $\lambda = 250–650$  nm dargestellt. Als Blindwert diente der Entsalzungspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 9,0). (C) Gezeigt wird der Eisen- und säure-labile Schwefelgehalt von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>.  
Dateinamen: Eluat His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1 58–295 20210127 (WT2).jpg, UV-Vis His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58–295</sub> 20210127.xlsx, Eisen-Schwefelgehalt His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58–295</sub> 20191118-20200128-20200421.xlsx, [n=3].

Für den direkten Vergleich wurden die Proteinkomplexe His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 und His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> zusammen auf eine SDS–PAGE aufgetragen (Abbildung 24). Diese zeigt deutlich, dass die niedermolekularen Banden bei der trunkierten Form von Rpf1, im Vergleich zum Volllängenprotein, schwächer sind.



**Abbildung 24: SDS–PAGE zum Vergleich der gereinigten Protein–Komplexe.**

Dargestellt sind die Eluatproben von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 (~ 14 µg) und His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> (~ 10 µg) auf einer mit Coomassie gefärbten SDS–PAGE. Marker: Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa, NEB #P7717).  
Dateinamen: SDS–PAGE Vergleich der Eluate His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1 und His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58–295</sub>.png.

Die Überexpression der Gene His<sub>6</sub>MAK16 und RPF1<sub>58–295</sub> lieferte somit einen präzipitationsfreien Proteinkomplex, mit einem [4Fe–4S]–Cluster, welcher im nachfolgenden Teil der Arbeit spektroskopisch untersucht und genauer charakterisiert wurde. Zur Lagerung wurden die Proteine aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

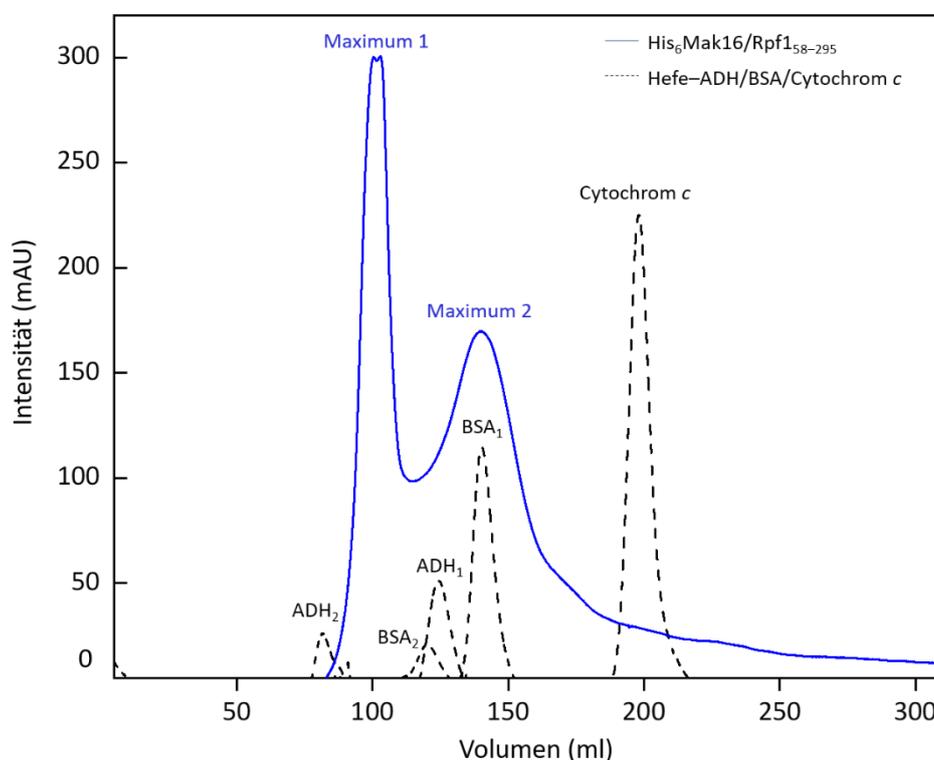
#### 4.1.4.1 Größenausschlusschromatographie des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>–Komplexes

Im Anschluss an die Ni–NTA–Chromatographie folgte die Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.5.6). Zum einen lässt sich dabei die Quartärstruktur der Proteine His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1<sub>58–295</sub> untersuchen, indem ihnen ihre nativen Molekülmassen zugeordnet werden.

## Ergebnisse

Zum anderen kann das Puffersystem gewechselt und ungewünschte Verunreinigungen durch die Auftrennung der Proteine eliminiert werden.

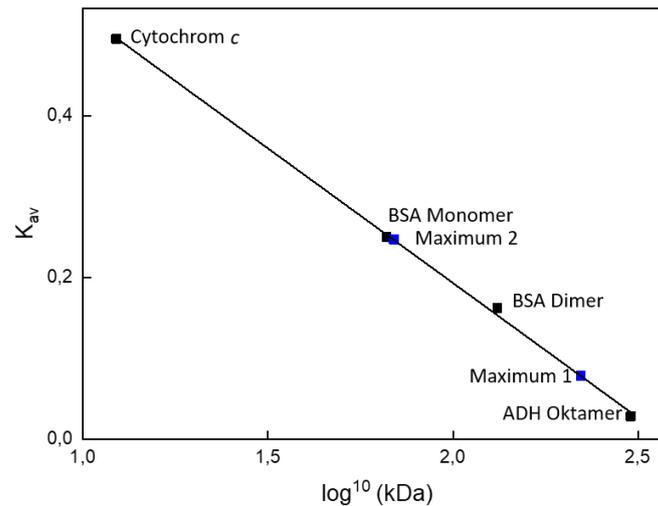
In Abbildung 25 ist das Chromatogramm von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> und den Kalibrierungsproteine ADH (Homotetramer 147 kDa, Homooktamer 294 kDa), BSA (Monomer 66 kDa, Dimer 132 kDa) und Cytochrom c (13 kDa) abgebildet. Für den His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplex lassen sich zwei ausgeprägte Maxima erkennen. Die Fraktionen des Maximums 1 wurden ab 93 ml bis 108 ml vereinigt und die Fraktionen des Maximums 2 wurden ab 128 ml bis 158 ml vereinigt und durch Membranfiltration auf jeweils 2 ml konzentriert.



**Abbildung 25: Analyse des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes mittels Größenausschlusschromatographie.**

Das Experiment wurde mit der HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare) in CAPS-Puffer (25 mM / 100 mM NaCl, pH = 10,0) durchgeführt. Für His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> wurden 6,5 ml (3 mg/ml) aufgetragen. In dem Größenausschlusschromatogramm ist das Elutionsprofil des Komplexes und das der drei Eichproteine (ADH<sub>1</sub> (ADH Homotetramer), ADH<sub>2</sub> (ADH Homooktamer), BSA<sub>1</sub> (BSA Monomer), BSA<sub>2</sub> (BSA Dimer) und Cytochrom c) aufgezeigt. Für die Trennung wurde eine Flussrate von 1 ml/min gewählt. Dateiname: Größenausschlusschromatographie von His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>.png.

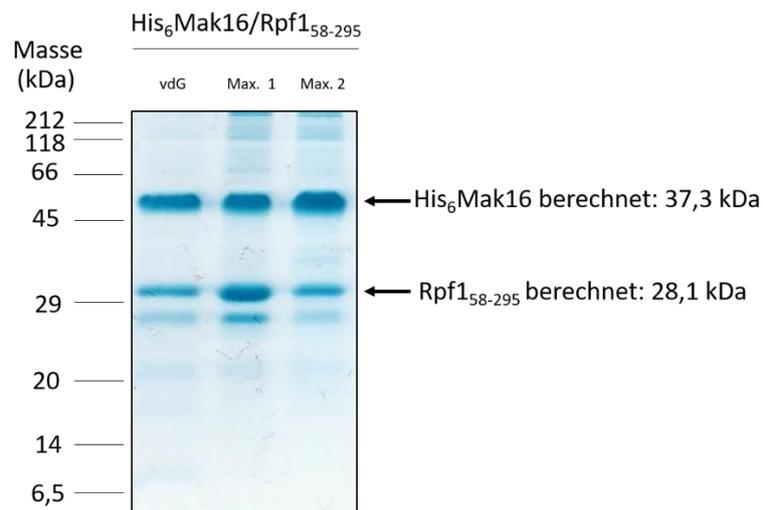
Die Abbildung 26 zeigt die Auftragung der Massen der Proteine gegen den Verteilungskoeffizienten ( $K_{av}$ ). Für die zwei gesammelten Fraktionen von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> konnten dadurch Größen für Maximum 1 von  $222 \pm 10$  kDa und für Maximum 2 von  $69 \pm 5$  kDa (hervorgehoben in blau in Abbildung 26) abgeschätzt werden.



**Abbildung 26: Kalibrierungsgerade der Eichproteine und Maxima 1 und 2.**

Anhand der bekannten Größen der Eichproteine konnte eine Eichgerade erstellt werden, indem  $K_{av}$  gegen  $\log^{10}(\text{kDa})$  aufgetragen wurde und ein linearer Fit gesetzt wurde. Mit diesem konnten die Größen der zwei Maxima-Proben des Proteinkomplexes identifiziert werden. Dateiname: Kalibrierungsgerade His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>.png.

Die aufkonzentrierten Proben Maxima 1 und 2 wurden mit Hilfe der SDS-PAGE und der UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Die Abbildung 27 zeigt die SDS-PAGE mit einer Probe vor der Größenausschlusschromatographie (vdG) und den beiden Proben, Maximum 1 und Maximum 2, nach der Größenausschlusschromatographie (Max. 1 und 2).

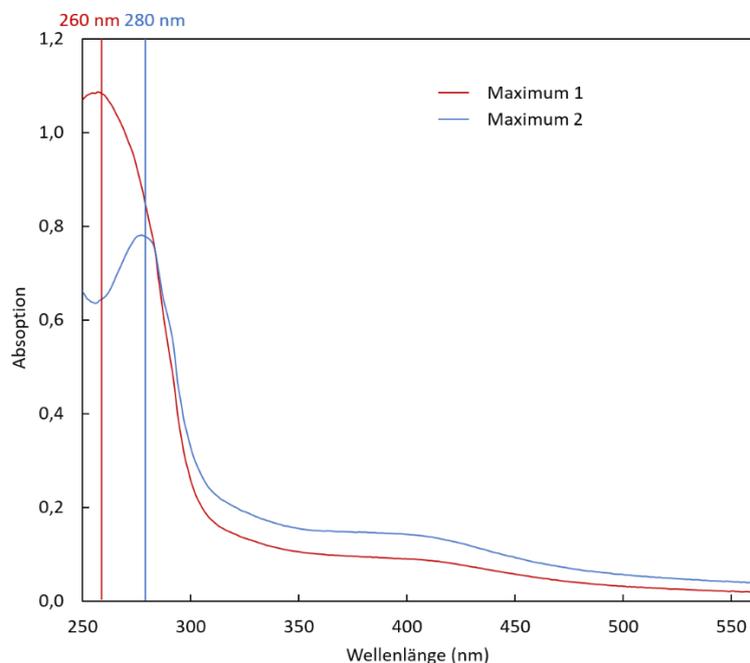


**Abbildung 27: SDS-PAGE des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes vor und nach Größenausschlusschromatographie.**

Die durch die Größenausschlusschromatografie aufgetrennten Maxima wurden separat aufkonzentriert und zusätzlich mit der vdG-Probe auf eine SDS-PAGE aufgetragen (ca. 4 µg) und mit Coomassie gefärbt. Marker: Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa, NEB #P7702). Dateiname: Größenausschlusschromatographiemaxima SDS-PAGE His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>.png.

## Ergebnisse

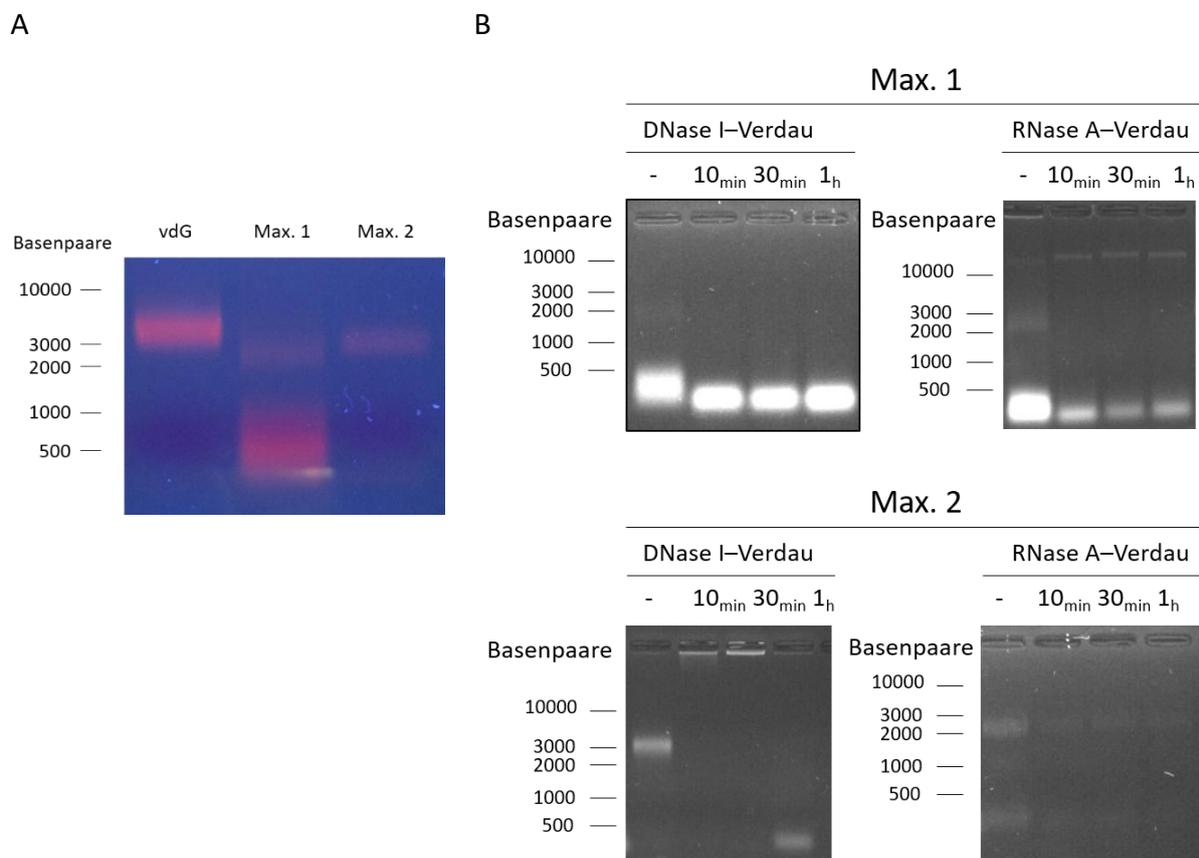
Es wurde keine ausgeprägte Abtrennung der Abbauprodukte in den drei Proben, vor- und nach der Größenausschlusschromatographie, beobachtet. Bei Max. 1 schien, im Vergleich zu den anderen Proben, eine höhere Menge an Rpf<sub>158–295</sub> im Komplex vorzuliegen, nahezu in einem äquimolaren Verhältnis zu Mak16. Allerdings zeigt diese Probe eine starke Abbaubande bei ca. 28 kDa. Mittels UV/Vis-Spektroskopie konnten eindeutige Unterschiede in den Spektren der beiden Maxima erkannt werden (Abbildung 28). Bei einem direkten Vergleich der UV/Vis-Spektren von den bei Maximum 1 und 2 entnommenen Proben zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der maximalen Absorption im UV-Bereich. Insbesondere wurde eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei  $\lambda = 280$  nm beobachtet. An dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Tryptophan- und Tyrosinreste und die Absorption wird als Proteinmaximum definiert (Anthis *et al.*, 2013). Eine solche Absorptionsbande wurde für Max. 2 detektiert. Eine Absorption bei  $\lambda = 260$  nm lässt hingegen auf das Vorhandensein von Nukleinsäuren (RNA und DNA) schließen. Max. 1 hat eine deutlich höhere Absorption bei  $\lambda = 260$  nm und enthält einen höheren Anteil an Nukleinsäuren. Da jedoch alle Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  aufweisen, können diese nicht photometrisch voneinander unterschieden werden.



**Abbildung 28: UV/Vis-Spektroskopieanalyse der Maxima des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub>-Komplexes nach Größenausschlusschromatographie.**

Die UV/Vis-Spektren der beiden Maxima sind im Bereich von  $\lambda = 250$ – $560$  nm dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wurden durch die Absorptionenpunkte bei  $\lambda = 260$  nm (Maximum 1, rot) und  $\lambda = 280$  nm (Maximum 2, blau) eine Gerade gelegt. Dateiname: UV-Vis nach der Größenausschlusschromatographie.xlsx.

Mittels Agarose–Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit von Nukleinsäuren in den Proben untersucht. Sowohl die Probe vor der Größenausschlusschromatographie als auch Max. 1 enthielten DNA oder RNA. In Max. 2 wurde hingegen nur eine geringfügige Menge an Nukleinsäuren detektiert (Abbildung 29 (A)). Zur Identifizierung der Art der Nukleinsäuren, wurden die Proben jeweils mit DNase I und RNase A mit unterschiedlichen Inkubationszeiten verdaut. Durch die Mischung mit EDTA–haltigem Ladepuffer wurde der Verdau gestoppt. In Abbildung 29 (B) sind die mit DNase I oder RNase A verdauten Proben Maxima 1 und 2 auf Agarosegelen dargestellt.



**Abbildung 29: Der His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>–Komplex zeigt gebundene RNA mittels Gelelektrophorese.**

(A) Gezeigt ist das Agarosegel (1 %) beladen mit einer Probe vor der Größenausschlusschromatographie (vdG, 30 µg Protein–Eluat) und Maxima 1 und 2 (je 30 µg Protein–Eluat) nach der Größenausschlusschromatographie. Die Proben wurden gemäß Kapitel 3.2.2 vorbereitet und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Marker: 1 kb Plus DNA Ladder (100 bp–10 kb, NEB #N3200). (B) Die Proben der Maxima 1 (42 µg) und 2 (34 µg) wurden jeweils mit DNase I (5 µg) und RNase A (5 µg) für 10 min, 30 min und 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Sie wurden anschließend auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Marker: 1 kb Plus DNA Ladder (100 bp–10 kb, NEB #N3200). Dateinamen: Agarosebild zeigt RNA Bindung nach Größenausschlusschromatographie.png, RNase und DNase Verdau von Max.1 und Max.2.png.

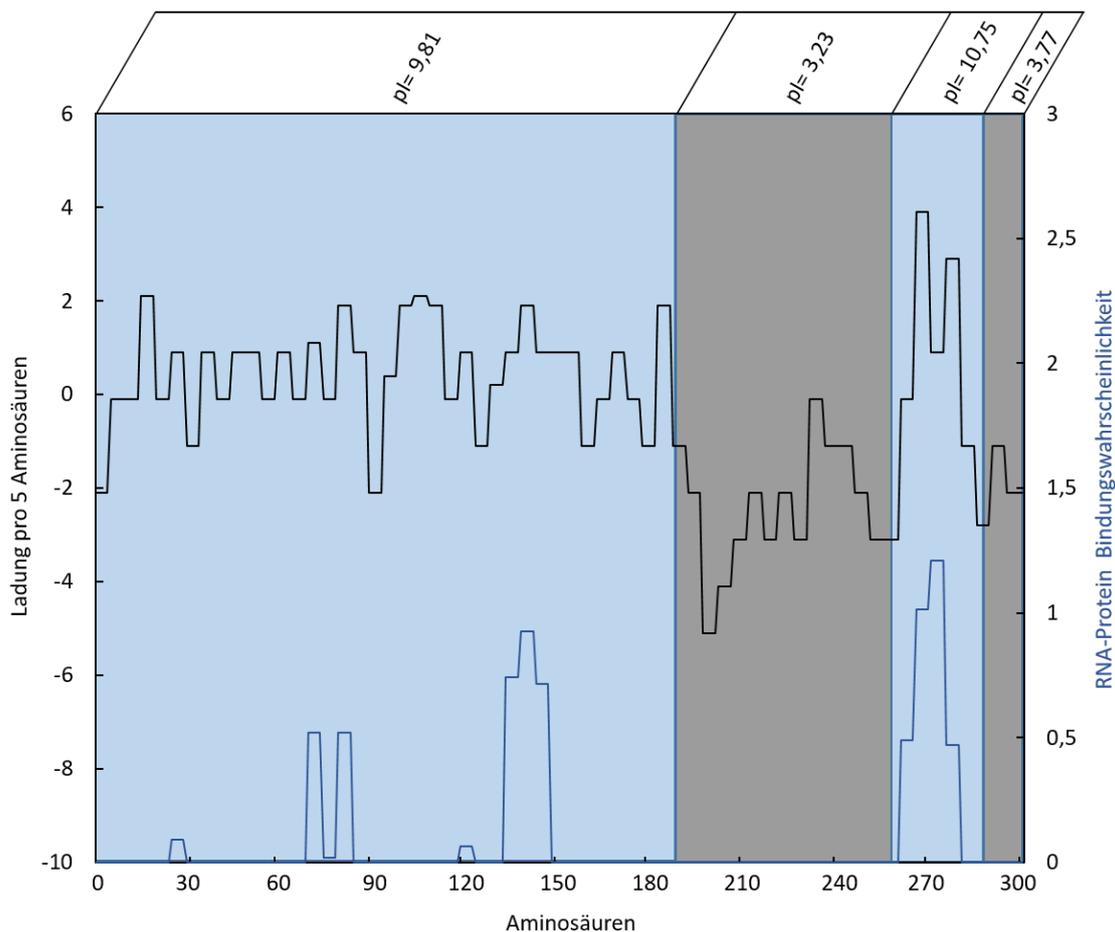
## Ergebnisse

Der DNase I-Verdau zeigte einen geringen Effekt auf die Nucleinsäuren in der Max. 1-Probe, wohingegen nach RNase A-Verdau die Intensität der Bande bereits nach 10 Min Inkubationszeit deutlich abnahm. Der geringe Effekt des DNase I-Verdau auf die Max. 1-Probe könnte durch einen geringen Anteil an RNasen in DNase I zu erklären sein. Diese Beobachtungen deuteten auf einen hochmolekularen Protein-Komplex mit RNA hin. Der DNase I-Verdau von der Max. 2-Probe zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die Intensität der schwachen Bande. Der Verdau mittels RNase A konnte die Intensität der Bande hingegen nahezu vollständig eliminieren und deutete damit auf einen geringen Anteil an mitgereinigter RNA in der Max. 2-Probe hin.

Aufgrund der aufgenommenen UV/Vis-Spektren, dem RNase A- und DNase I-Verdau und den errechneten Größen der Maxima, lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, dass die hellbeige Probe des Maximums 1 mit ca. 222 kDa ein hochmolekularer Komplex von mehreren Heterodimeren His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub> (3 x 65,4 kDa = 196,3 kDa) mit gebundener *E. coli* RNA ist. Die Probe des Maximums 2 beinhaltet Proteine mit einer Größe von ca. 69 kDa und entspricht damit dem heterodimeren His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub>-Komplex (65,4 kDa) mit einer braunen Farbe.

#### 4.1.4.2 Aufreinigung mittels Heparin–Sepharose des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>–Komplexes.

Aufgrund der Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie konnte eine Komplexbildung zwischen His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1<sub>58–295</sub> mit und ohne *E. coli* RNA identifiziert werden. Aufgrund der Affinität von His<sub>6</sub>Mak16 zu RNA, wurde ein weiterer Reinigungsschritt im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie angeschlossen. Betrachtet man das Mak16–Protein bezüglich seiner Aminosäuresequenz, zeigen sich abwechselnd Abschnitte mit positiv geladenen und negativ geladenen Aminosäureresten. Die positiv geladenen Bereiche besitzen dabei pI–Werte von 9,81 und 10,75 und die negativ geladenen Bereiche pI–Werte von 3,23 und 3,77.

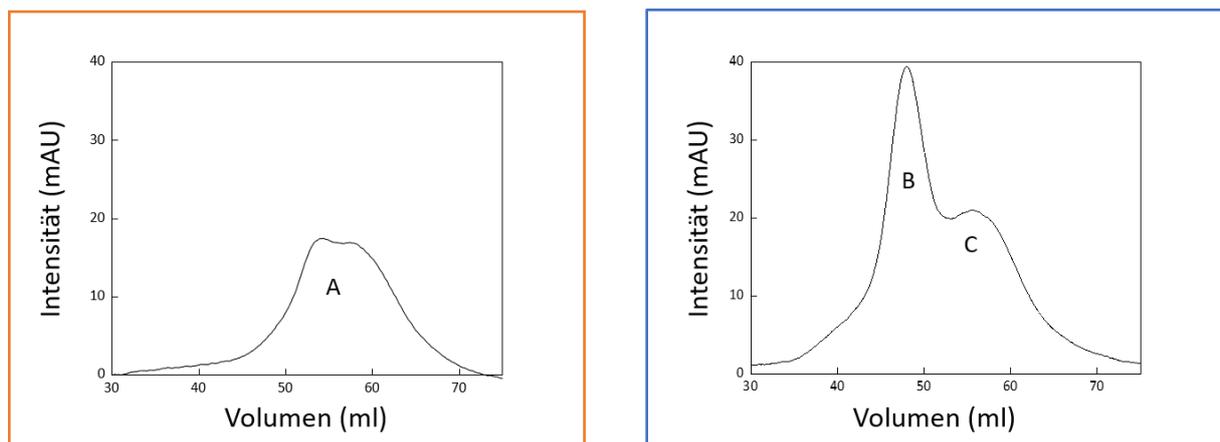


**Abbildung 30: Mögliche RNA–bindende Regionen in *S. cerevisiae* Mak16.**

Oberhalb der Abbildung ist der pI–Wert der schattierten Bereiche angezeigt. Linke Y–Achse: Durchschnittliche Ladung von fünf Aminosäuren bei einem pH–Wert von 7,0 (schwarze Linie). Rechte Y–Achse: RNA–Bindungswahrscheinlichkeit von Pprint, eine Methode, die durch die Kombination von evolutionären Informationen und den Daten der Support Vector Maschine, ein verbessertes Verfahren zur Vorhersage von RNA–Bindungsstellen oder RNA interagierende Reste in einer Proteinsequenz liefert (Kumar et al., 2008). X–Achse: Position der Aminosäuren in Mak16. Dateiname: RNA–bindende Regionen in *S. cerevisiae* Mak16.xlsx.

## Ergebnisse

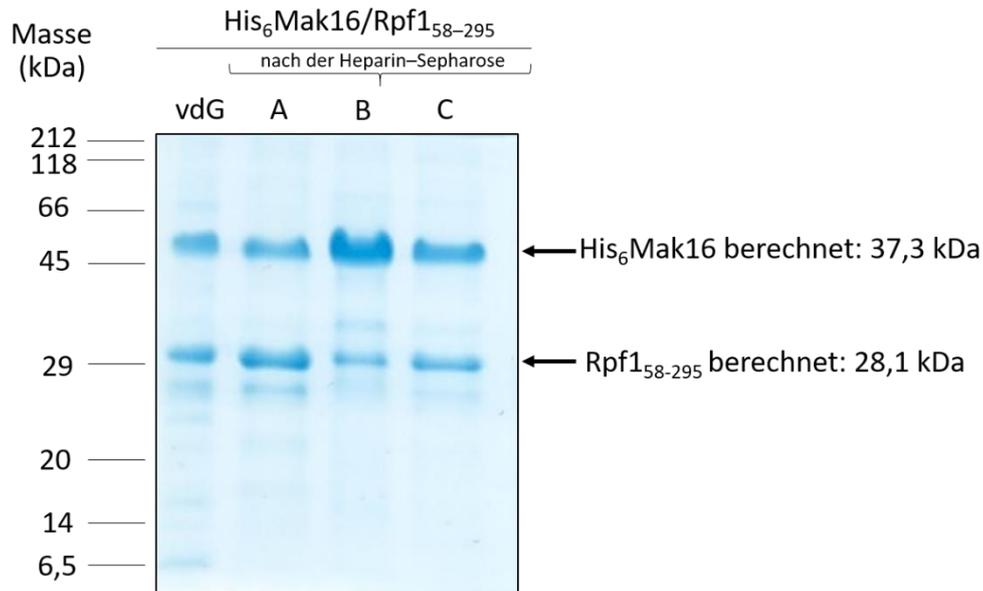
Deshalb wurde ein Chromatographieverfahren gewählt, das auf Affinität und nicht auf Größenausschluss beruht. Heparin ist ein sulfatiertes Glycosaminoglycan, welches durch seine Struktur in der Lage ist Wechselwirkungen mit Nucleinsäure-bindenden Proteinen einzugehen. Strukturell ist Heparin ein lineares Polymer aus unterschiedlichen Längen und Sequenzen. Bei der Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen imitiert Heparin die polyanionische Struktur der DNA. Aufgrund der Ähnlichkeit der Nucleinsäuren binden viele DNA-bindende Proteine auch RNA (Hou *et al.*, 2020). In diesem Fall lag die Vermutung nahe, dass His<sub>6</sub>Mak16 als RNA-bindendes Protein in der Lage ist auch an Heparin-Sepharose binden zu können (Kapitel 3.5.7). Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mit den beiden Maxima 1 und 2, welche anschließend getrennt voneinander aufkonzentriert und in zwei voneinander unabhängigen Durchgängen auf die Heparin-Sepharose gegeben wurden (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Aufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> mittels Heparin-Sepharose.**

In CAPS-Puffer (50 mM/200 mM NaCl, pH = 10,0) und mit einem Salzgradienten von 200 mM auf 1000 mM NaCl wurden die Proteinmaxima erhalten= Maximum A: 560 mM NaCl, Maximum B: 506 mM NaCl, Maximum C: 588 mM NaCl. Dateinamen: Heparin-Chromatogramme nach Größenausschlusschromatographie.png.

In Abbildung 31 sind die Heparin-Chromatogramme der Größenausschlussmaxima 1 und 2 aufgezeigt. Die Fraktionen der drei Maxima wurden in drei Proben (A–C) vereinigt und mittels Konzentratoren (Ausschlussgröße 10 kDa) aufkonzentriert (Kapitel 3.5.5). Nach der Aufkonzentration (auf je 50 µl) wies die Max. A–Probe eine hellbeige Farbe auf, die Max. B–Probe war dunkelbraun und die Max. C–Probe zeigte eine hellbraune Färbung. Daraufhin konnten die aufkonzentrierten Proben mittels SDS–PAGE–Analyse auf Reinheit und Proteinverhältnis untereinander untersucht werden (Abbildung 32).



**Abbildung 32: SDS-PAGE der Aufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub> mittels Größenausschlusschromatographie und anschließender Heparin-Sepharose.**

Das Eluat vor der Größenausschlusschromatographie (vdG), sowie die Maxima A, B und C nach der Heparin-Chromatographie wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen (ca. 4 µg) und mit Coomassie gefärbt. Marker: Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa, NEB #P7702). Dateinamen: SDS-PAGE der Heparin-Sepharose nach Größenausschlusschromatographie.png.

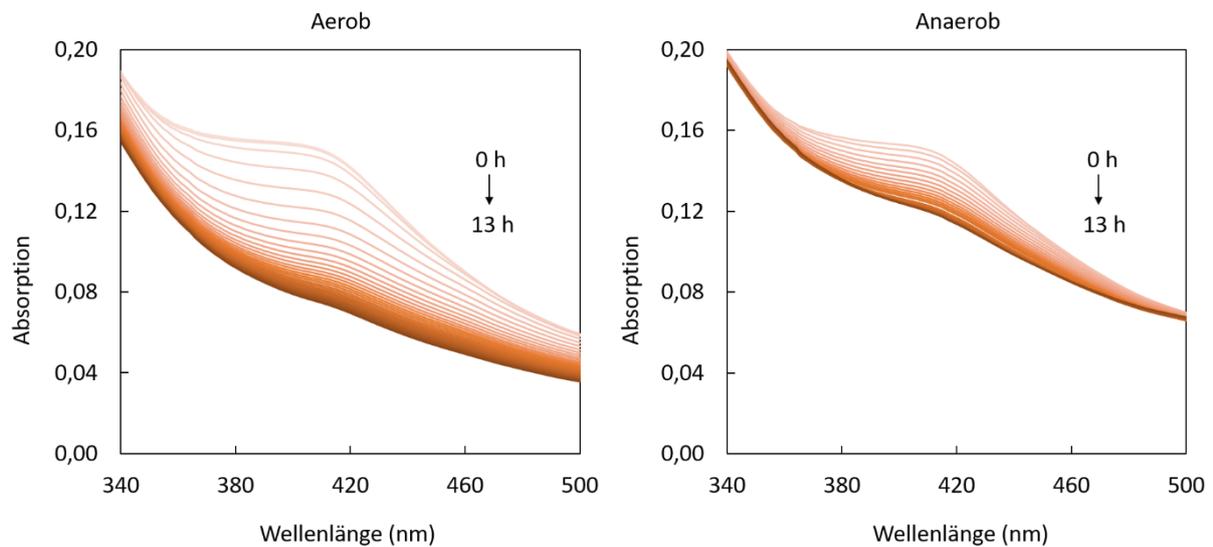
Die SDS-PAGE zeigte äquimolare Mengen von His<sub>6</sub>Mak16 zu Rpf<sub>158-295</sub> sowohl in der Max. A-Probe, als auch in der Max. C-Probe. Die Max. B-Probe zeigt deutlich geringere Mengen an Rpf<sub>158-295</sub> im Vergleich zu His<sub>6</sub>Mak16. Die Max. C-Probe zeigt verglichen mit den Max. A- und B-Proben nahezu keine weiteren Banden, die auf Verunreinigungen durch andere Proteine hindeuteten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels Größenausschlusschromatographie und anschließender Heparin-Chromatographie das Proteinverhältnis sowie die Reinheit des Komplexes His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub> zwar gesteigert werden konnte (Abbildung 32, Maximum C), die Proteinausbeute für weiterführende Versuche jedoch zu gering war. Deshalb erfolgte die weitere Charakterisierung des Komplexes, an dem, mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie, aufgereinigtem Eluat.

### 4.1.5 Clusterabbau während Exposition an Sauerstoff

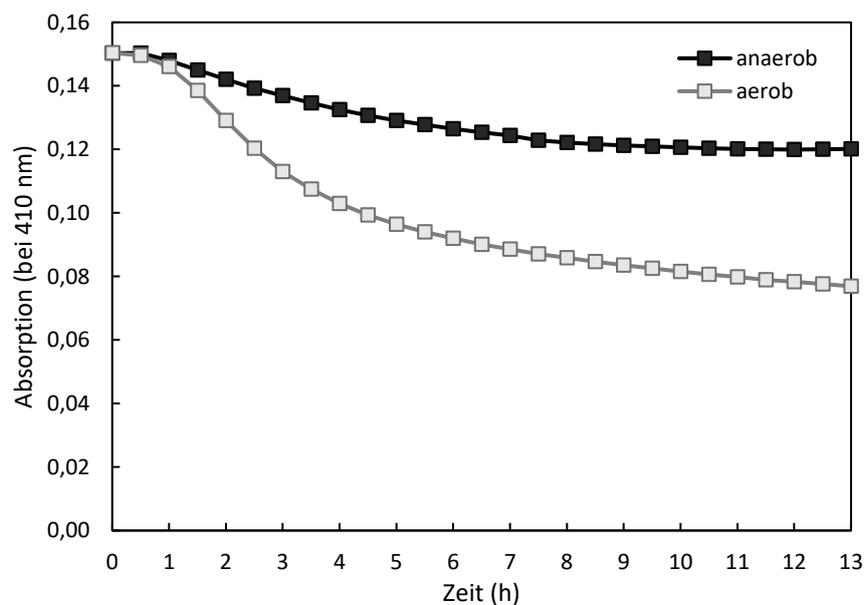
In den ersten Milliarden Jahren des Lebens herrschte auf der Erde eine anaerobe Umgebung. Eisen und Schwefel waren reichlich vorhanden und wurden zu Cluster in die damalig vorhandenen Proteine eingebaut. Die spätere Sauerstoffanreicherung der Erdatmosphäre durch photosynthetische Organismen stellte jedoch eine Bedrohung für die clusterabhängigen Proteine dar, die noch immer nicht vollständig geklärt ist. Durch die Oxidation von Eisen wurde dessen Bioverfügbarkeit eingeschränkt und die Organismen mussten komplexe Systeme entwickeln, um ihren Eisenbedarf zu decken. Werden Eisen–Schwefel–Cluster Sauerstoff ausgesetzt, kann es zu einem Abbau des Clusters kommen, welcher von der Cluster–Position, –Koordination und –Umgebung im Protein abhängig ist. Je besser der Cluster abgeschirmt ist, desto luftstabiler ist das Protein. In der Abbildung 33 (A) sind die UV/VIS–Spektren des Proteinkomplexes His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub> an Luft (aerob) und unter Sauerstoffausschluss (anaerob) dargestellt. Dabei wurden im Abstand von 30 min für 13 h Spektren der Proben aufgenommen und der Verlauf der Spektren miteinander verglichen. Um den Clustergehalt zu bestimmen, wurde die relative Absorption der Probe, bei der für ein Eisen–Schwefel–Cluster relevanten Wellenlänge  $\lambda = 410\text{s}–420\text{ nm}$ , gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 33 (B)).

Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass es über die Dauer von 13 h sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zu einer Absorptionsabnahme bei  $\lambda = 410–420\text{ nm}$  kommt, was auf einen Verlust des Eisen–Schwefel–Clusters hindeutet. Ist der Proteinkomplex Sauerstoff ausgesetzt (aerob), konnte bereits nach drei Stunden ein Clusterverlust von ca. 25 % beobachtet werden. Nach weiteren 5 Stunden wurden ca. 40 % und nach insgesamt 13 h über 50 % des Clusters abgebaut. Unter sauerstofffreien (anaerob) Bedingungen wurden nach drei Stunden lediglich ca. 10 % des Clusters und nach 13 h insgesamt ca. 20 % des Clusters abgebaut. Somit zeigt sich deutlich, dass es unter aeroben Bedingungen zu einer viel stärkeren Absorptionsabnahme und damit zu einem stärkeren Eisen–Schwefel–Clusterabbau kommt, als unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 33 (B)).

A



B



**Abbildung 33: Stabilität des Eisen–Schwefel–Clusters von *His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>* unter aeroben und anaeroben Bedingungen.**

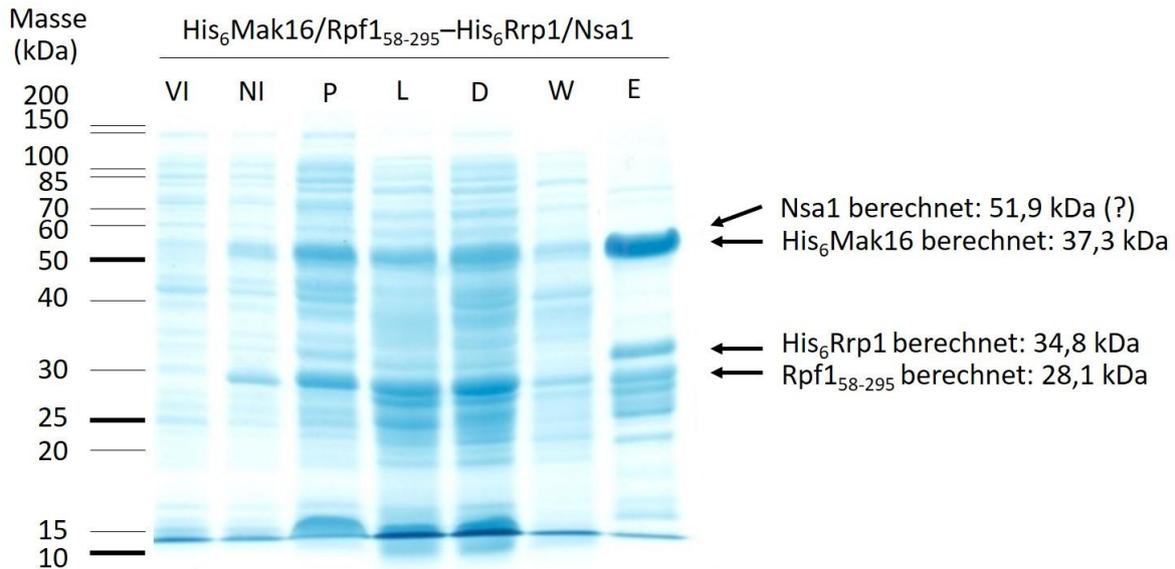
A) Alle 30 min wurden innerhalb von 13 h UV/VIS–Spektren von *His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>* an Luft und unter Luftausschluss aufgenommen und als Zeitverlaufsspektren dargestellt. Aufgetragen ist die Absorption gegen den Wellenlängenbereich von  $\lambda = 340\text{--}500$  nm, um die Abnahme des für einen  $[4\text{Fe–}4\text{S}]$ –Cluster relevanten Verlauf zu beobachten. B) Zur besseren Veranschaulichung wurde die Absorption bei 410 nm gegen die Zeit aufgetragen. Dateinamen: *Stabilität des Clusters unter aeroben und anaeroben Bedingungen.png*, *UV-Vis Stabilität des Clusters unter aeroben und anaeroben Bedingungen.xlsx*.

## Ergebnisse

Die Zeit–Abhängigkeit ist in Übereinstimmung damit, dass nur durch eine anaerobe Aufreinigung der Erhalt des Clusters und somit auch ein intaktes Protein isoliert werden kann. Da auch unter anaeroben Bedingungen ein leichter zeitbedingter Clusterabbau beobachtet wurde, wurden die Experimente immer im direkten Anschluss an die Aufreinigung mit Entsalzung durchgeführt. Durch das Verzichten des mehrmaligen Gefrierens und Tauens der Probe, konnten die gleichen Bedingungen für alle Experimente garantiert werden.

### 4.1.6 Überexpression und Aufreinigung des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>–Rrp1/Nsa1–Komplexes

Nach Überexpression von den Genen *His<sub>6</sub>MAK16* und *RPF1<sub>58–295</sub>* *in vitro*, wurde versucht das gesamte Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul *in vitro* zu isolieren. Dieser Kernpartikel wird zu Beginn der Bildung der 60S–Untereinheit benötigt und besteht aus vier Assemblierungsfaktoren. Aus dem Brix–Protein Mak16 mit seinem Interaktionspartner Rpf1, dem beta–Propellerprotein Nsa1 und dem alpha–helikalen Protein Rrp1. Dieses Modul bindet zudem noch das L–förmige rRNA Expansionssegment ES7a und verbindet dadurch die rRNA–Domänen I und II (Kater *et al.*, 2017). Dafür wurden die *RRP1* und *NSA1* Gene mittels Klonierung in pColaDuet–1 inseriert (Kapitel 3.2.1–3.2.8). Anschließend wurden die beiden verifizierten Vektoren pETDuet–1–*His<sub>6</sub>MAK16/RPF1<sub>58–295</sub>* und pColaDuet–1–*His<sub>6</sub>RRP1/NSA1* in *E. coli* T7 Express *lysY/l<sup>q</sup>* Expressionszellen kotransformiert und überexprimiert (Kapitel 3.5.1). Die Isolierung und Aufreinigung der Proteine erfolgten analog mittels Ni–NTA–Agarose unter anaeroben Bedingungen (Kapitel 3.5.4). Die Abbildung 34 zeigt die SDS–PAGE mit den während der Aufreinigung gesammelten Proben und dem Eluat.

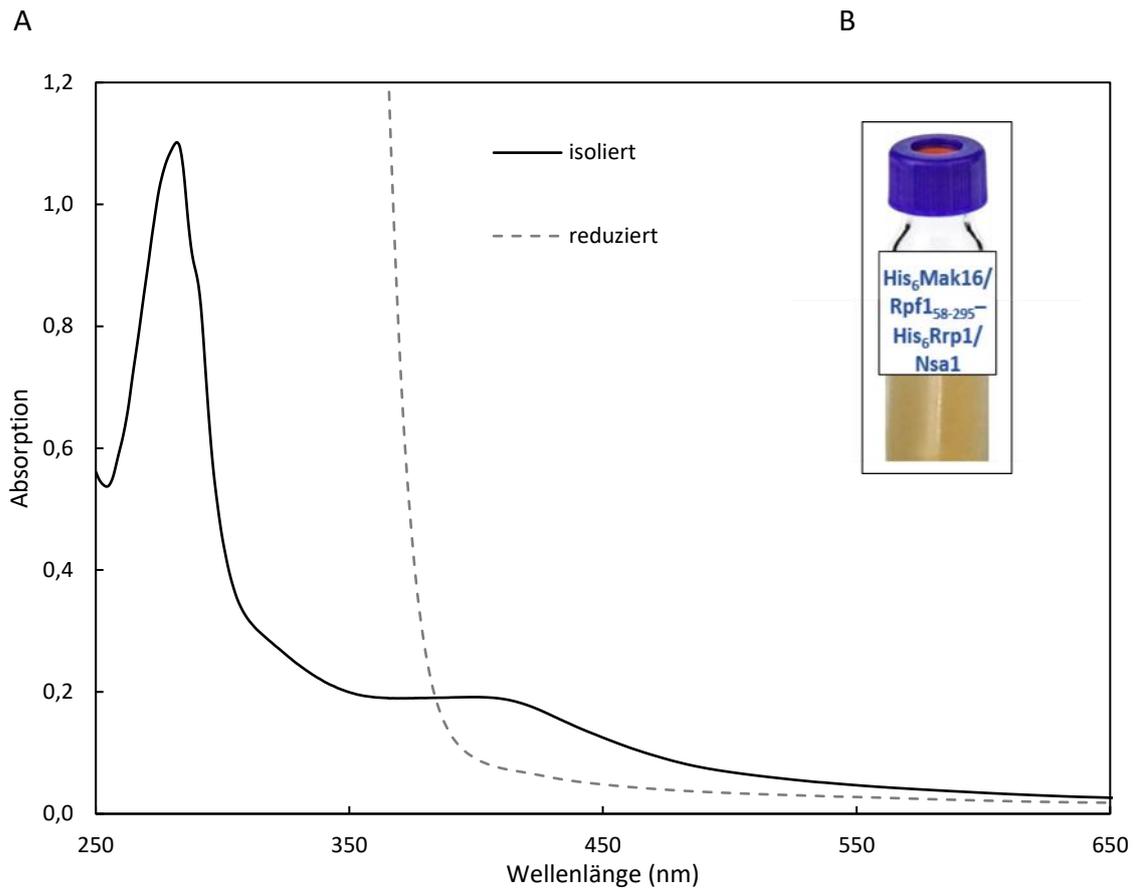


**Abbildung 34: SDS-PAGE von gereinigtem Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul.**

Die mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE zeigt die während der Aufreinigung entnommenen Proben sowie dem Eluat (ca. 4 µg). Folgende Proben wurden aufgetragen: Vor Induktion (VI), Nach Induktion (NI), Pellet (P), Lysat (L), Durchlauf (D), Waschprobe (W), Eluat (E). Marker: Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa, NEB #P7717). Dateiname: SDS-PAGE His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-His<sub>6</sub>Rrp1/Nsa1.png.

Die zwei stark ausgeprägten Banden bei ca. 30 kDa und 35 kDa konnten Rpf1<sub>58-295</sub> und His<sub>6</sub>Rrp1 zugewiesen werden. Diese beiden Proteine dienen als Köderproteine und konnten erfolgreich überexprimiert und isoliert werden. Die Hauptbande bei 52 kDa kann His<sub>6</sub>Mak16 zugeordnet werden. Mit einer Proteingröße von 51,9 kDa könnte jedoch auch Nsa1 (51,9 kDa) dieser Bande bei ca. 52 kDa zugeordnet werden. Durch das wohlmöglich gleiche Laufverhalten beider Proteine, könnten sich beide Proteine auf der SDS-PAGE überlagern. Im Eluat auf der SDS-PAGE zeigten sich zudem wohlmöglich einige Abbauprodukte oder kontaminierende Proteine unter 30 kDa. Das UV/Vis-Spektrum ist in Abbildung 35 (A) dargestellt und zeigt zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und 410–420 nm. Das nach der Aufreinigung erhaltene klare bräunliche Eluat ist in Abbildung 35 (B) gezeigt (1,3 mg/L LB).

## Ergebnisse



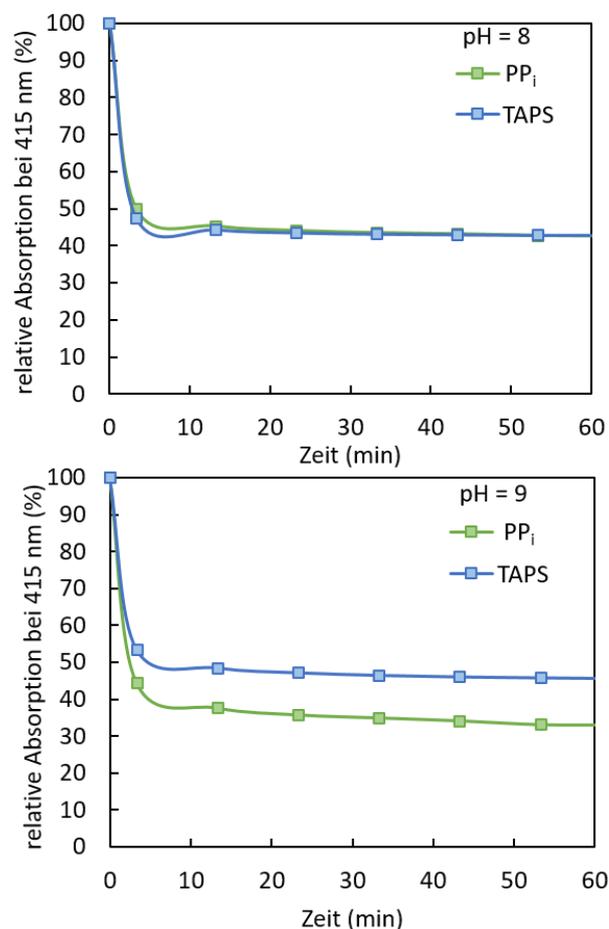
**Abbildung 35: Charakterisierung des gereinigten Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls.**

(A) Die UV/Vis–Spektren der isolierten und mit Natriumdithionit (4 mM Endkonz.) reduzierten Proben (0,8 mg/ml) sind im Bereich von  $\lambda = 250\text{--}650$  nm dargestellt. (B) Eine bearbeitete Fotografie des gereinigten Proteinkomplexes des isolierten His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>–His<sub>6</sub>Rrp1/Nsa1–Komplexes ist abgebildet [n=1].  
Dateinamen: Eluat His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58-295</sub>–His<sub>6</sub>Rrp1–Nsa1.png und UV–Vis His<sub>6</sub>Mak16–RPF1<sub>58-295</sub>–His<sub>6</sub>Rrp1–Nsa1.xlsx.

Die Isolierung des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls benötigte weitere Optimierungsschritte, die zu diesem Zeitpunkt nicht realisierbar waren.

#### 4.1.7 ESR- und Mößbauer-Spektroskopie des Eisen-Schwefel-Clusters von Mak16

Mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) wurde der Clustertyp untersucht. Dafür wurden die Proben unter anaeroben Bedingungen vorbereitet wie in Kapitel 3.5.16 beschreiben. Für die ersten Titrationsversuche wurden weitere Puffersysteme getestet. Eine naheliegende Alternative zu dem verwendeten Phosphat-Puffer ist der Pyrophosphat-Puffer. Aufgrund der Fähigkeit den pH-Bereich zwischen 8 und 9 zu puffern wurde [Tris(hydroxymethyl)methylamino]propansulfonsäure (TAPS) als weiteres Puffersystem getestet. Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde die Fähigkeit von Natriumdithionit den Cluster zu reduzieren, bei den pH-Werten 8 und 9 in  $PP_i$ - und TAPS-Puffer, verglichen.

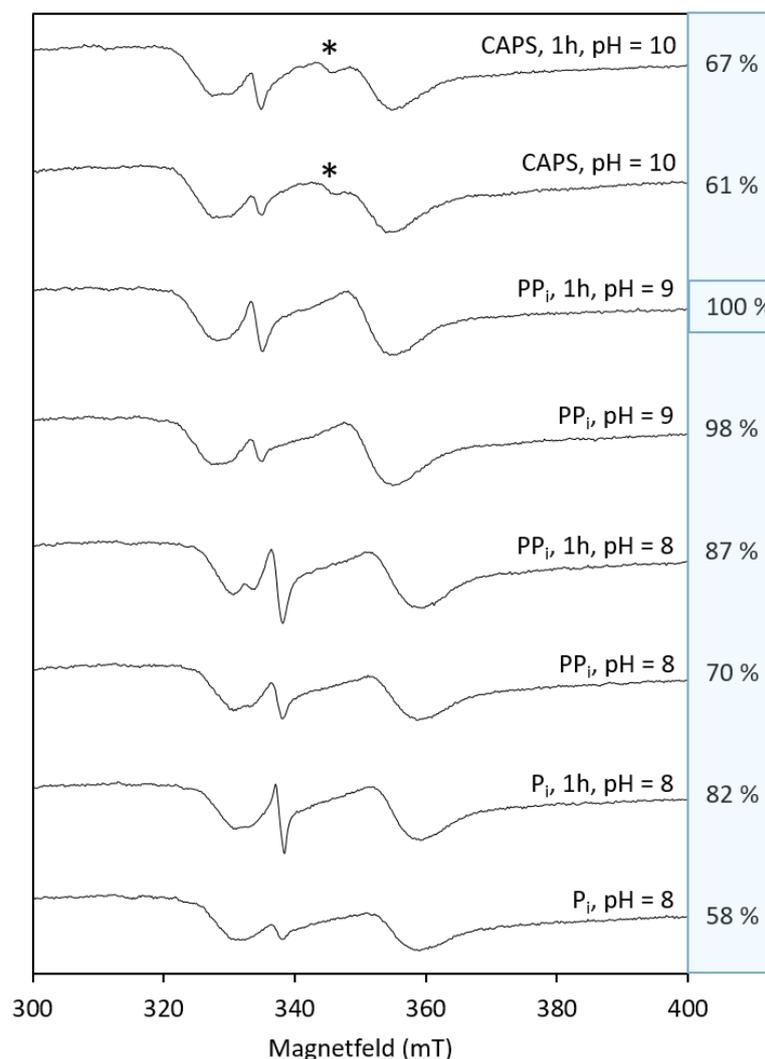


**Abbildung 36: Absorptionsabnahme nach Natriumdithionitzugabe.**

Die Fähigkeit von Natriumdithionit (2 mM Endkonz.) den Cluster von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub> (7,5 mg/ml) zu reduzieren wurde in unterschiedlichen Puffern mit unterschiedlich eingestellten pH-Werten getestet. Innerhalb 60 min wurde alle 10 min ein Spektrum aufgenommen. Danach wurde die relative Absorption der Probe bei der für ein Eisen-Schwefel-Cluster relevanten Wellenlänge  $\lambda = 415$  nm gegen die Zeit aufgetragen. Dateiname: Relative Absorptionsabnahme nach Natriumdithionitzugabe.xlsx. [n=1].

## Ergebnisse

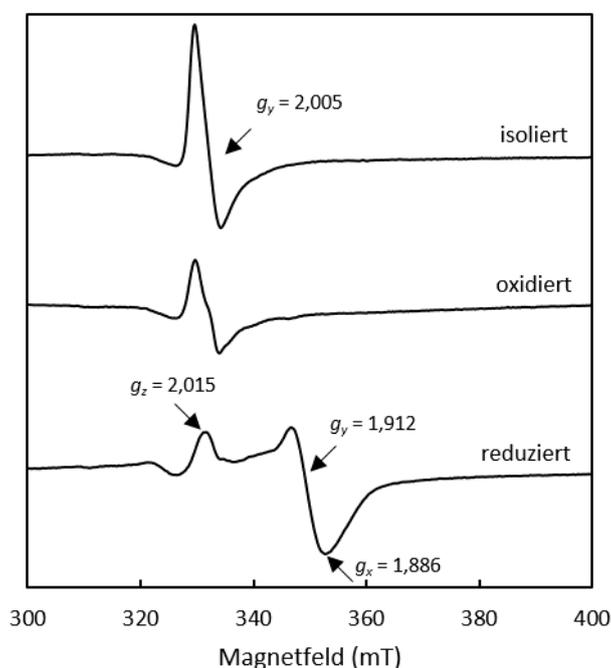
Die UV/Vis-Daten zeigten eine deutliche Abnahme der sichtbaren Absorption bei der Verwendung des  $PP_i$ -Puffers bei einem pH-Wert von 9 von ca. 60 %. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde die Stabilität des Proteins nach 3-minütiger und 1-stündiger Reduktion durch Natriumdithionit bei unterschiedlichen pH-Werten mittels der sensibleren ESR-Spektroskopie untersucht. Die deutlichste Reduktion konnte im  $PP_i$ -Puffer bei einem pH-Wert von 9 über die Messung der Amplituden des ESR-Signals nach einer Stunde festgestellt werden. Dieses Signal wurde auf 100 % normiert und die Signalstärken der anderen Spektren prozentual an diesem Spektrum berechnet. Bei einem pH-Wert von 10 wurde ein neues Signal (\*) im Spektrum detektiert.



**Abbildung 37: pH-abhängige ESR-Signale von  $His_6Mak16/Rpf1_{58-295}$ .**

Links: Gemessene ESR-Spektren (10 K, 30 dB, Mikrowellenleistung: 0,21 mW, Modulationsamplitude: 1,5 mT) von  $His_6Mak16/Rpf1_{58-295}$  in unterschiedlichen Puffern mit unterschiedlich eingestellten pH-Werten. Um die Stabilität der Probe nach der Natriumdithionitzugabe (2 mM) zu beurteilen, wurden die Proben nach der Zugabe direkt (3 min) und nach 1 h schockgefroren. Rechts: % Reduktion, unter der Annahme, dass  $PP_i$ , 1h, pH = 9 100 % Reduktion entspricht. Dateiname: pH-abhängige ESR-Signale von  $His_6Mak16/Rpf1_{58-295}$ .xlsx.

Die nachfolgenden ESR-Experimente wurden daraufhin in Pyrophosphat-Puffer mit einem eingestellten pH-Wert von 9 durchgeführt. Die Abbildung 38 zeigt die ESR-Spektren von konzentriertem Proteinkomplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>. Die isolierte Probe beinhaltet hauptsächlich ein Signal kompatibel mit einem oxidierten [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Cluster, mit einem  $g_y$ -Wert von 2,005. Nach einer Oxidation der isolierten Probe mit Kaliumhexacyanidoferrat(III) wies das Spektrum einen ähnlichen Verlauf auf, allerdings mit einer geringeren Intensität, was auf einen Zerfall des [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Clusteranteils bei einem Überschuss an Oxidationsmittel hindeutet. Um den überwiegend diamagnetischen Cluster untersuchen zu können, wurde der Cluster durch Zugabe von Natriumdithionit zur paramagnetischen Form reduziert. Um den überwiegend diamagnetischen Cluster untersuchen zu können, wurde der Cluster durch Zugabe von Natriumdithionit zur paramagnetischen Form reduziert.



**Abbildung 38: ESR-Spektren des gereinigten His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes.**

Drei ESR-Spektren (9,350 GHz, 10 K, 30 dB, Mikrowellenleistung: 0,21 mW, Modulationsamplitude: 1,5 mT) von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> (4,9 mg/ml Endkonz.): unbehandelt (isoliert), oxidiert mit K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1 mM Endkonz.) und reduziert mit Natriumdithionit (2 mM Endkonz.) sind dargestellt (PP<sub>i</sub>-Puffer: 25 mM PP<sub>i</sub>, 300 mM NaCl, pH = 9,0).  
Dateiname: ESR-Spektren des gereinigten His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub> Komplexes.xlsx.

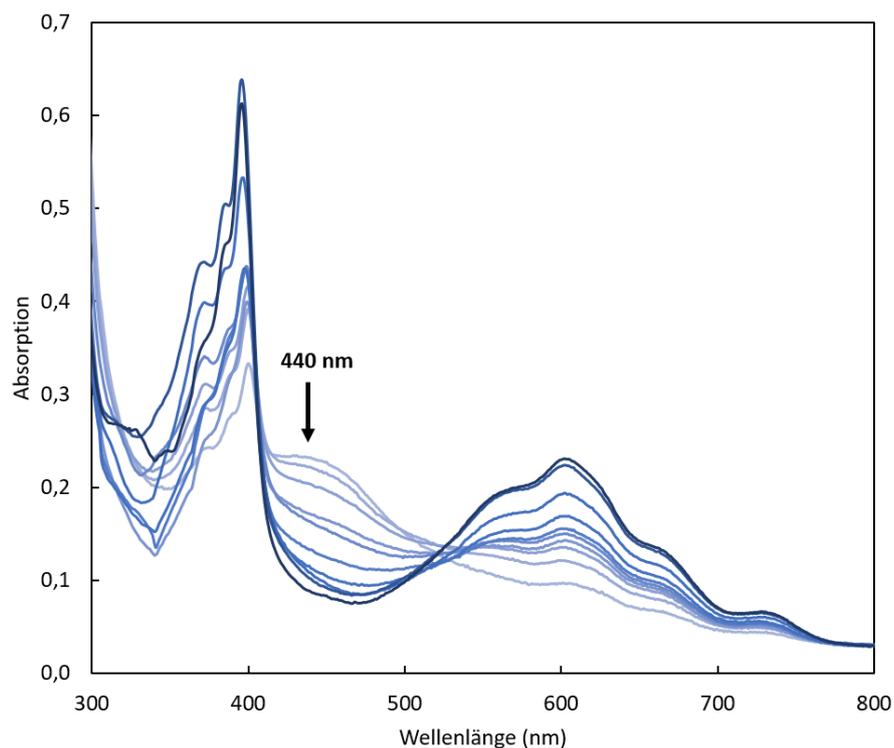
Bei der Reduktion mit Natriumdithionit (2 mM Endkonz.) konnten folgende ESR-Signale ( $g$ -Werte) nachgewiesen werden:  $g_x = 1,886$ ,  $g_y = 1,912$  und  $g_z = 2,015$ . Diese sind charakteristisch für einen [4Fe-4S]<sup>1+</sup>-Cluster.

## Ergebnisse

Zusammen mit den aufgenommenen UV/Vis-Spektren die ein breites, zentriertes Absorptionsmaximum bei 410–420 nm zeigten, liefern diese Ergebnisse Beweise für die Anwesenheit eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Clusters im His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplex.

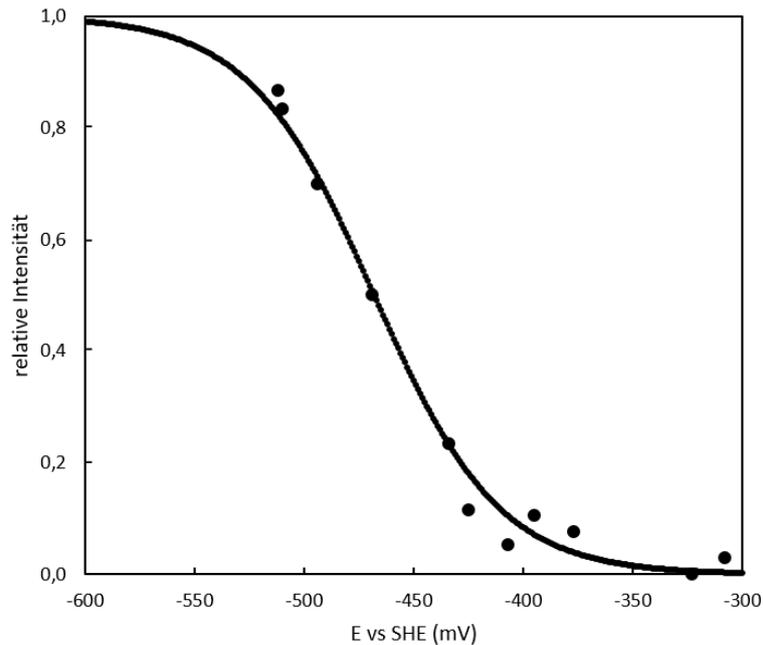
### 4.1.7.1 Redox-Eigenschaften von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>

Zur Bestimmung des Redoxpotentials von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> wurde die Absorption in Abhängigkeit des Potentials gemessen. Die automatische, UV/Vis-spektroskopisch begleitende Redox titration des Proteinkomplexes mit Mediatormix 2 lieferte 10 Spektren die in Abbildung 39 dargestellt sind (Kapitel 3.5.18). Bei einer Wellenlänge von 440 nm sind die Beiträge der Mediatoren in ihrer Absorption sehr gering, deswegen konnte bei dieser Wellenlänge die Reduktion des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters gut verfolgt werden. Für His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> konnte ein elektrochemisches Potential von –470 mV bestimmt werden (Abbildung 40). Die Dauer der UV/Vis-Redox titration betrug ca. eine Stunde.



**Abbildung 39: Bestimmung des Redoxpotentials des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes mittels UV/Vis-spektroskopisch begleitende Redox titration.**

UV/Vis-begleitete, automatische Redox titration von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> (4,1 mg/ml, PP<sub>i</sub>-Puffer: 25 mM PP<sub>i</sub>, 300 mM NaCl, pH = 9,0). In 5 min Intervallen wurde Natriumdithionit (15 µl, 0,3 mM) zu dem Protein-Mediatormix 2 (Mediatormix 2: 10 µM Endkonz.) titriert und nach Homogenisierung ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen (hellblau: ca. – 300 mV; dunkelblau: ca. –530 mV). Dateiname: Redoxpotentials des His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes.xlsx.

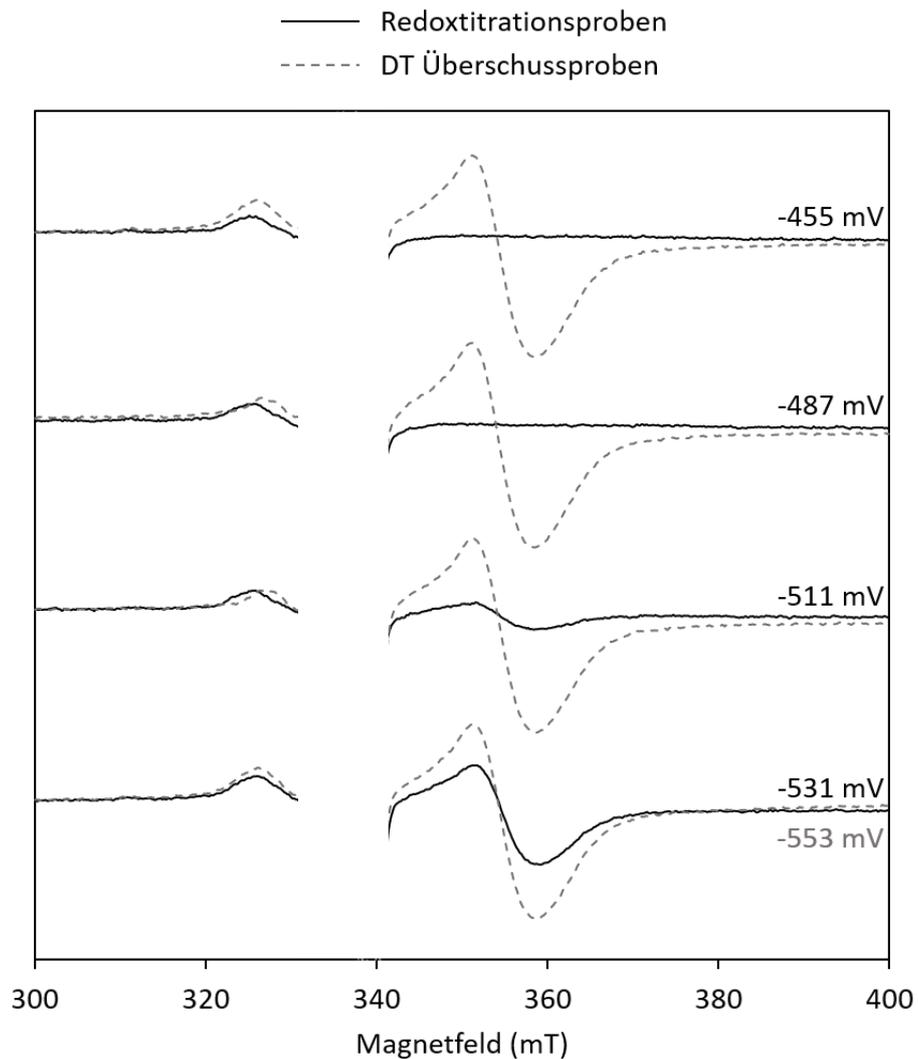


**Abbildung 40: Bestimmung des elektrochemischen Potentials des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub>-Komplexes.**

Die  $\lambda = 440$  nm normierte Extinktion bei 23 °C wurde gegen das gemessene Potential der Lösung aufgetragen und an die Nernst-Gleichung angepasst (PP<sub>i</sub>-Puffer: 25 mM PP<sub>i</sub>, 300 mM NaCl, pH = 9,0). Dateiname: Bestimmung des Redoxpotentials des His<sub>6</sub>Mak16-Rpf<sub>158-295</sub>-Komplexes.xlsx.

Eine ESR-basierte Redox Titration konnte anschließend mittels kürzere ESR-Titration mit wenigen Punkten und zusätzlichen, vollreduzierten Proben (Natriumdithionitüberschuss) an denselben Punkten verwirklicht werden. Mit dieser Art der Durchführung konnte die Stabilität von Mak16 während der Titration beobachtet werden. So konnten anhand einer ESR-Titration in PP<sub>i</sub>-Puffer bei einem pH-Wert von 9 und dem Mediatormix 1 (Kapitel 3.5.17) durch einzelne definierte Zugaben von Natriumdithionit gezielt Potentiale des Gemisches eingestellt, Proben entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Nach anschließender Messung der Proben, konnte ein elektrochemisches Potential von ca. -530 mV ermittelt werden (Abbildung 41).

Anhand der UV/Vis-spektroskopisch begleiteten und ESR-basierten Redox titrationen konnte das elektrochemische Potential von Mak16 in den Bereich von -470 mV bis -530 mV eingeordnet werden. Proteine mit einem niedrigen Redoxpotential (-280 mV bis -705 mV) wie Mak16 kommen häufig vor und können in die Klasse der [4Fe-4S]-Cluster koordinierenden Proteine eingeordnet werden (Koay *et al.*, 2008).



**Abbildung 41: Redoxtitration des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub>-Komplexes.**

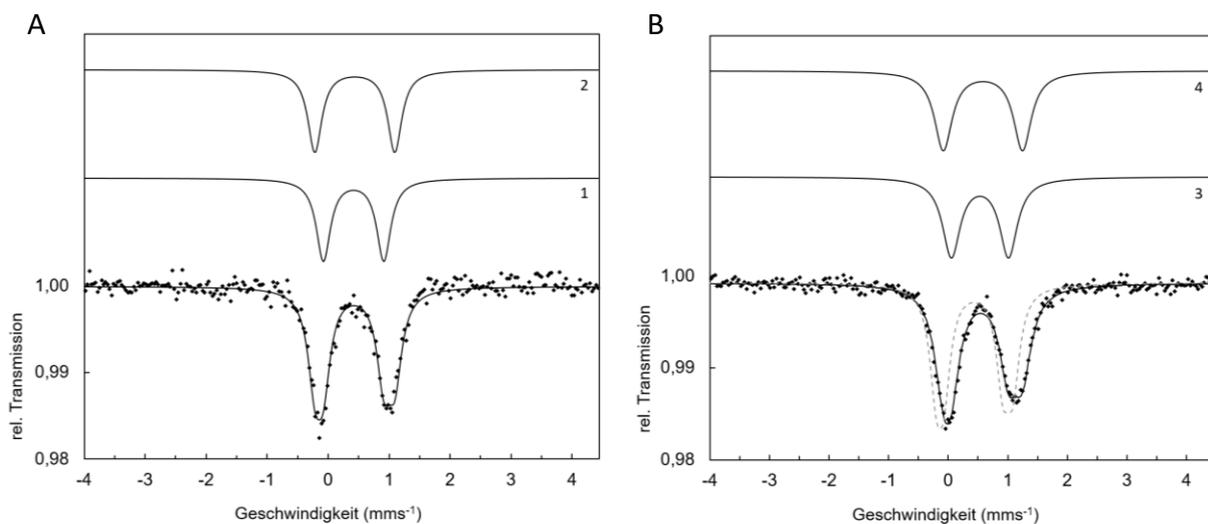
Auszug der gemessenen ESR-Spektren (9,356 GHz, 10 K, Mikrowellenleistung: 0,21 mW, Modulationsamplitude: 1,5 mT, (PP<sub>i</sub>-Puffer: 25 mM PP<sub>i</sub>, 300 mM NaCl, pH = 9,0)) und Mediatormix 1 (Kapitel 5.3.17). Zur Kontrolle der Stabilität von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub> wurden zu jedem Potentialpunkt von Interesse zwei Proben entnommen, eine Titrationsprobe und eine Probe mit Natriumdithionitüberschuss (gestrichelte Linie). Mit abnehmendem Potential kann eine Zunahme der Amplitude die ESR-Signale zwischen 350 und 360 mT beobachtet werden. [n=1]. Dateiname: Redoxtitration des His<sub>6</sub>Mak16-Rpf<sub>158-295</sub>-Komplexes.xlsx.

#### 4.1.7.2 Mößbauer–Spektroskopie von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub>

In Zusammenarbeit mit Jonathan Oltmanns des AGs Schünemann (Fachbereich Physik) wurde Zellen während ihres Wachstums <sup>57</sup>Fe–Ammoniumeisencitrat für die Mößbauer–Spektroskopie hinzugegeben (Kapitel 3.5.19). Nach der Überexpression und Isolierung des Proteinkomplexes His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub>, wurden Mößbauer–Spektren aufgenommen werden. In Abbildung 42 sind die Mößbauer–Spektren gezeigt. Dabei stellt (A) das Spektrum der isolierten Probe und (B) das Spektrum der Dithionit–reduzierten Probe bei T = 77 K ohne äußeres Magnetfeld dar. Die Messwerte werden durch die grauen Punkte dargestellt. Durch die Addition der Simulationen der einzelnen Komponenten ergibt sich die Gesamtanalyse des Spektrums, die als schwarze Linie resultiert. Die einzelnen Komponenten der Probe werden oberhalb der Messergebnisse gestaffelt dargestellt und sind mit Nummern versehen. Die Analyseparameter der beiden Spektren sind in Tabelle 41 und 42 angegeben. Für das Spektrum der unbehandelten Probe (Abbildung 42 (A)) ist die Isomeriewerschiebung der Komponente 1 von 0,42 mm/s ( $\delta_1$ ) charakteristisch für Eisenionen, welche eine formale Ladung von 2,5+ tragen. Die aus dem Spektrum gewonnene Quadrupolaufspaltung von 0,99 mm/s ( $\Delta E_{Q1}$ ) spricht für ein tetraedrisch koordiniertes Eisen. Diese Werte sind typisch für einen [4Fe–4S]<sub>2+</sub>–Cluster (Ahrens–Botzong *et al.*, 2011; Pandelia *et al.*, 2015). Die Komponente 1 hat einen Anteil von 50 % der Gesamtfläche des Spektrums, was bedeutet, dass zwei von vier Eisenionen im Cluster die gleiche chemische Umgebung besitzen und sich nicht unterscheiden lassen. Die Komponente 2 besitzt nahezu die gleiche Isomeriewerschiebung von 0,44 mm/s ( $\delta_2$ ), was ebenfalls für formal 2,5+ formal geladene Eisenionen spricht. Die Quadrupolaufspaltung von 1,31 mm/s ( $\Delta E_{Q2}$ ) deutet auch auf eine tetraedrische Anordnung der Eisenionen hin. Die Komponente 2 hat den gleichen Anteil von 50 % an der Gesamtfläche des Spektrums (Tabelle 41). Obwohl mit ESR–Spektroskopie ein schwaches [3Fe–4S]<sub>1+</sub>–Clustersignal beobachtet wurde, konnte kein Mößbauersignal für diese Art von Cluster detektiert werden (< 5 %). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich um einen [4Fe–4S]<sub>2+</sub>–Cluster aus jeweils 2 leicht unterschiedlichen Eisenpaaren mit formaler Ladung von 2,5+ handelt. Für das Spektrum der mit Dithionit–reduzierten Probe (Abbildung 42 (B)), sind die Analyseparameter in Tabelle 42 angegeben. Zuerst wurde versucht die Anpassung des Spektrums mit 4 Komponenten durchzuführen. Für den oxidierten Anteil in der reduzierten Probe wurden die Parameter von Komponente 1 und 2 aus Tabelle 41 (Isomeriewerschiebungen von 0,42 und 0,44 mm/s und Quadrupolaufspaltungen von 0,99 und

## Ergebnisse

1,31 mm/s, respektive) festgehalten. Es zeigte sich jedoch, dass der beste Fit für die experimentellen Daten (Tabelle 42, Abbildung 42 (B)) ohne einen Beitrag für einen oxidierten Anteil erzielt wurde. Diese Beobachtung schliesst nicht aus, dass es einen kleinen Anteil (< 5%) von oxidiertem Cluster in der reduzierten Probe gibt. Das Gesamtspektrum wurde von zwei Spezies mit je einem Anteil von 50 % bestimmt. Die Isomerieverschiebung der Komponente 3 mit 0,53 mm/s ( $\delta_3$ ) korrespondiert mit dem Eisenpaar, beidem die beiden Eisenionen eine formale Ladung von 2,5+ haben und die Isomerieverschiebung der Komponente 4 mit 0,58 mm/s ( $\delta_4$ ) korrespondiert mit dem Eisenpaar der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. (Pandelia *et al.*, 2015).



**Abbildung 42: Identifizierung eines [4Fe-4S]-Clusters in His<sub>6</sub>Mak16 mittels Mößbauer-Spektroskopie.**

Mößbauer-Spektren der oxidierten (A) und reduzierten (B) Proben des in <sup>57</sup>Fe-angereicherten His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexes. Die Spektren wurden bei 77 K und 0 T aufgenommen. 1, 2, 3 und 4 stellen die vier Subspektren der jeweiligen Eisenkerne dar. Darunter sind in beiden Abbildungen 42 (A) und (B) die experimentell gemessenen Datenpunkte mit den resultierenden Fits dargestellt. B) Um die Verschiebung des Mößbauerspektrums in der reduzierten Probe zu verdeutlichen wurde der Fit für die oxidierte Probe aus Abbildung 42 A mit 1,1 multipliziert und in Abbildung 42 (B) grau gestrichelt dargestellt. Dateinamen: Mößbauer-Spektren Hefe Mak16.xlsx.

**Tabelle 41: Analyseparameter des Mößbauer-Spektrums der unbehandelten Probe**

Komponente	1	2
$\delta$ (mm/s)	0,42	0,44
$\Delta E_Q$ (mm/s)	0,99	1,31
$\Gamma$ (mm/s)	0,28	0,28
Area (%)	50	50
Zuordnung	$\text{Fe}^{2,5+}$ - $\text{Fe}^{2,5+}$	$\text{Fe}^{2,5+}$ - $\text{Fe}^{2,5+}$

Tabelle 42: Analyseparameter des Mößbauer-Spektrums der Dithionit-reduzierten Probe

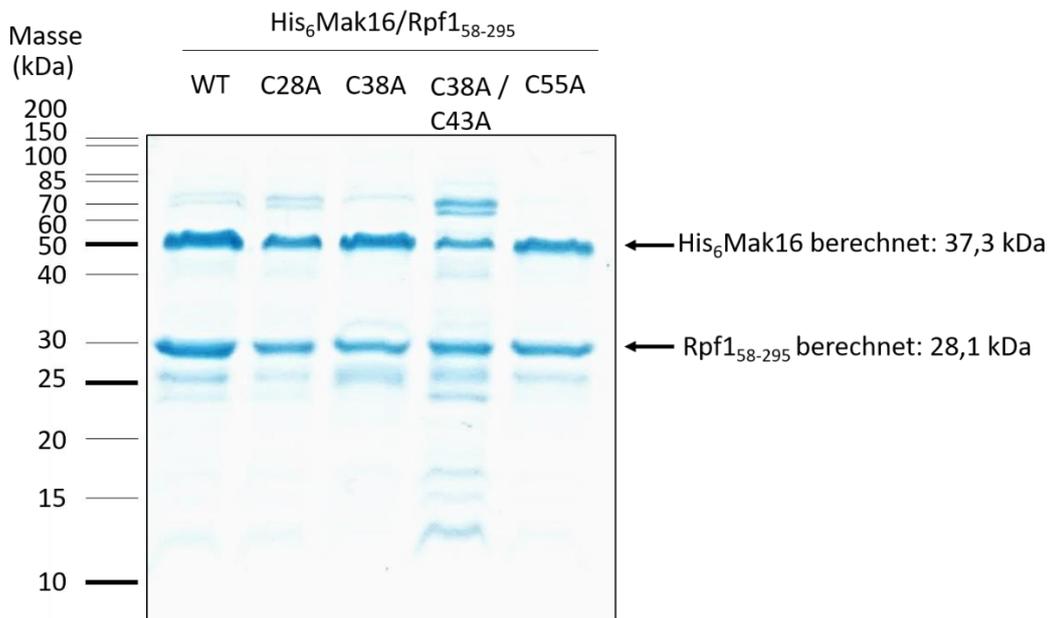
Komponente	1 (ox)	2 (ox)	3 (red)	4 (red)
$\delta$ (mm/s)	0,42	0,44	0,53	0,58
$\Delta E_Q$ (mm/s)	0,99	1,31	0,96	1,33
$\Gamma$ (mm/s)	0,28	0,28	0,36	0,36
Area (%)	0	0	50	50
Zuordnung	$Fe^{2,5+}-Fe^{2,5+}$	$Fe^{2,5+}-Fe^{2,5+}$	$Fe^{2+}-Fe^{2+}$	$Fe^{2,5+}-Fe^{2,5+}$

#### 4.1.8 Untersuchung der Eisen-Schwefel-Clusterkoordination anhand Cysteinmutanten

Anhand von bioinformatischen Untersuchungen in *S. cerevisiae* von Mak16 wurden vier konservierte Cystein-Reste: C15, C28, C38, C43 und zwei nicht konservierte Cystein-Reste: C55 und C108 im N-Terminus identifiziert (Kapitel 4.2.1). Um die Auswirkungen von fehlenden Cysteinliganden auf Mak16 zu beurteilen, wurden durch Punktmutationen Cysteinmutanten von Mak16 hergestellt und die entsprechenden Varianten in *E. coli* exprimiert. Für die Expressierung in *E. coli* wurden mittelstarke bis starke Phänotyp-Cysteinmutanten, bezogen auf die Tüpfeltestergebnisse (Abbildung 48), gewählt. Zusätzlich wurde die Doppel-Cysteinmutante C38A/C43A getestet um den Verlust zweier essentieller Clusterliganden zu bewerten. Die Cysteinmutante C55A wurde als Negativkontrolle gewählt, bei der ein Ergebnis wie vom WT-Mak16 erwartet wird. Deshalb wurden die Cysteine an den Stellen 28, 38 und 55 in pETDuet-1-*His<sub>6</sub>MAK16/RPF1<sub>58-295</sub>* zu Alanine ausgetauscht sowie einen Doppelaustausch der Cysteine 38 und 43 durchgeführt (Kapitel 3.2.9). Die Cys-Varianten wurden überexprimiert und die Proteine mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Cys-Varianten konnten in ausreichender Menge isoliert werden, um eine Charakterisierung mittels SDS-PAGE und UV/Vis-Spektroskopie, sowie die Bestimmung des Eisen- und säure-labilen Schwefelgehalts durchzuführen. Abbildung 43 zeigt die SDS-PAGE aller Eluate der Cys-Varianten im Vergleich zum isolierten Wildtyp-Komplex. In allen Proben konnten zwei Hauptbanden bei 28 kDa und 52 kDa detektiert werden. Diese Banden konnten den beiden Proteinen Rpf1<sub>58-295</sub> und His<sub>6</sub>Mak16 zugeordnet werden. Die Doppel-Cysteinmutante wies eine geringere Menge an His<sub>6</sub>Mak16, dafür jedoch weitere Banden bei 70 kDa (Hitzeschock Proteine) auf. Das Isolieren dieser Proteine und die geringere Menge an His<sub>6</sub>Mak16 deuteten auf ein Problem der Stabilität und Löslichkeit hin. Dennoch konnte in allen Cys-Varianten von

## Ergebnisse

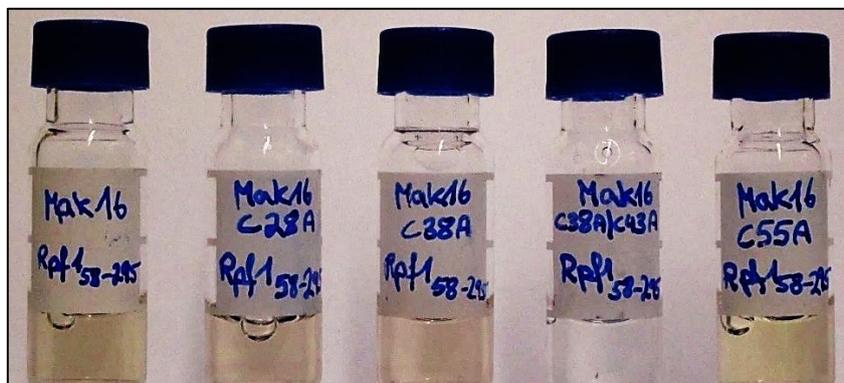
einer Komplexbildung mit Rpf1 ausgegangen werden, denn in allen Proben konnte durch Reinigung des His<sub>6</sub>Mak16–Proteins sein Bindungspartner Rpf1<sub>58–295</sub> gewonnen werden.



**Abbildung 43: SDS–PAGE zum Vergleich der gereinigten Cys–Varianten von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>.**

Die Proben der WT– und Cysteinmutantenproteinkomplexe wurden nach der Aufreinigung mittels Ni–NTA–Agarose mit anschließender Entsalzung auf die SDS–PAGE (~ 10–15 µg) aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Marker: Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa, NEB #P7717). Dateiname: Charakterisierung der gereinigten Cys–Varianten von His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58–295</sub> mittels SDS–PAGE.png.

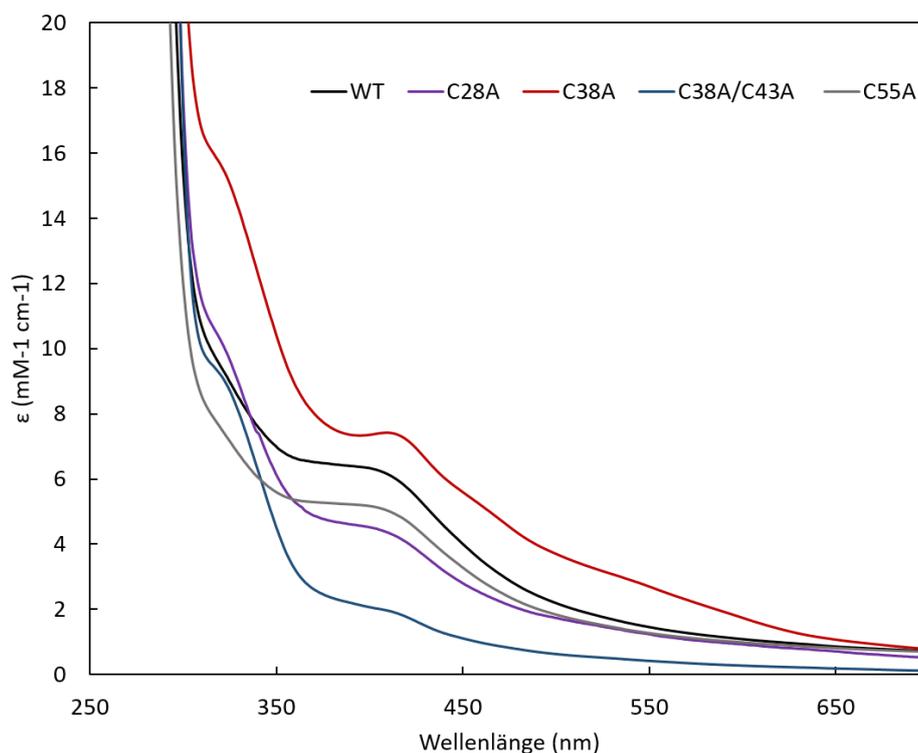
In Abbildung 44 sind die isolierten Eluate dargestellt, die sich in ihrer Farbe unterscheiden. Der WT–His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>–Komplex sowie die Kontroll–Cysteinmutante C55A, zeigten eine tiefe bräunliche Farbe. Die Cysteinmutanten C28A und C38A besaßen hingegen eine rötliche Farbe und die Doppel–Cysteinmutante C38A/C43A war farblos.



**Abbildung 44: Eluate gereinigter Cys–Varianten von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>.**

Eine Fotografie der gereinigten WT– und Cysteinmutantenproteinkomplexe (WT: 4,0 mg/ml, C28A: 1,5 mg/ml, C38A: 2,0 mg/ml, C38A/C43A: 1,7 mg/ml, C55A: 3,0 mg/ml) ist abgebildet. Dateiname: Foto der gereinigten Cys–Varianten von His<sub>6</sub>Mak16–Rpf1<sub>58–295</sub>.png.

Die SDS-PAGE zeigt in allen Eluaten eine Bande bei ca. 50 kDa, die His<sub>6</sub>Mak16 zugeordnet werden kann. Das jedoch die Eluate von unterschiedlichen Farben geprägt waren zeigt, dass die Eluate Mak16 mit unterschiedlich koordinierten Eisen-Schwefel-Clustern enthalten. Die bräunlich gefärbten Eluate deuten auf einen [4Fe-4S]-Cluster hin, wohingegen die rote Farbe einen [2Fe-2S]-Cluster signalisiert. Zur weiteren Charakterisierung der Cysteinmutanten wurden anschließend die Extinktionskoeffizienten gegen die Wellenlängen aufgetragen (Abbildung 45). Dabei werden die Unterschiede zwischen den Cysteinmutanten deutlich. Der schulterartige Verlauf bei  $\lambda = 410\text{--}420\text{ nm}$  konnte sowohl beim WT-Komplex sowie bei allen Cys-Varianten beobachtet werden. Bei den Cys-Varianten C28A, C38A und C38A/C43A konnte ein auftretendes Maximum bei  $\lambda = 325\text{ nm}$  detektiert werden. Bei der Cys-Variante C38A konnte neben diesen beiden Absorptionsmaxima ( $\lambda = 325\text{ nm}$  und  $410\text{--}430\text{ nm}$ ) noch ein weiteres Maximum bei  $\lambda = 550\text{--}570\text{ nm}$  detektiert werden.



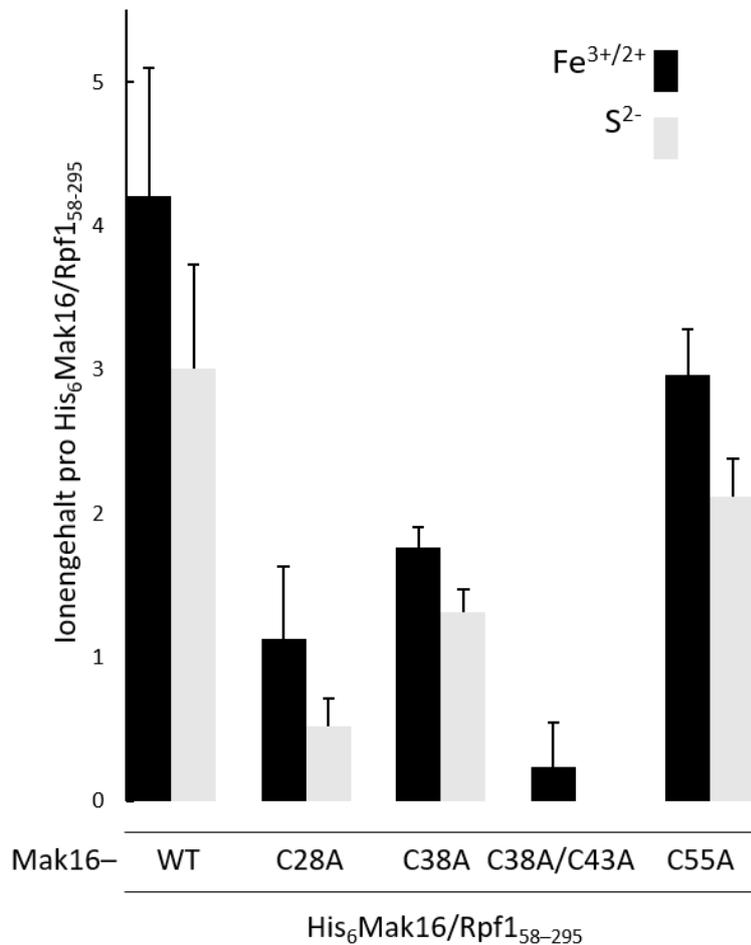
**Abbildung 45: Analyse gereinigter Cys-Varianten von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> mittels UV/Vis-Spektroskopie.**

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in Bezug auf ihre molaren Extinktionskoeffizienten dargestellt. Legende = Schwarz: WT-His<sub>6</sub>Mak16, lila: C28A, rot: C38A, blau: C38A/C43A, grau: C55A. Dateiname: Analyse der gereinigten Cys-Varianten mittels UV/Vis-Spektroskopie.xlsx.

Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Cysteinmutanten werden auch in der Abbildung 46 durch den Eisen- und säure-labilen Schwefelgehalt pro Protein gezeigt.

## Ergebnisse

Verglichen mit den Eisen- und säure-labilen Schwefelwerten des Mak16-WTs von ca.  $4,2 \pm 0,9$  Eisen- und  $3,0 \pm 0,7$  Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>, zeigte die Mak16-Cysteinmutante C55A ca.  $3,0 \pm 0,3$  Eisen- und  $2,1 \pm 0,3$  Sulfidionen. Die drei Cysteinmutanten C28A (ca.  $1,1 \pm 0,5$  Eisen- und ca.  $0,5 \pm 0,2$  Sulfidionen), C38A (ca.  $1,8 \pm 0,1$  Eisen- und  $1,3 \pm 0,2$  Sulfidionen) und C38A/C43A (ca.  $0,2 \pm 0,3$  Eisen- und  $0 \pm 0$  Sulfidionen) zeigten deutlich geringere Werte für den Eisen- und säure-labilen Schwefelgehalt pro His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>.



**Abbildung 46: Eisen- und säure-labiler Schwefelgehalt isolierter Cys-Varianten von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexen.**

Die Cysteinmutanten wurden anhand des Eisen- und säure-labilen Schwefelgehalts mit dem WT verglichen.  
Dateiname: Eisen- und Schwefelgehalt der isolierten Cys-Varianten von His<sub>6</sub>Mak16-Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexen.xlsx.

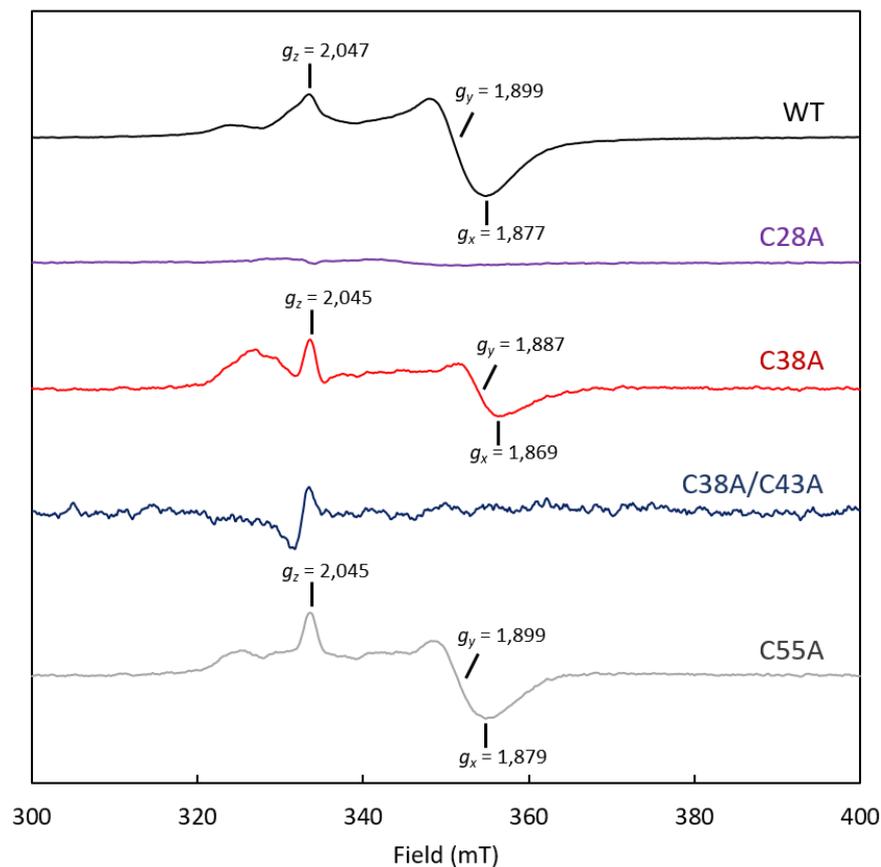
In Tabelle 43 ist die gereinigte Proteinmenge in mg pro Liter LB-Medium angegeben. Dabei wiesen, mit Ausnahme der Cysteinmutante C55A, alle Cysteinmutanten 2- bis 3-fach geringere Ausbeuten als der WT-Komplex auf.

**Tabelle 43: Proteinausbeute nach der Aufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> und den Cys-Varianten**

Isolierte Proteinmenge pro Liter LB-Medium in mg von WT-Mak16 und Cys-Varianten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus je zwei bzw. drei (\*) Aufreinigungen.

Cys-Variante	mg/l LB
WT*	2,6 ± 1,4
C28A	1,2 ± 0,8
C38A	0,9 ± 0,1
C38A/C43A	0,9 ± 0,6
C55A	2,5 ± 1,0

Abbildung 47 zeigt die ESR-Spektren der Dithionit-reduzierten Cysteinmutanten verglichen mit dem Mak16-WT-Spektrum. Für die Cysteinmutanten C38A und C55A wurden eindeutige Signale aufgenommen, die wie der WT einem [4Fe-4S]-Cluster zugeordnet werden können.

**Abbildung 47: ESR-Spektren isolierter Cys-Varianten von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplexen.**

Gemessene ESR-Spektren (10 K, 30 dB, Mikrowellenleistung: 0,21 mW, Amplitudenmodulation: 1,5 mT) bei pH = 10,0 in CAPS-Puffer (25 mM CAPS, 150 mM NaCl) nach Zugabe von Natriumdithionit (2 mM, 3 min). Die ESR-Signale wurden entsprechend auf die Proteinkonzentrationen korrigiert: WT: 2 mg/ml, C28A: 3,4 mg/ml, C38A: 1,35 mg/ml, C38A/C43A: 0,4 mg/ml und C55A: 1,5 mg/ml. Die g-Werte wurde entsprechend den Spektren angegeben. Dateiname: ESR-Spektren der Cysteinmutanten.xlsx.

## Ergebnisse

Bei der Cysteinmutante C28A und bei der Doppel-Cysteinmutante C38A/C43A konnten aufgrund des geringen Eisen-Schwefel-Clustergehalts, kombiniert mit der Labilität des Dithionit-reduzierten Clusters durch die Abwesenheit der Cys-Liganden, keine ESR-Signale detektiert werden. Die Betrachtung der  $g$ -Werte der Cysteinmutanten mit einem  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Clustersignal, zeigten vergleichbare Werte zum  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster im Wildtyp His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub>-Komplex.

## 4.2 *In vivo* Untersuchungen zum Einfluss des Eisen–Schwefel–Clusters von Mak16 in Hefezellen

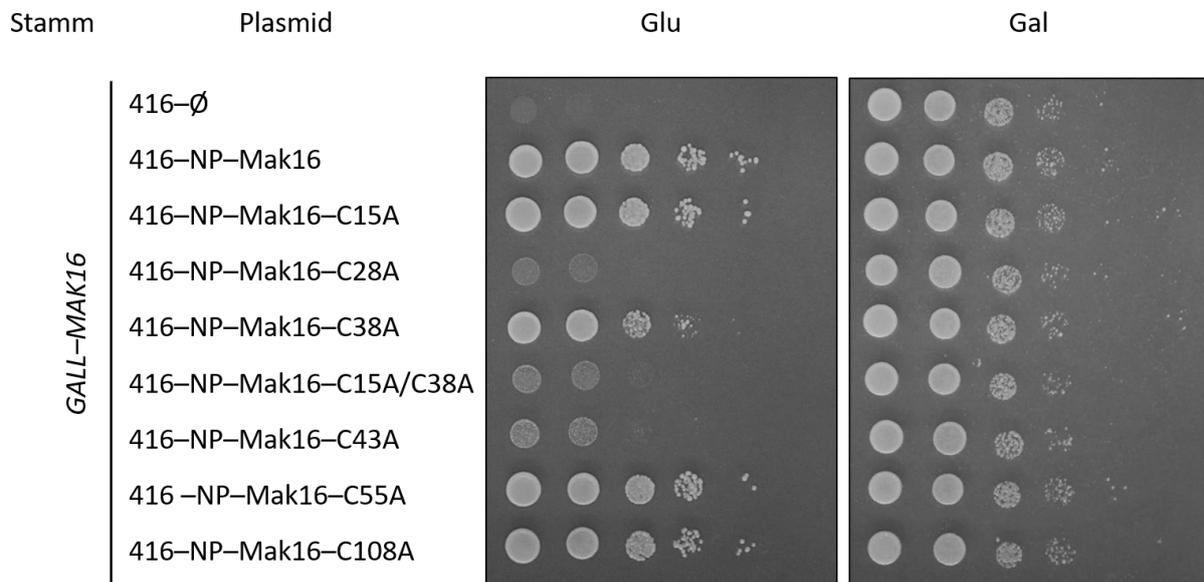
In diesem Abschnitt wird untersucht, wie sich der Austausch von Cysteinliganden zu Alaninresten mittels zielgerichteter Mutagenese auf die Funktion von Mak16 in Hefe auswirkt. Dafür wurden Mutationen der vier hochkonservierten Cysteinreste, die in den verfügbaren Kryostrukturen des Mak16–Proteins aus Hefe als Zn–Liganden identifiziert wurden (C15, C28, C38 und C43), sowie Mutationen der Cysteinreste C55 und C108 vorgenommen und das Wachstum von Hefezellen untersucht. Außerdem wurde die Wirkung temperatursensitiver (*ts*) Mutationen der CIA–Maschinerie–Faktoren in Kombination mit Mak16–*ts*–Mutanten getestet. Des Weiteren wurde die *in vivo* Toleranz der Mak16–C38A Mutation gegenüber Redox–Stressgeneratoren untersucht. Da *MAK16* ein essentielles Gen ist, kann es nicht ohne Verlust der Lebensfähigkeit aus dem Genom entfernt werden. Als Alternative zur Deletion wurden galaktose–regulierbare Stämme hergestellt, in denen die Expression des Genprodukts durch das Wachstum in glukosehaltigem Medium zeitlich reduziert wurde. Dazu wurde der *MAK16* Promotor gegen ein *GAL* Promotor mittels homologer Rekombination ausgetauscht. In dieser Arbeit wurde sowohl der starke *GAL1–10*–Promotor als auch der *GALL*–Promotor, der genetisch verändert wurde und zur schwächeren Expression auf Galaktose führt, eingesetzt. Je nach Experiment wurden einfache oder doppelte galaktose–regulierbare Stämme verwendet. Bei den Doppelmutantenstämmen steht ein Gen unter der Kontrolle von *GAL1–10*–Promotor, während das andere Gen unter der Kontrolle des *GALL*–Promotors steht.

### 4.2.1 Komplementierung des Wachstumsphänotyps in *S. cerevisiae* mit Cys–Varianten

Um die Wirkung des Cystein–Alanin–Austauschs von Mak16 auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde das zentromere Plasmid 416, worin die Expression von Mak16 unter Kontrolle des endogenen *MAK16*–Promotors (416–NP<sub>MAK16</sub>) steht, hergestellt. Ein leeres Plasmid (416–*MET25*) oder Plasmide, welche eine WT–Kopie des Mak16 oder die Cystein–Varianten (C15A, C28A, C38A, C43A, C55A und C108A) sowie die Doppel–Cysteinmutante C15A/C38A tragen, wurden in den *GALL–MAK16*–Stamm transformiert. Nach 20–stündiger Überexpression bzw. Depletion von Mak16 in galaktose– bzw. glukosehaltigem flüssigen SC–Medium wurden die Hefezellen gewaschen, eine 10–fache serielle Verdünnung hergestellt

## Ergebnisse

und auf SC-Agarplatten supplementiert mit Glukose oder Galaktose getüpfelt und 2 Tage lang bei 30 °C inkubiert.



**Abbildung 48: Wachstumskomplementation der Mak16-Cysteinmutanten zeigt unterschiedlichen Komplementationsphänotyp.**

Abgebildet sind die Ergebnisse des Tüpfeltests von galaktose-regulierbaren Mak16-Zellen mit den jeweiligen transformierten Plasmiden: Mak16-Cysteinmutanten, WT-Mak16, leeres Plasmid (416-∅). Diese wurden für 20 h in Glukose (Glu) und in Galaktose (Gal) als Wachstumskontrolle kultiviert und gewaschen. Anschließend wurden sie seriell verdünnt auf glukose- und galaktosehaltigen SC-Agarplatten getüpfelt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C konnte das Wachstum bewertet werden. Dateiname: Wachstumskomplementation der Mak16-Cysteinmutanten.png.

Wie in Abbildung 48 gezeigt wird, weisen die Zellen in Anwesenheit von WT-Mak16 auf Glukose ein normales Wachstum auf, während die Negativkontrolle mit leerem Plasmid kein Wachstum zeigt. Dies zeigt sowohl die Korrektheit als auch die Stringenz der Depletion von endogenem Mak16 auf Glukose. Es sollte auch angemerkt werden, dass das tragen einer Cys-Variante von Mak16 keine sichtbare Beeinträchtigung des Wachstums auf galaktosehaltigem Medium zeigte, das heißt, dass sie keine signifikanten dominanten negativen Auswirkungen auf das Wachstum nahmen. Es ist auffallend, dass neben dem Mak16-Wildtyp-Protein auch die Cysteinmutanten C15A, C38A, C55A und C108A das Wachstum in Mak16-depletierten Zellen teilweise (C38A) oder vollständig (C15A, C55A und C108A) ergänzen konnten. Im Gegensatz dazu war der Phänotyp bei der Expression der Cysteinmutanten C28A und C43A so stark, dass das Wachstum von *S. cerevisiae* vollständig unterbunden wurde. Interessanterweise hat der Austausch von Cystein gegen Alanin am Anfang des N-Terminus

(C15A) im Vergleich zum Wildtyp fast keine Auswirkung. Die Cysteinmutante C38A zeigte einen intermediären Phänotyp, der sich jedoch zu einem sehr harten Phänotyp entwickelt, wenn zusätzlich der Cysteinrest C15 zu Alanin ausgetauscht wird. Es lässt sich daraus schließen, dass neben den Cysteinresten C28 und C48 auch der Cysteinrest C38, der zuvor als defekte allelische Mutante für die rRNA-Reifung identifiziert wurde, und der Cysteinrest C15 für die Funktion von Mak16 entscheidend ist. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse mit rekombinant exprimierten Mak16 und die hier vorgestellten Komplementationstudien, dass ein Eisen–Schwefel–Cluster in Mak16 vorhanden ist und von den Cysteinresten C15, C28, C38 und C43 koordiniert wird. Die nicht-konservierten Cysteinreste an den Positionen 55 und 108 sind nicht essentiell für das Zellwachstum und wahrscheinlich nicht an der Eisen–Schwefel–Koordination in Mak16 beteiligt.

#### 4.2.2 Untersuchungen zur synthetischen Letalität zwischen CIA–Maschinerie–Faktoren und Mak16

In einem Gespräch mit Prof. Dr. Ed Hurt und PD Dr. Johann Baßler entstand der Vorschlag zu testen, ob temperatursensitive Mutanten aus ihrer Sammlung, darunter Allele von Cfd1, Nbp35 und Cia1 (Yarunin *et al.*, 2005) die eine oder mehrere Punktmutationen aufweisen, in Kombination mit unseren etablierten galaktose-regulierbaren Stämmen verwendet werden könnten, um eine genetische Interaktion zwischen Eisen–Schwefel–Einbau und der Mak16–Funktion zu untersuchen. Diese drei essentiellen Mitglieder der CIA–Assemblierungsmaschinerie sind im Zytosol an dem Aufbau von Eisen–Schwefel–Proteinen beteiligt (Kapitel 1.1.2). Die zwei Proteine Cfd1 und Nbp35 haben eine genetische Wechselwirkung und bilden *in vivo* einen stabilen Komplex. Sowohl Cfd1 als auch Nbp35 assoziieren an ihren C–Termini einen gemeinsamen [4Fe–4S]–Cluster und Nbp35 bindet einen weiteren [4Fe–4S]–Cluster an seinem N–Terminus. Cia1 ist Teil des CIA–Zielkomplexes und ist im Wesentlichen für den Transfer von Eisen–Schwefel–Clustern von dem Cfd1/Nbp35–Komplex unter Beteiligung von Nar1 auf die eigentlichen Zielproteine verantwortlich (Netz *et al.*, 2007).

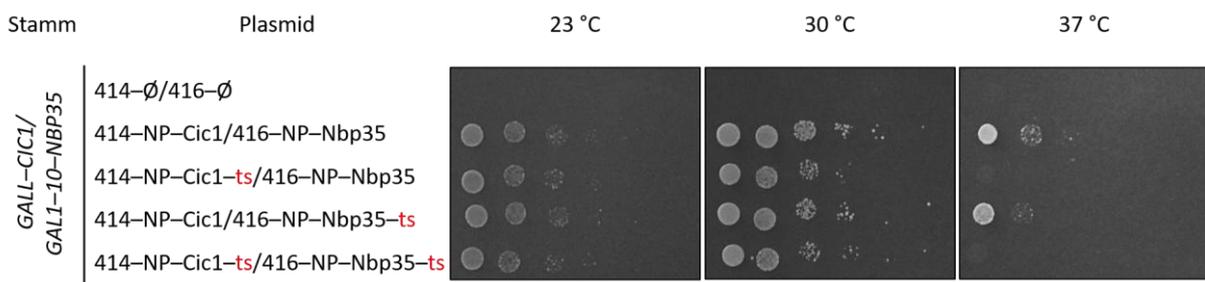
Per Definition werden zwei Gene als synthetisch letal bezeichnet, wenn der isolierte Verlust oder einzelne Mutationen eines dieser Gene von Zellen toleriert wird, während der gleichzeitige Verlust oder die simultane Mutation beider Gene für die Zellen letal ist.

## Ergebnisse

Deswegen wurde getestet, ob die Wirkung der CIA-Maschinerie-ts-Mutanten in Kombination mit Mak16-ts-Mutanten zu synthetischer Letalität führen.

Dazu wurden die Mak16-ts- und Cic1-ts-Mutanten aus der Sammlung von Prof. Dr. Shay Ben-Aroya benutzt (Ben-Aroya *et al.*, 2008). Cic1 wurde als Negativkontrolle gewählt, da es kein Eisen-Schwefel-Protein ist und an einer nicht mit Mak16 zusammenhängender Stufe der Ribosomenbiogenese beteiligt ist. Die Konstruktion der temperatursensitiven Plasmide begann mit der Amplifizierung der gewünschten Gene von der genomischen Hefe-DNA mit anschließender Klonierung in die entsprechenden zentromere Vektoren (Kapitel 3.2.1–3.2.8). Danach erfolgte die gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren um die ts-Proteine zu generieren (Kapitel 3.2.9). Zur Überprüfung der Funktionalität der Plasmide, wurden diese einzeln transformiert, depletiert und mittels Tüpfeltest auf einen Wachstumsdefekt untersucht.

Bei den permissiven Temperaturen von 23 °C und 30 °C wurde ein unverändertes Wachstumsverhalten der Zellen des Depletionsstammes *GALL-CIC1/GAL1-10-NBP35* beobachtet. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen Zellen mit und ohne temperatursensitiven Plasmidkopien von *CIC1* und *NBP35* (Abbildung 49). Während die Depletion in Glukose bei 37 °C bei allen Plasmidkombinationen einen nahezu vollständigen Wachstumsverlust verursachte. Daraus wurde geschlossen, dass 37 °C eine „zu harte“ Temperatur für die Depletion dieser Zellen ist und dadurch keine Aussagen bzgl. der Abhängigkeit zwischen Nbp35 und Cic1 getroffen werden konnte.



**Abbildung 49: Ts-Cic1 nimmt keinen Einfluss auf CIA-Maschinerie-Faktor Nbp35 unter permissiver Temperatur.**

Der zweifach galaktose-regulierbare Hefestamm wurde mit den jeweiligen temperatursensitiven oder WT-Plasmiden von Nbp35, sowie dem 60S Assemblierungsprotein Cic1 kotransformiert und in Glukose für 64 h depletiert. Seriell verdünnt wurden sie auf glukosehaltige SC-Agarplatten getüpfelt und bei permissiven (23 °C, 30 °C) und non-permissiver (37 °C) Temperaturen für zwei Tagen inkubiert. Anschließend konnte das Wachstum bewertet werden. Dateiname: *Temperatursensitivität von Cic1 mit CIA-Maschinerie-Faktor Nbp35.png*.

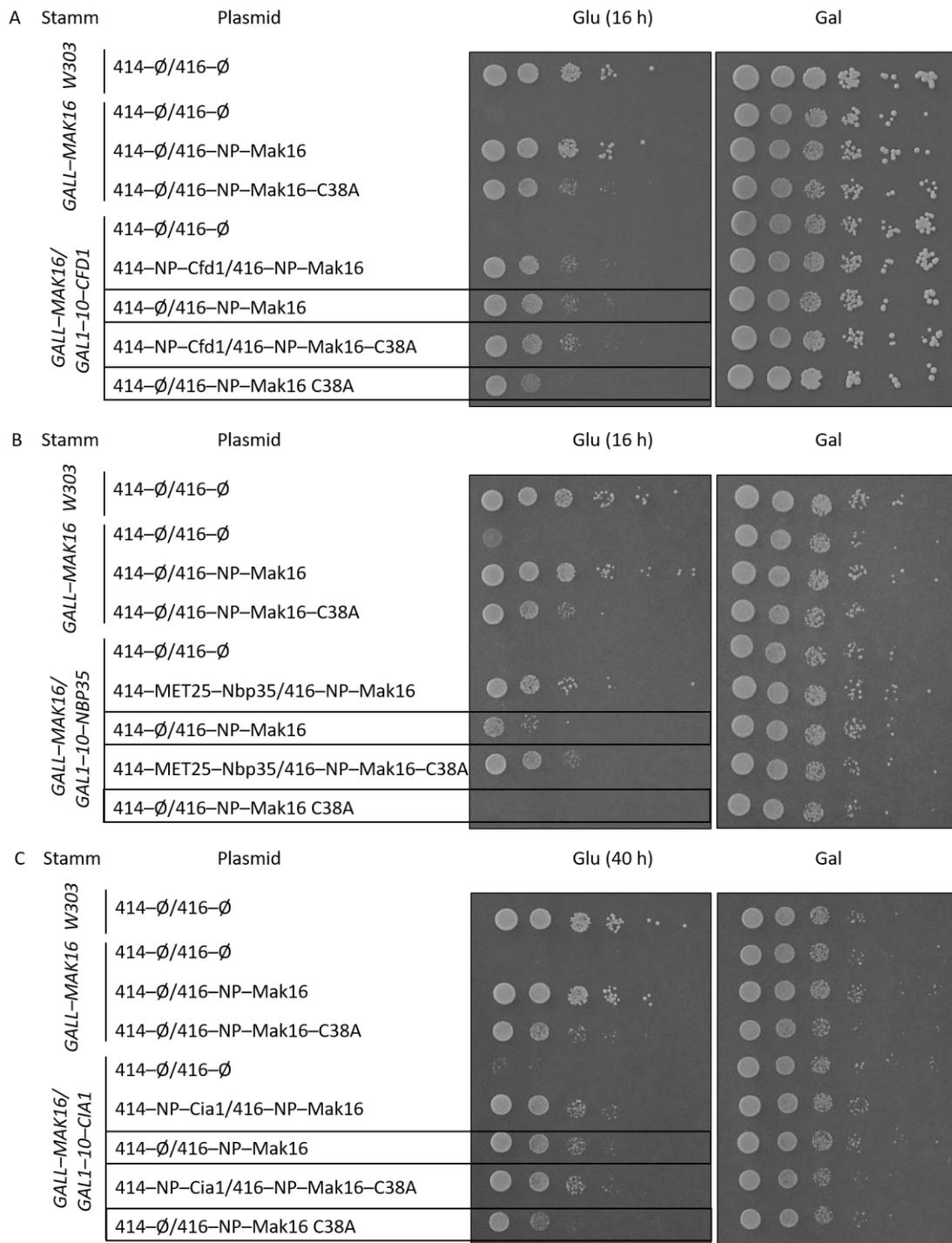


### 4.2.3 Depletion der CIA–Maschinerie–Faktoren führt zur synthetischen Letalität

In einer früheren Arbeit (Pellett *et al.*, 2006) wurde die Rolle von Mak16 bei der Ribosomenbiogenese in *S. cerevisiae* durch Analyse der rRNA–Prozessierung in einem temperatursensitiven Hefestamm *mak16–1* untersucht. Diese Mutante wurde erstmals von Wickner und Leibowitz, 1979, beschrieben und enthält eine einzige Punktmutation an Position 38, von Cystein zu Tyrosin (C38Y) (Wickner *et al.*, 1979). Eine umfassende Charakterisierung mit genetischen und molekularen Methoden führten die Autoren zu dem Schluss, dass Mak16 in der Ribosomenbiogenese für die Reifung von 25S und 5.8S rRNAs erforderlich ist. Um die Auswirkung dieser Mutation in Mak16 im Zusammenhang mit der Eisen–Schwefel–Maturation auf synthetische Letalität zu untersuchen, konstruierten wir Stämme, in denen die Expression sowohl von Mak16 als auch eines bestimmten CIA–Maschinerie–Faktors unter der Kontrolle von Galaktose–Promotoren stehen. Dazu verwendeten wir für jeden Stamm verschiedene Genkassetten, die in einer sinnvollen Reihenfolge konstruiert wurden (Kapitel 3.4.3). Anschließend wurde in diesen Stämmen ein leeres Plasmid oder Plasmide mit einer Wildtyp–Kopie von Mak16 oder der Mak16–Cysteinmutante C38A transformiert.

In der Abbildung 51 sind die Ergebnisse des Tüpfeltests der drei depletierten essentiellen CIA-Mitglieder Cfd1, Nbp35 und Cia1 mit der transformierten Mak16-Cysteinmutante C38A dargestellt. Die Reihen 2–4 zeigten in allen drei Teilen A, B und C den alleinigen Effekt der Plasmide (leer Plasmid, WT- und Mutanten-Plasmid) im *GALL-MAK16*-Stamm. Die Reihen 5–9 zeigten den Effekt der transformierten Plasmide in dem jeweiligen Doppelstamm *GALL-MAK16/GAL1-10-CIA-Mitglied*. Verglichen wurde das Zellwachstums in den Reihen 7 und 9 (jeweils schwarz eingerahmt). Reihe 7 zeigte dabei die Rettung des Zellwachstums von WT-Mak16 mit depletierten CIA-Mitgliedern, während die Reihe 9 den Einfluss der Cysteinmutante im Zusammenspiel mit den depletierten CIA-Mitgliedern zeigte. Betrachtete man die Teilergebnisse A und C, die die Depletion der Proteine Cfd1 und Cia1 zeigen, wurde in der Reihe 9 nur eine leichte Schwächung des Wachstums sichtbar. Teil B zeigt bei der Depletion von Nbp35 eine eindeutige synthetische Letalität in der Reihe 9. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den drei CIA-Mitgliedern lassen sich über einen Blick in die Reihen 7 und 9 (Abbildung 51 A, B und C) erklären. Bei den beiden Proteinen Cfd1 und Cia1 kann trotz depletierten CIA-Mitgliedern die Rettung des Zellwachstums mit sowohl WT-Mak16, als auch mit der Cysteinmutante C38A beobachtet werden (Reihen 7 und 9, Abbildung 52 A und C). In Abwesenheit dieser essentiellen Proteine, sollte jedoch kein Zellwachstum möglich sein. Dadurch wird deutlich, dass nach 16 h bzw. 40 h weiterhin geringe Mengen an genomisch kodierten CIA-Proteinen Cfd1 und Cia1 vorliegen, und diese geringen Mengen bereits ausreichen um das Zellwachstum zu retten. Nbp35 zeigt in der Zeile 7 (B), im Vergleich zu den beiden anderen CIA-Mitgliedern, mit WT-Mak16 nur ein sehr schwaches Zellwachstum. Das CIA-Mitglied Nbp35 besitzt somit eine kürzere Depletionszeit (ca. 16 h), wodurch der Einfluss der Cysteinmutante C38A, bei depletiertem CIA-Mitglied Nbp35 (Zeile 9), deutlich erkennbar ist, indem keine Rettung des Zellwachstums beobachtet werden kann (Abbildung 51 B). Anhand dieser Resultate wird die Signifikanz der Eisen-Schwefel-Cluster in der Ribosomenbiogenese in Abhängigkeit der CIA-Maschinerie deutlich.

## Ergebnisse



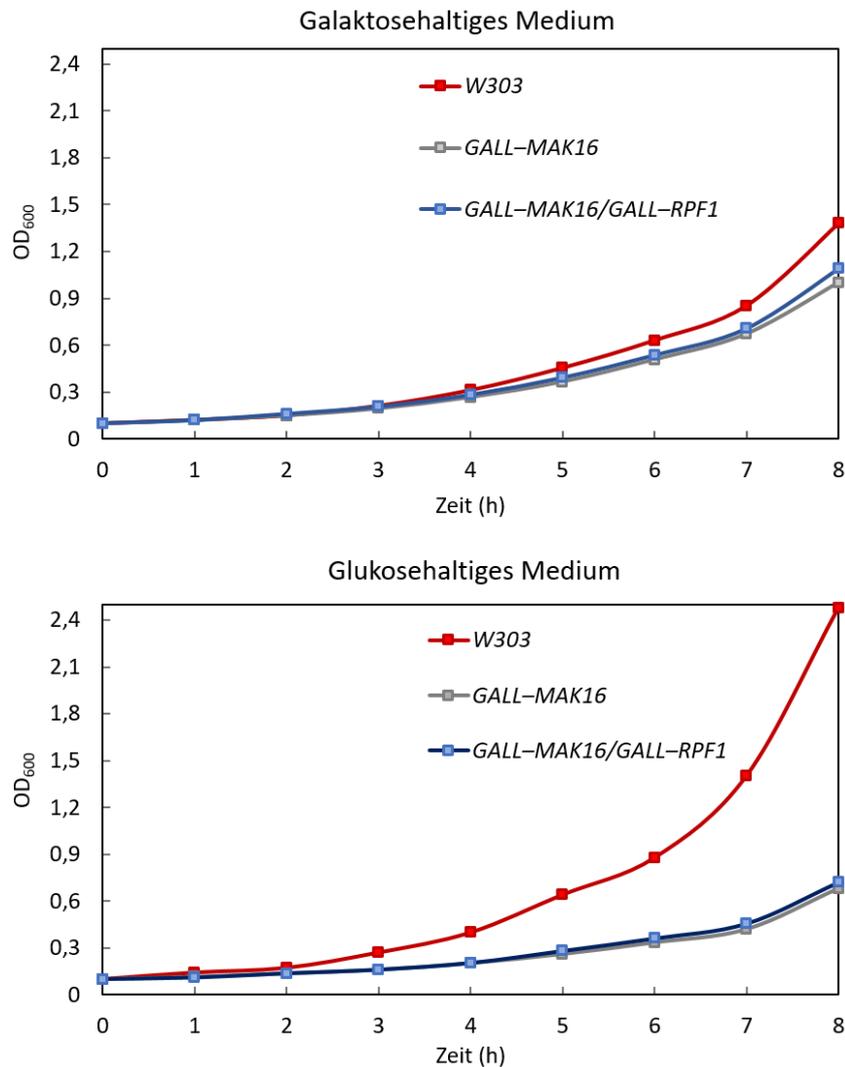
**Abbildung 51: Nachweis der synthetischen Letalität zwischen dem CIA-Faktor Nbp35 und Mak16.**

Die doppelt-galaktose-regulierbaren Hefestämme wurden mit den jeweiligen WT-Plasmiden der CIA-Maschinerie-Faktoren, (A) *Cfd1*, (B) *Nbp35* und (C) *Cia1*, sowie *Mak16* oder der *Mak16*-Mutante *C38A* kotransformiert und in Glukose depletiert. Seriell verdünnt wurden die Zellkulturen, auf glukosehaltigen (Glu) oder galaktosehaltigen (Gal) SC-Agarplatten getüpfelt und bei 30 °C für zwei Tagen inkubiert, um anschließend das Wachstum zu bewerten. Dateinamen: Nachweis der synthetischen Letalität zwischen dem CIA-Faktor *CFD1* und *MAK16.png*, Nachweis der synthetischen Letalität zwischen dem CIA-Faktor *NBP35* und *MAK16.png*, Nachweis der synthetischen Letalität zwischen dem CIA-Faktor *CIA1* und *MAK16.png*.

#### 4.2.4 Kritikalität des Eisen–Schwefel–Clusters in Mak16 für die Interaktion mit Rpf1 in Hefezellen

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Mak16 und Rpf1 heterolog koexprimiert einen stabilen Komplex bilden. Um diese Komplexbildung *in vivo* zu analysieren, wurde die Koimmunopräzipitation verwendet, um physiologisch relevante Protein–Protein–Wechselwirkungen zu analysieren, indem zielspezifische Antikörper verwendet werden, welche an das Zielprotein (Köder–Protein) binden und dadurch indirekt an das Zielprotein gebundene Proteine (Beute–Proteine) zusammen isolieren können. Für die Koimmunopräzipitation wurden Plasmidkopien von N–terminal HA–getagtem *MAK16* und N–terminal Myc–getagtem *RPF1* in einen galaktose–regulierbaren Hefestamm transformiert. Mittels Homologer Rekombination wurde der *GALL–MAK16/GALL–RPF1* Stamm hergestellt und das Wachstum mittels OD<sub>600</sub>–Messung über acht Stunden in Galaktose und Glukose verfolgt, um den Effekt vom Promotor auf das Zellwachstum zu analysieren. Abbildung 52 zeigt die in Galaktose und Glukose gezüchteten Wachstumskurven der Hefestämme. Die beiden galaktose–regulierbaren Stämme *GALL–MAK16* und *GALL–MAK16/GALL–RPF1* waren, wie erwartet, in glukosehaltigem Medium in ihrem Wachstum beeinträchtigt, während das Wachstum vom WT–Stamm *W303* nicht beeinträchtigt wurde.

## Ergebnisse

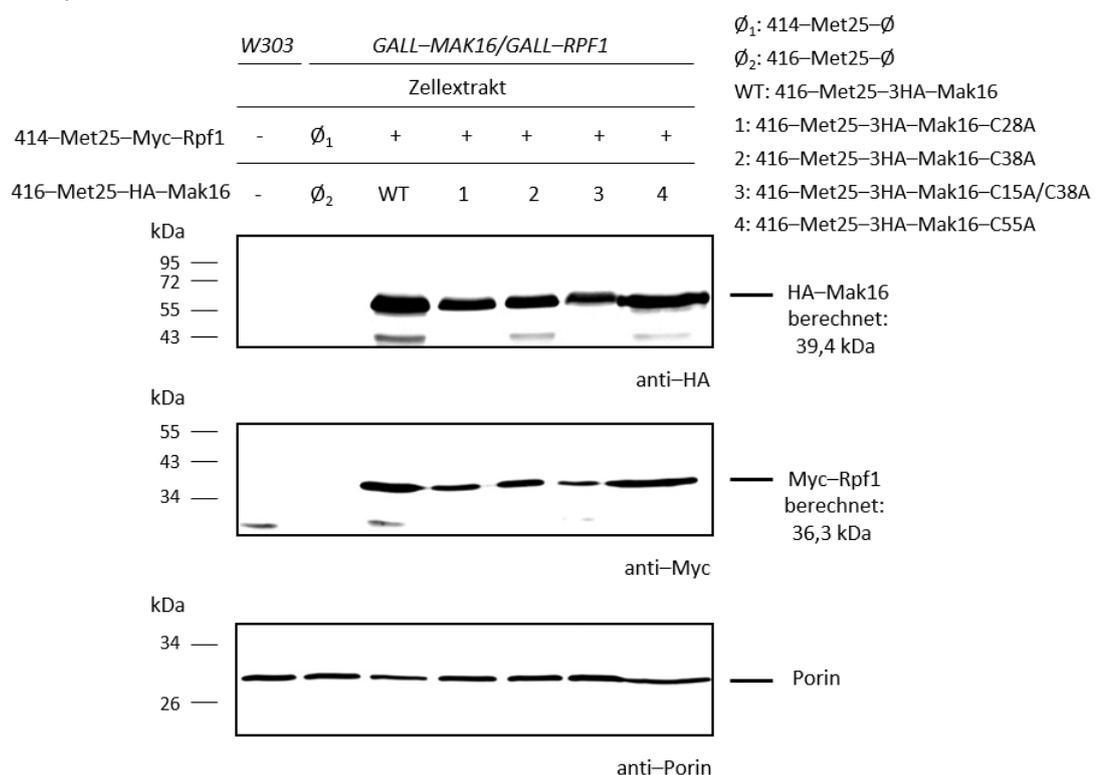


**Abbildung 52: Wachstumsverhalten von GALL-MAK16/GALL-RPF1 Zellen.**

Es wurden OD<sub>600</sub>-Messungen auf Zeit von GALL-MAK16 und GALL-MAK16/GALL-RPF1 Stämmen im Vergleich zum WT-W303 Stamm durchgeführt. Dafür wurden SC-Übernachtskulturen in Galaktose kultiviert, am nächsten Morgen gewaschen und in das entsprechende Frischmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 umgeimpft. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und eine OD<sub>600</sub>-Messung durchgeführt. Dateiname: Wachstumsverhalten von MAK16-GALL-RPF1 in glukose- und galaktosehaltigem Medium.xlsx.

Anschließend sollte mittels Koimmunopräzipitation die Komplexbildung von Mak16 mit Rpf1 und die Komplexbildung der Cysteinmutanten von Mak16 mit Rpf1 genauer untersucht werden. Um die Effizienz der Bindung von Mak16-Cysteinmutanten an Rpf1 analysieren zu können, mussten die Konzentrationen an Mak16 und Rpf1 in der Zelle präzise reguliert werden. Die MET25-Promotorstärke in Abwesenheit von Methionin im Medium entspricht der Stärke eines mittelstarken Promotors und dessen Expression kann durch Zugabe von Methionin im Medium herunterreguliert werden. Vorversuche ohne Methionin zeigten keinen Effekt der Cysteinmutanten von Mak16 und suggerierten, dass die Mak16 Expression unter

dem *MET25*-Promotor zu hoch ist und in High Copy Suppression resultiert, ein genetisches Phänomen, bei dem die Überexpression (durch viele Kopien eines Gens) die negativen Effekte einer Mutation ausgleichen kann. Durch Feineinstellung der Proteinexpression mit Methionin im Medium kann das physiologisch-ähnlichste Expressionsniveau eingestellt werden. Deshalb wurden unterschiedliche Konzentrationen von Methionin dem Medium hinzugegeben, um die Expression zu modulieren. Mit 0,5 mM Methionin konnte mittels Koimmunopräzipitation von Mak16, seinen Cysteinmutanten und Rpf1 kleinste Veränderungen detektiert werden. Mittels dem Micro-Biuret-Assay wurde zuvor die Proteinkonzentration aller Proben auf 6,4 µg/µl normiert. Damit wurde gewährleistet, dass Unterschiede in der Intensität der Banden nur auf die Interaktion der Proteine zurückzuführen sind. In Abbildung 53 weisen die Zellextrakte eine konstante Expression der vier untersuchten Cysteinmutanten und dem WT-Mak16 auf. Im Vergleich zum Signal für Rpf1, wurde in allen Zellextrakten ein stärkeres Signal für Mak16 detektiert. Dies könnte durch den 3-fachen HA-Tag bei Mak16 im Gegensatz zum einzelnen Myc-Tag bei Rpf1 verursacht werden.

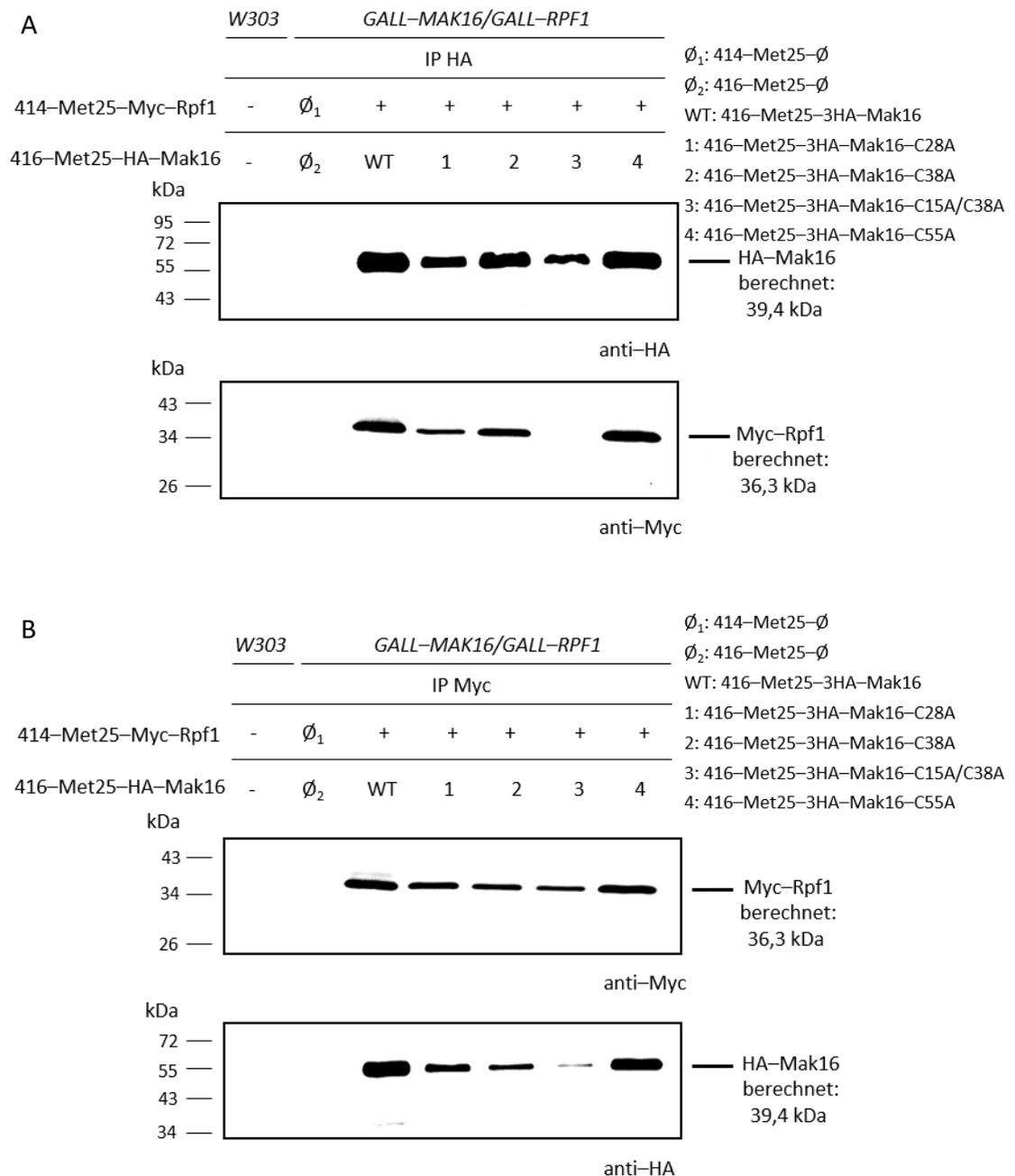


**Abbildung 53: Western-Blot-Analysen der Zellextrakte.**

40 µl des Gesamtzellextraktes wurden mit TCA gefällt und danach mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung der Antikörper, die unter dem jeweiligen Blot angegeben sind. Als Ladekontrolle diente Porin. Marker: Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10–250 kDa, NEB #7719). Dateiname: Western-Blot-Analysen der Zellextrakte.png.

## Ergebnisse

Auch in Abbildung 54 sind die Banden der Mak16-Varianten, unabhängig ob diese mit einem Myc- oder HA-Tag aufgereinigt wurden, stärker als die jeweils detektierten Rpf1-Banden zu erkennen. In allen untersuchten Proben konnte eine Anreicherung der Zielproteine gezeigt werden. So konnte bei der Koimmunopräzipitation an HA-Mak16 erfolgreich Rpf1 und umgekehrt an Myc-Rpf1 WT-HA-Mak16 nachgewiesen werden. In Abbildung 54 A zeigten die an WT-Mak16 und an der Cysteinmutante C55A gebundenen Rpf1-Proteine jeweils gleich starke Banden. Die Banden der assoziierten Rpf1-Proteine der Mak16-Cysteinmutanten C28A und C38A zeigten hingegen schwächere Banden und bei der Mak16 Doppel-Cysteinmutante C15A/C38A konnte kein gebundenes Rpf1 detektiert werden. Die Signale der Koimmunopräzipitation mittels HA-Beads an Mak16 aus Abbildung 54 A korrelieren mit den Signalen der Koimmunopräzipitation mittels Myc-Beads an Rpf1 in Abbildung 54 B. Zusammenfassend lässt sich die Komplexbildung von Mak16 und Rpf1 in allen hier untersuchten Zellen nachweisen, sowie die essentielle Rolle der Cysteine C28, C38 und C43, die als Clusterliganden agieren, aufzeigen. Eine Komplexdestabilisierung von Mak16 und Rpf1 konnte durch die Cysteinmutanten C28A, C38A sowie der Doppel-Cysteinmutante C15A/C38A gezeigt werden. Die Destabilisierung von Mak16 ist besonders deutlich bei der Doppel-Cysteinmutante C15A/C38A, durch die fehlende Anreicherung an Rpf1 (Abbildung 54), zu erkennen.

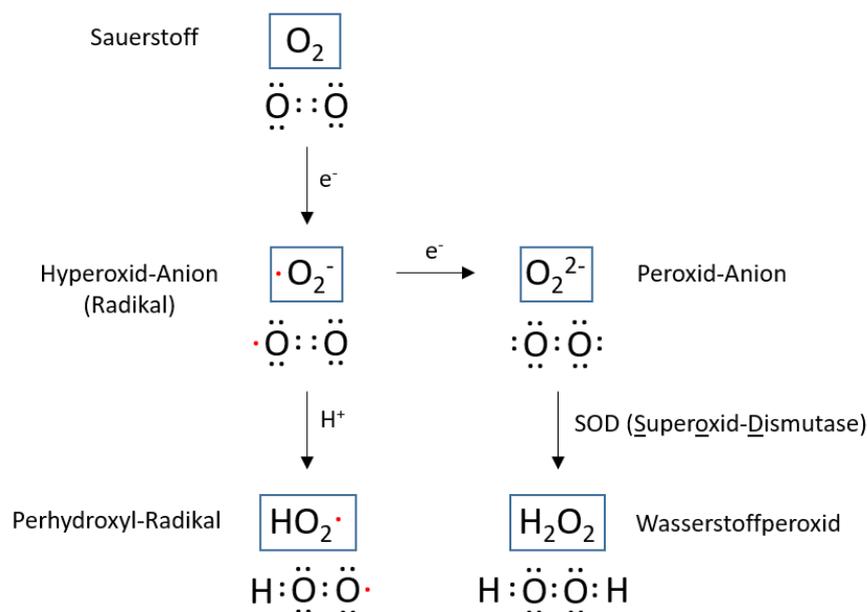


**Abbildung 54: Nachweis der Interaktion von Mak16 mit Rpf1 in vivo durch Koimmunopräzipitation.**

Die GALL-MAK16/GALL-RPF1 Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. (A+B) Die Zellen wurden 16 h über Nacht in glukosehaltigem SC-Medium unter Methioninzugabe (0,5 mM) kultiviert. A) Durch eine Koimmunopräzipitation (1 h, 4 °C) des Gesamtzellextraktes mit HA-Immunebeads (10 µl), SDS-PAGE und Western-Blot konnte die Protein-Protein-Bindung durch spezifische Antikörper gegen HA-Tag (HA-Mak16: 39,4 kDa, lokalisiert bei 55 kDa auf der SDS-PAGE) und Myc-Tag (Myc-Rpf1: 36,3 kDa) nachgewiesen werden. B) Durch eine Koimmunopräzipitation (1 h, 4 °C) des Gesamtzellextraktes mit Myc-Immunebeads (10 µl), SDS-PAGE und Western-Blot konnte die Protein-Protein-Bindung durch spezifische Antikörper gegen HA-Tag (HA-Mak16: 39,4 kDa, lokalisiert bei 55 kDa auf der SDS-PAGE) und Myc-Tag (Myc-Rpf1: 36,3 kDa) nachgewiesen werden. Marker: Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10–250 kDa, NEB #7719). Dateiname: Nachweis der Interaktion von Mak16 mit Rpf1(IP HA).png.

#### 4.2.5 Einfluss von Redox–Stressoren auf Hefe–Mak16

Zellen können verschiedensten Stresssituationen ausgesetzt sein, wie zum Beispiel Temperaturschwankungen, unterschiedlichen pH–Werten oder Exposition gegenüber toxischen Verbindungen. Um dem Stress entgegen zu wirken, entwickelten Zellen ausgeklügelte Überlebensmechanismen gegen die negativen Auswirkungen von Stress. Die wohl am besten untersuchtesten Stressbedingungen sind die gegenüber erhöhten Werten reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS).

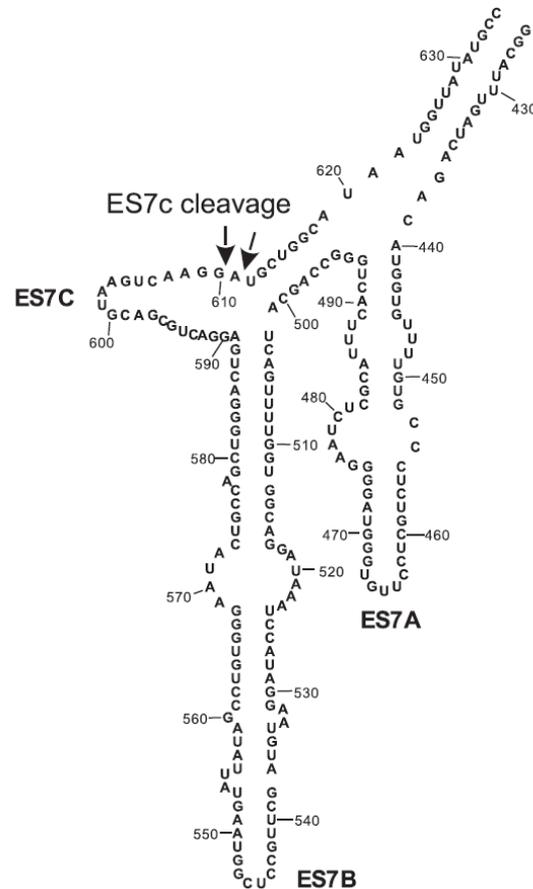


**Abbildung 55: Reaktive Sauerstoffspezies.**

Der Reaktionsweg der reaktiven Sauerstoffspezies zeigt die verschiedenen, generierten ROS. Ausgehend von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) wird durch Reduktion das hoch reaktive Hyperoxid–Anion Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) gebildet. Durch weitere Reduktions– und Protonierungsschritte wird das reaktive Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) generiert. Dateiname: Reaktive Sauerstoffspezies.png.

Diese sind für den sogenannten oxidativen Stress in der Zelle verantwortlich, spielen aber ebenfalls in niedrigen Konzentrationen eine wichtige Rolle im Organismus. Im Allgemeinen bieten sie Schutz vor eindringenden Krankheitserregern, sind an der Gewebereparatur und in der Kontrolle der Genexpression beteiligt. In hoher Konzentration entsteht ein Ungleichgewicht zwischen den reaktiven Sauerstoffspezies und der natürlichen antioxidativen Abwehr des biologischen Systems. Durch den oxidativen Stress wird die Zellapoptose eingeleitet, was zu einer umfassenden Fragmentierung von DNA führt und unter anderem auch zum Abbau der 25S und 5.8S rRNA führt. (Mroczek *et al.*, 2008). Genauere

Untersuchungen ergaben dabei eine Spaltung des Expansionssegments ES7c. ES7 ist die größte rRNA-Verlängerung der rRNA-Helix 25S und ist an der Oberfläche der 60S-ribosomalen Untereinheit lokalisiert. Die ES7 rRNA Verlängerung faltet sich zu einer hochkonservierten dreiteiligen Stamm-Schleifen-Struktur.



**Abbildung 56: Sekundärstruktur der rRNA ES7-Expansionsregion.**

Die Sekundärstruktur des ES7-Expansionssegmentes der 25S rRNA mit eingezeichneter ES7c-Spaltungsstelle bei dem Einfluss von oxidativen Stress (Shedlovskiy *et al.*, 2017). Dateiname: Sekundärstruktur der rRNA ES7-Expansionsregion.png.

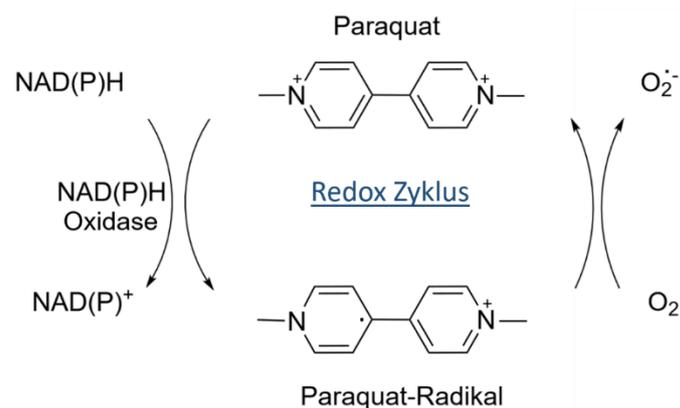
Aufgrund der Flexibilität und Zugänglichkeit bildet die ES7-rRNA-Verlängerung ein Andockbereich für mehrere Proteine, wie verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die ein wichtiger Bestandteil der Proteinbiosynthese sind (Gómez Ramos *et al.*, 2016). Durch Änderungen in der ES7-Konformation während des oxidativen Stresses kommt es zur ES7c-Spaltung und Öffnung, wodurch der Zugang für Nukleasen ermöglicht wird. Aufgrund der schnellen Kinetik dieser Spaltung bei ROS induzierten Hefezellen, kann der Verlust der Schleifenintegrität als früher und empfindlicher Biomarker für oxidativen Stress dienen. (Shedlovskiy *et al.*, 2017). Die Spaltung ist somit kein Teil des Zelltods, sondern führt zu einer

## Ergebnisse

erfolgreichen Anpassung an oxidativen Stress. Ein anderer Teil der ES7–Verlängerung, der ES7a–Stamm, wird bei der Ribosomenbiogenese durch das Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul stabilisiert (Kater *et al.*, 2017). Aufgrund der unmittelbaren Nähe der ES7–Verlängerung zu Mak16, sollte der Einfluss von Mak16 auf die Zelle unter Stressbedingungen beurteilt werden. Dafür wurde die Auswirkung von stressinduzierenden Chemikalien auf die Cysteinmutante C38A im Vergleich zu WT–Mak16 untersucht. Dadurch, dass in Mak16–depletierten Zellen Mak16–C38A das Wachstum nur teilweise komplementiert bzw. einen intermediären Phänotyp aufzeigt und die wichtige Rolle von Mak16 im Zellkern an der Reifung von der prä–rRNA bereits aufgezeigt wurde (Pellett *et al.*, 2006), soll unter Stressbedingungen die Spaltung der ES7–Verlängerung in direkter Interaktion mit Mak16 bewertet werden. Es wurde ein Screening mit verschiedenen stressinduzierenden Chemikalien, wie Paraquat, Dithiothreitol (DTT), anorganischem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Vitamin  $\text{K}_3$  (Menadion) durchgeführt. Dabei wurden die Cysteinmutante C38A und WT–Mak16 tragende Zellen mit Stress induziert und mit einem Tüpfeltest auf ihren Wachstumsphänotyp überprüft.

### 4.2.5.1 Paraquat

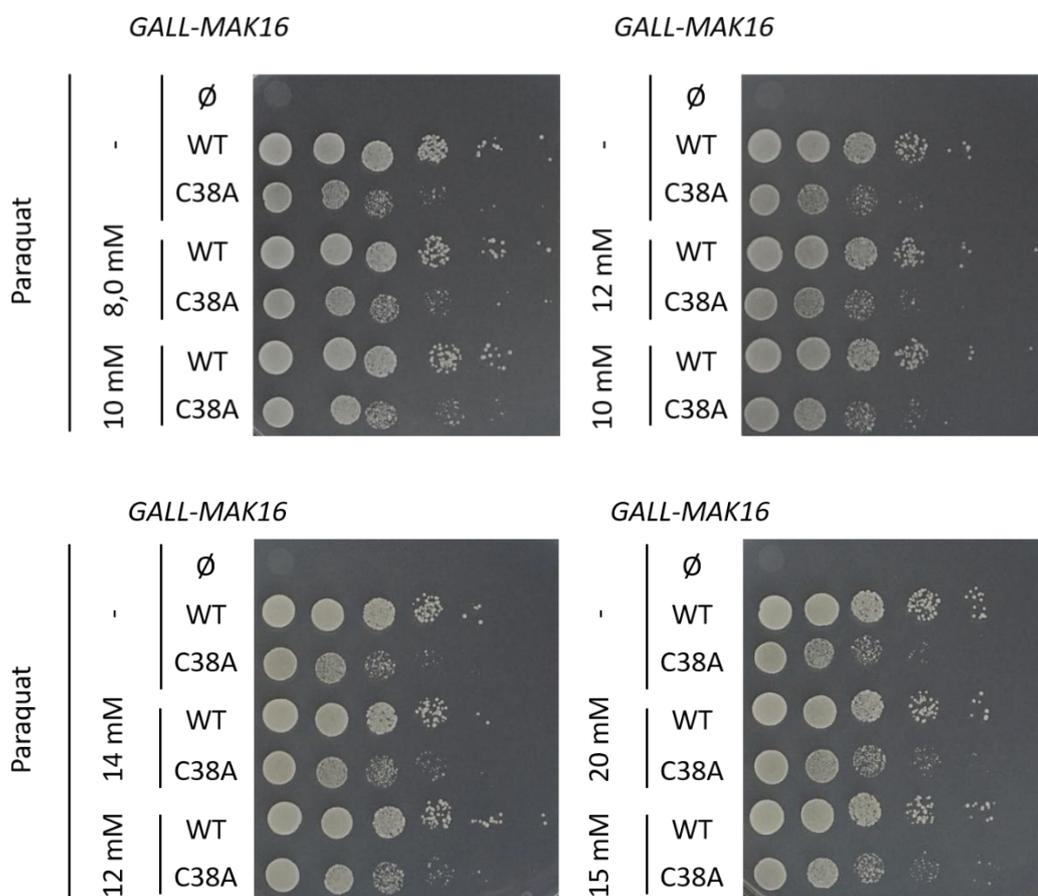
Paraquat ist eines der am häufigsten verwendeten Herbiziden der Welt. Während seines Metabolismus bei Exposition an Sauerstoff überträgt es ein Elektron an den molekularen Sauerstoff, was zur Superoxidbildung und anschließender Umwandlung in weitere reaktiven ROS führt (Lascano *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).



**Abbildung 57: Redox–Zyklus von Paraquat.**

Während des Redox–Zyklus durchläuft Paraquat eine Ein–Elektronen–Reduktion unter der Bildung eines Radikalkations. Unter aeroben Bedingungen reagiert dieses Radikal schnell mit molekularem Sauerstoff. Das dabei gebildete Hyperoxid–Anion kann in weiteren Reaktionen zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umgewandelt werden. Eigene Abbildung, nach Gray *et al.*, 2007. Dateiname: Redox–Zyklus von Paraquat.png.

Paraquat alleine konnte allerdings keine Spaltung des ES7c-rRNA Verlängerungssegments der 25S rRNA herbeiführen, im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Menadion (Vitamin K<sub>3</sub>) (Mroczek *et al.*, 2008). Anhand der Depletion von genomischen Mak16 kann die Auswirkung des induzierten Stresses auf die Zellen mit Mak16-Plasmidkopien bewertet werden. Zur Analyse wurden Tüpfeltests der Zellkulturen durchgeführt und als Wachstumskontrollen wurden bei allen Tüpfeltests das leere Plasmid (∅), der WT-Mak16 und die Mak16-Cysteinmutante C38A zunächst ohne Stressor getüpfelt. Anschließend folgten die Tüpfeltests von WT und C38A mit Stressoren in zunehmender Konzentration. In Abbildung 58 sind die Tüpfeltestergebnisse nach zweistündiger Paraquat Exposition gezeigt.



**Abbildung 58: Paraquat als Stressauslöser weist keinen Wachstumsdefekt auf.**

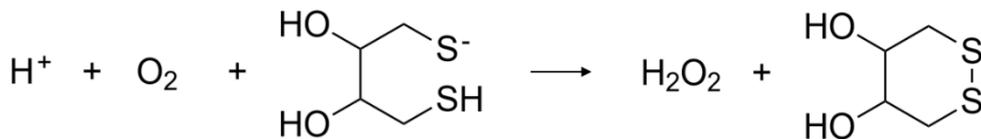
Mittels Tüpfeltest konnte kein Einfluss von Paraquat auf die Cysteinmutante festgestellt werden. Dafür wurden GALL-MAK16 Hefezellen mit folgenden Plasmiden p416-Met25 (∅), 416-NP-Mak16 (WT) und 416-NP-Mak16-C38A (C38A) transformiert. Übernachtskulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub>=0,2 verdünnt und für 2–3 h kultiviert. Nach dem Erreichen von einer OD<sub>600</sub>=0,4 wurden die Zellen mit Stress induziert und für weitere zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen seriell verdünnt und auf glukosehaltige SC-Agarplatten getüpfelt. Das Wachstum konnte nach zwei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C bewertet werden. Dateinamen: Paraquat als Stressauslöser 1.png, Paraquat als Stressauslöser 4.png.

## Ergebnisse

Ohne Stressoren kann die WT-*MAK16* Plasmidkopie das fehlende chromosomale *MAK16* vollständig komplementieren, während die Cysteinmutante C38A wie erwartet ein schwächeres Wachstum aufwies. Das leere Plasmid kann das fehlende chromosomale *MAK16* nicht komplementieren. Es wurden Paraquat-Konzentrationen von 8,0 mM bis 20 mM getestet. Dabei konnte weder bei einer niedrigen noch bei einer hohen Konzentration eine stärkere Beeinträchtigung des Zellwachstums beobachtet werden.

### 4.2.5.2 Dithiothreitol

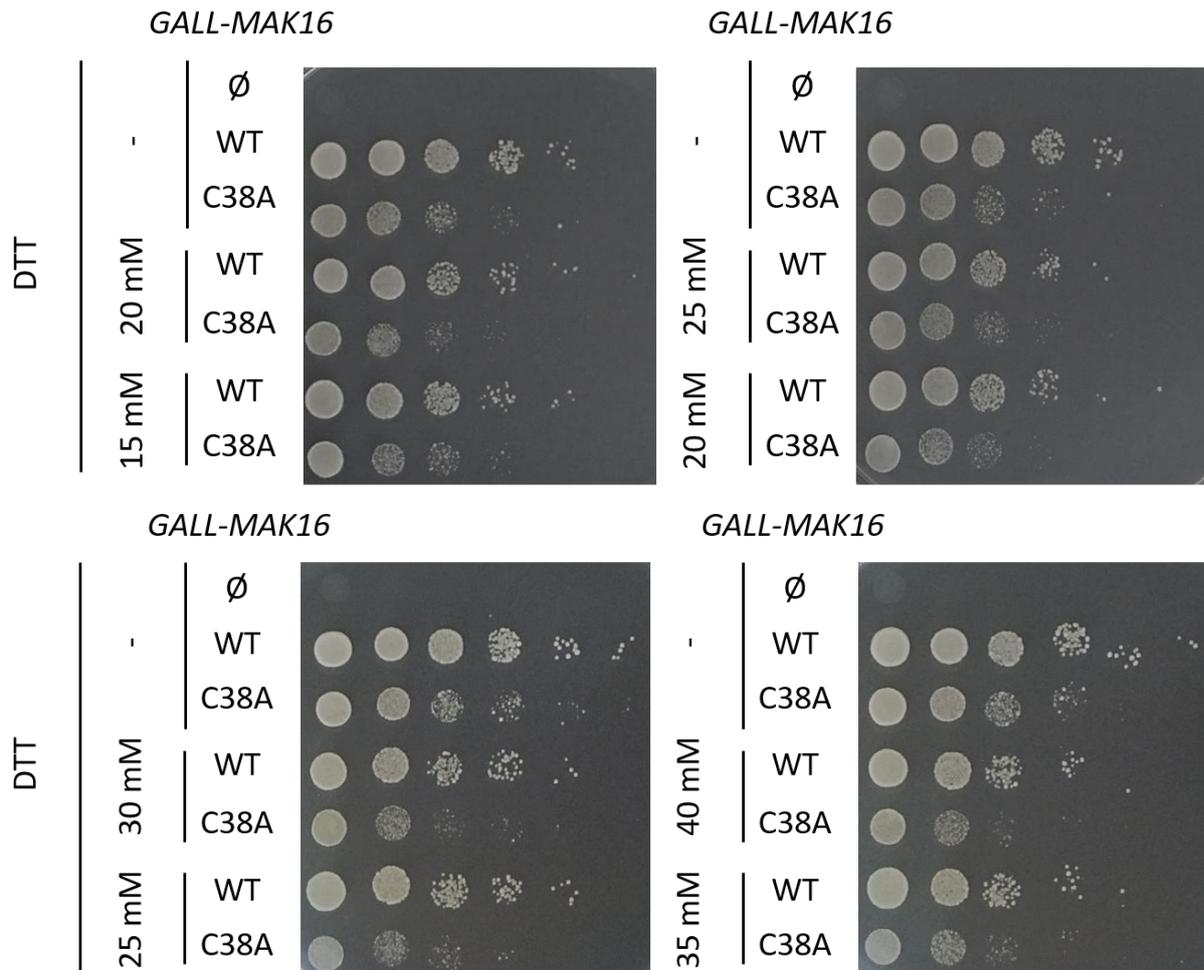
Dithiothreitol (DTT) ist ein starkes Reduktionsmittel, welches an Luft unter Abgabe eines Elektrons oxidiert wird und dabei ein Superoxidanion und  $H_2O_2$  generiert. Ein hoher Gehalt an  $H_2O_2$  in der Zelle kann zu einer fehlerhaften Proteinfaltung und zu einer 25S rRNA Fragmentierung führen. (Cho *et al.*, 2005; Visentin *et al.*, 2016; Mroczek *et al.*, 2008).



**Abbildung 59: Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT).**

Durch die Reaktion von Dithiothreitol mit Sauerstoff wird Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) generiert. Dateiname: Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT).png.

Die folgenden Tüpfeltests wurden analog zu dem Paraquat-Expositionsassay durchgeführt. Dabei wurden Zellen mit der WT-Mak16 und der Mak16-C38A Cysteinmutanten-Plasmidkopie mit aufsteigenden DTT-Konzentrationen behandelt und auf SC-Agarplatten getüpfelt. DTT als Stressor zeigt bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 15 mM bis 40 mM nur einen sehr geringen Wachstumsdefekt auf die Mak16-Cysteinmutantenzellen. Im Vergleich zu dem Cysteinmutantenzellwachstum ohne Stresseinfluss konnte ab einer Konzentration von 25 mM DTT ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden. Diese Daten vermitteln dennoch keinen generellen Einfluss von Mak16 auf eine Redox-Stressantwort in den Zellen. Die Tüpfeltestergebnisse sind in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60: Dithiothreitol zeigt einen dosisabhängigen Wachstumsdefekt auf die Zellen.**

Es wurden GALL-MAK16 Hefezellen mit folgenden Plasmiden p416-Met25 ( $\emptyset$ ), 416-NP-Mak16 (WT) und 416-NP-Mak16-C38A (C38A) transformiert. Übernachtskulturen wurden auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und für 2–3 h kultiviert. Nach dem Erreichen von einer  $OD_{600} = 0,4$  wurden die Zellen mit Stress induziert und für weitere zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen seriell verdünnt und auf glukosehaltige SC-Agarplatten getüpfelt. Das Wachstum konnte nach zwei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C bewertet werden. Dateinamen: DTT als Stressauslöser 1.png, DTT als Stressauslöser 2.png.

## Ergebnisse

### 4.2.5.3 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ist ein Mitglied der ROS-Familie. Es ist ein starkes Zwei-Elektronen-Oxidationsmittel, das mit Eisen in der Fenton-Reaktion sehr reaktive Hydroxyl-Radikale bildet.  $\text{H}_2\text{O}_2$  verstärkt die Akkumulation von ROS in Hefe und veranlasst die Zellapoptose (Roscoe *et al.*, 2020). In Abbildung 61 ist die Fenton- sowie die Haber-Weiss-Reaktion aufgezeigt.

Reduktion von Eisen<sup>(III)</sup> durch das Hyperoxid-Anion



Fenton-Reaktion



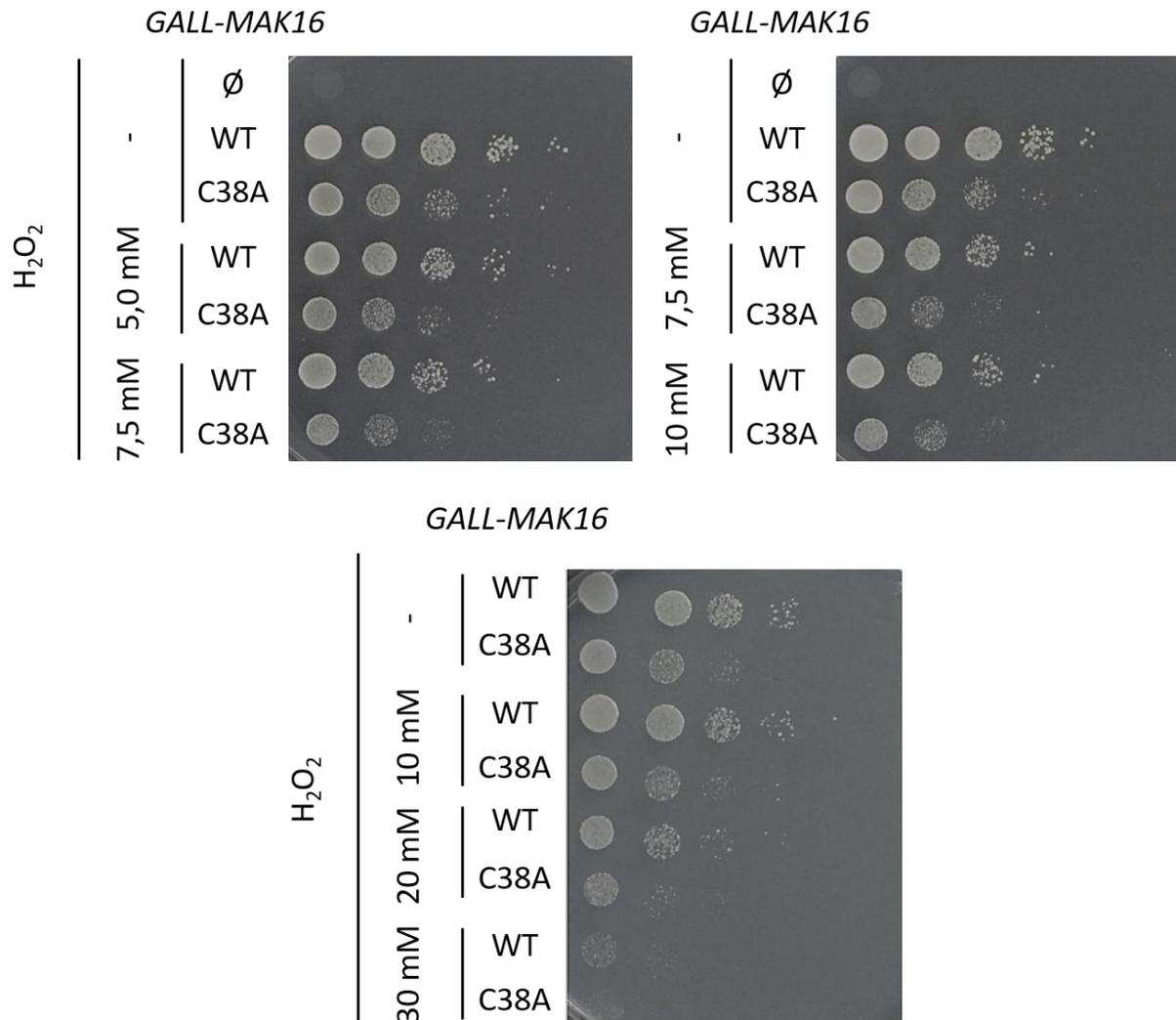
Haber-Weiss-Reaktion



**Abbildung 61: Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion.**

Durch die Reaktion von Eisen(III)-Ionen mit Hyperoxid-Anionen entstehen die für die Fenton-Reaktion benötigten Eisen(II)-Ionen, welche mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  das hoch reaktive Hydroxyl-Radikal bilden (Kehrer, 2000). Dateinamen: Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion.png.

Um das Zellwachstum nach Exposition mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu untersuchen, wurden analog zu den vorherigen Assays Tüpfeltests durchgeführt. Dabei wurde eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 5,0 mM bis 30 mM getestet.

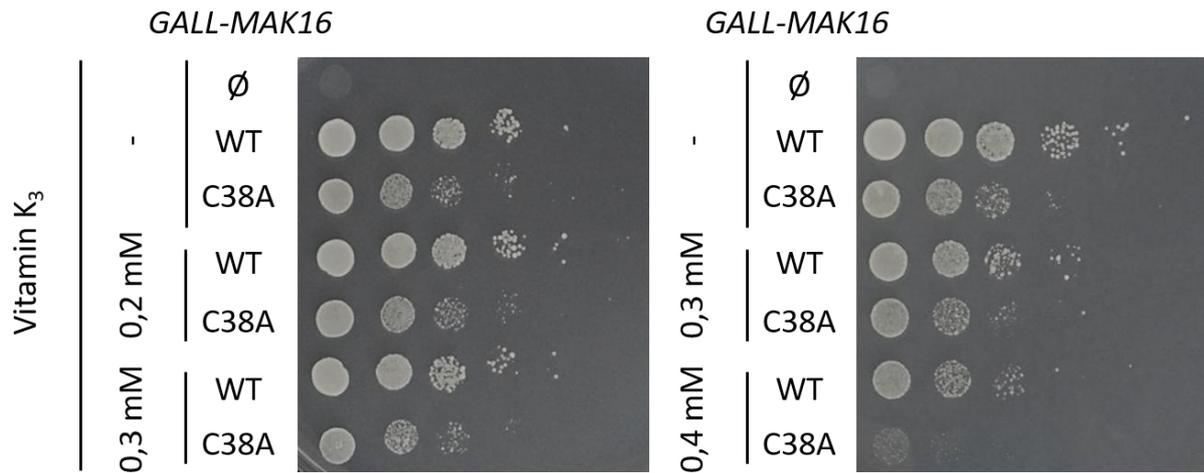


**Abbildung 62: Wasserstoffperoxid zeigt einen leichten Wachstumsdefekt auf die Zellen.**

Es wurden *GALL-MAK16* Hefezellen mit folgenden Plasmiden *p416-Met25* ( $\emptyset$ ), *416-NP-Mak16* (WT) und *416-NP-Mak16-C38A* (C38A) transformiert. Übernachtskulturen wurden auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und für 2–3 h kultiviert. Nach dem Erreichen von  $OD_{600} = 0,4$  wurden die Zellen mit Stress induziert und für weitere zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen seriell verdünnt und auf glukosehaltige SC-Agarplatten getüpfelt. Das Wachstum konnte nach zwei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C bewertet werden. Dateinamen:  $H_2O_2$  als Stressauslöser 1.png,  $H_2O_2$  als Stressauslöser 2.png.

Wie in Abbildung 62 gezeigt, komplementierten Zellen mit transformierter C38A Cysteinmutante ab einer Dosis von 7,5 mM  $H_2O_2$ , den Phänotyp nur noch teilweise. Ab einer Konzentration von 20 mM  $H_2O_2$ , konnte der WT das Wachstum der WT-Kontrolle ohne Stressor nicht mehr erreichen. Bei einer Endkonzentration von 30 mM  $H_2O_2$  konnten weder die Cysteinmutanten-Plasmidkopien noch die WT-Plasmidkopien das Zellwachstum komplementieren. Diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass bei einer Stressinduktion durch  $H_2O_2$  die 25S rRNA Spaltung in der ES7c-Region ausgelöst und die rRNA

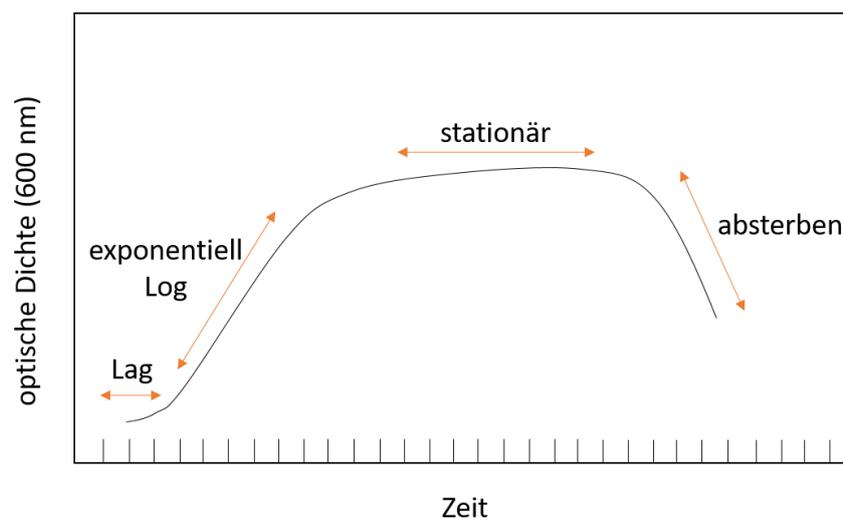




**Abbildung 64: Vitamin K<sub>3</sub> zeigt einen Wachstumsdefekt auf die Zellen.**

Es wurden GALL-MAK16 Hefezellen mit folgenden Plasmiden p416-Met25 (Ø), 416-NP-Mak16 (WT) und 416-NP-Mak16-C38A (C38A) transformiert. Übernachtskulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub>= 0,2 verdünnt und für 2–3 h kultiviert. Nach dem Erreichen von OD<sub>600</sub>= 0,4 wurden die Zellen mit Stress induziert und für weitere zwei Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen seriell verdünnt und auf glukosehaltige SC-Agarplatten getüpfelt. Das Wachstum konnte nach zwei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C bewertet werden. Dateinamen: Vitamin K als Stressauslöser.png.

Um den dosisabhängigen inhibitorischen Charakter von Vitamin K<sub>3</sub> besser zu demonstrieren, ist es wichtig nicht nur die 30-Stunden-Endpunktwerte des Tüpfeltests zu betrachten, sondern ebenso die Wachstumskurve über einen gewissen Zeitraum zu verfolgen (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Verlauf einer typischen Hefewachstumskurve.**

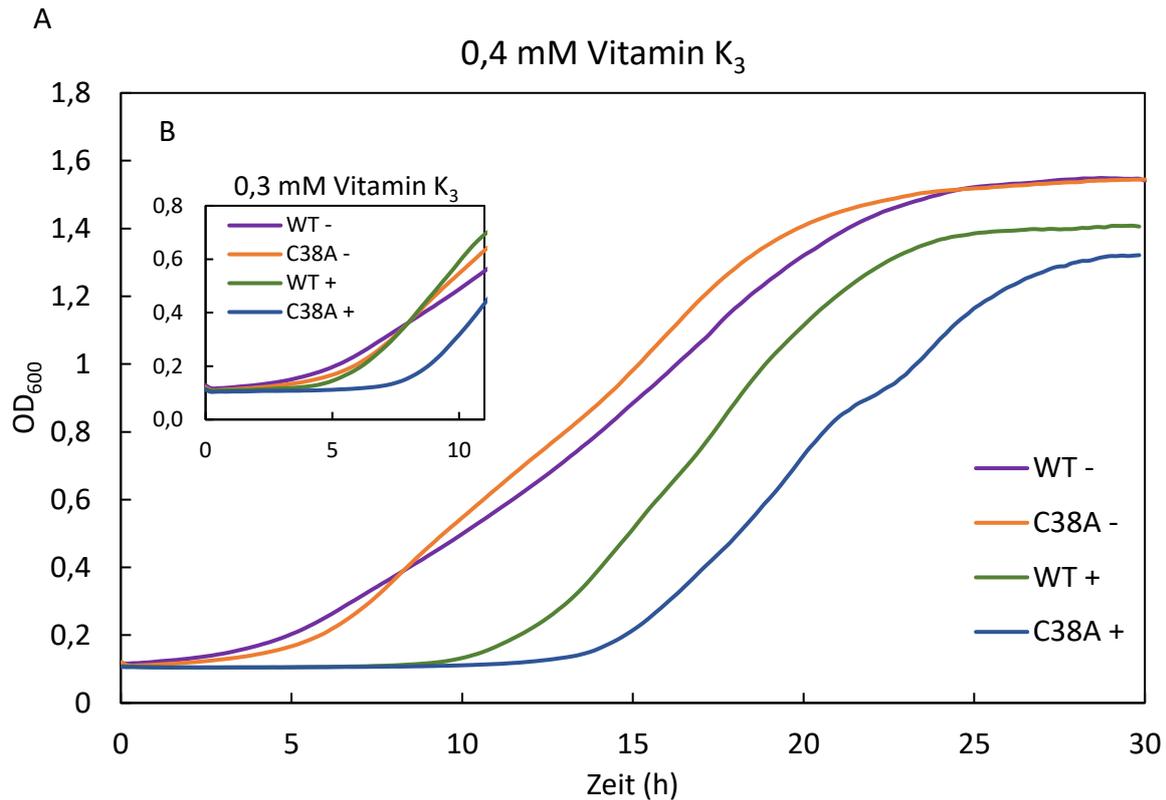
Typischer Verlauf der Wachstumskurve von *S. cerevisiae* in Vollmedium bei 37 °C unterteilt in vier Phasen: Lag-, Log-(exponentielle), stationäre-Phase und Absterbephase. Dateiname: Verlauf einer typischen Hefewachstumskurve.png.

## Ergebnisse

Das Wachstum von *S. cerevisiae* Hefe kann in vier Phasen eingeteilt werden. Während der ersten Phase, der Lag-Phase, tritt kein bzw. kaum Wachstum auf, da sich die Zellen ihrer neuen Umgebung erst anpassen müssen. Darauf folgt die logarithmische Wachstumsphase, die Log-Phase, in der die Zellen exponentiell wachsen. In dieser Phase liegen die Nährstoffe im Verhältnis zu der Zellanzahl im Überschuss vor. Die dritte Phase ist die stationäre Phase, in der sich das Zellwachstum aufgrund zunehmend anfallenden Abfalls aber steigender Population stabilisiert. In der letzten Phase beginnen die Zellen abzusterben, was auf einen vollständigen Substratverbrauch und Überpopulation zurückzuführen ist.

Um das Wachstum der gestressten Zellen verfolgen zu können, erfolgte die Messung der optischen Dichte in einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 630 \text{ nm}$ . Dafür wurden die in Glukose depletierten Zellen entweder mit oder ohne den Stressor Vitamin  $K_3$  inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Wachstumskurven sind in der Abbildung 66 dargestellt. Im Einsatzbild (Abbildung 66 (B)) zeigten die Proben WT -, C38A - und WT + bereits nach 5 Stunden eine Anpassung an die Umgebung, während die Probe C38A + eine längere Lag-Phase zeigte und die Log-Phase erst nach 7 Stunden erreichte. Bei einer Konzentration von 0,4 mM Vitamin  $K_3$  zeigten die Proben WT - und C38A - einen vergleichbaren Wachstumsverlauf wie bei einer Vitamin  $K_3$ -Konzentration von 0,3 mM (Abbildung 66 (A)). Die Lag-Phase der Proben WT + und C38A + hatten sich hingegen deutlich verlängert. Die Probe WT + erreichte die Log-Phase nach ca. 10 und die Probe C38A + nach 13 Stunden.

Die Wachstumskurven der Proben WT - und C38A - zeigten eine maximale  $OD_{600}$  von 1,8 während der Stationären-Phase. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Tüpfeltests, konnten die Proben WT + und C38A + dieses Maximum an Wachstum nicht erreichen. Nach ca. 25 Stunden hatten die Zellen der Proben WT -, C38A - und WT + die Stationäre-Phase erreicht, wohingegen die Probe C38A + erst nach 28 Stunden die diese erreichten.



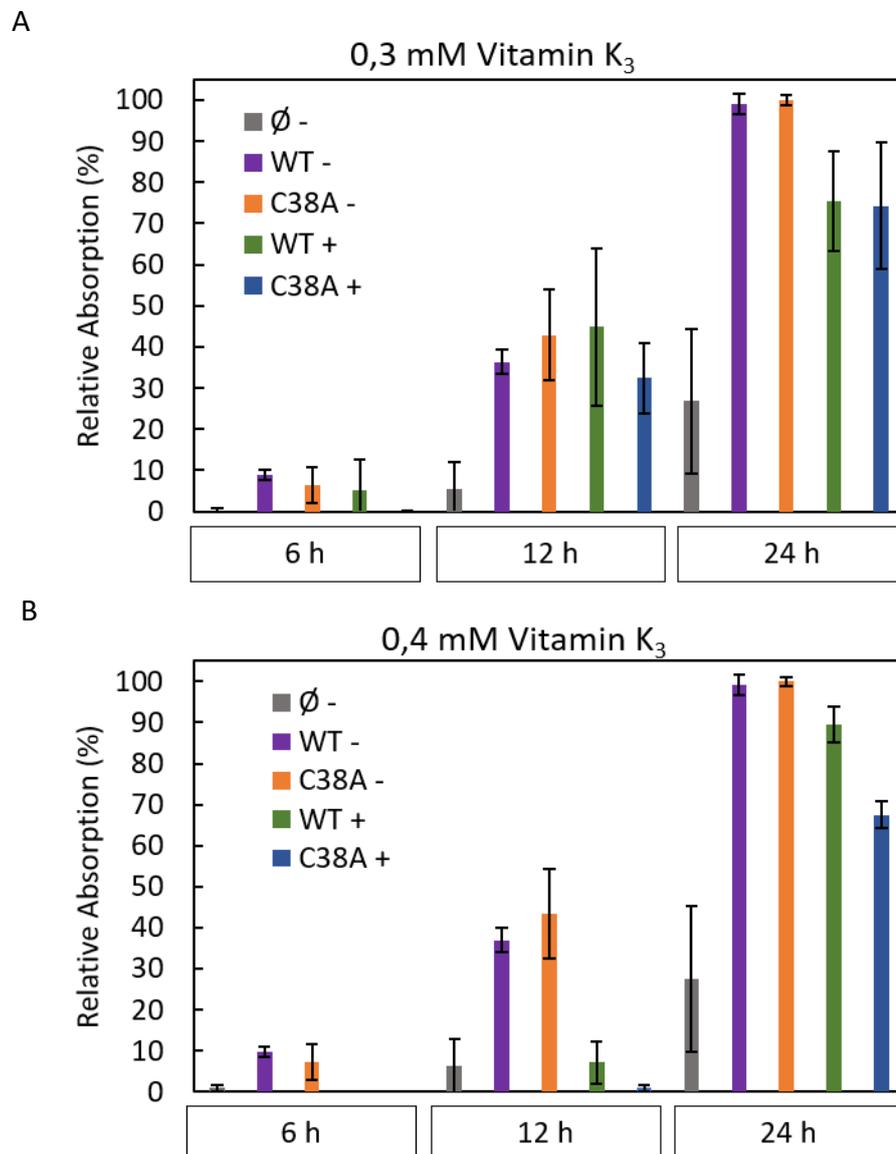
**Abbildung 66: Dosisabhängige Wachstumskurve von GALL-MAK16 mit und ohne Vitamin K<sub>3</sub>.**

Es wurden Übernachtskulturen vom galaktose-regulierbaren GALL-MAK16-Stamm mit folgenden Plasmiden 416-NP-Mak16 (WT) und 416-NP-Mak16-C38A (C38A) hergestellt und in Glukose für 16 h depletiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 in frischem glukosehaltigem Medium inokuliert und zwei bis drei Stunden bis zur Mid-Log-Phase zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit und ohne dem Stressor Vitamin K<sub>3</sub> für weitere zwei Stunden kultiviert. Daraufhin wurden Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geerntet und gewaschen. Die Zellen wurde 5-fach verdünnt, um eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 zu erhalten. Die Proben wurden in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert und in dem Mikroplattenreader BioTek ELx88 alle 10 min bei  $\lambda = 630 \text{ nm}$  und 30 °C vermessen, nachdem sie zuvor drei Sekunden geschüttelt wurden. Die Wachstumskurven wurden aus den Messdaten der Gen5-Software visualisiert. (A) Wachstumskurvenvergleich von WT-Mak16 und Mak16-Cysteinmutantenzellen bei einer Vitamin K<sub>3</sub>-Konzentration von 0,3 mM (B, Einsatzbild) und 0,4 mM. Legende= -: ohne Stressor, +: mit Stressor. Dateinamen: Dosisabhängige Wachstumskurve Vitamin K3.png.

Für eine bessere Übersicht wurde in der Abbildung 67 A und B die relative Absorption, gemessen an der höchsten Absorption der unbehandelten Mutantenzellen (C38A-, 100 %), zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Dadurch lässt sich der Einfluss von Vitamin K<sub>3</sub> als Stressor nach 6, 12 und 24 Stunden bei Konzentrationen von 0,3 mM oder 0,4 mM vergleichen.

## Ergebnisse

Es ist deutlich zu sehen, dass die Konzentration von 0,4 mM Vitamin K<sub>3</sub> einen stärkeren Einfluss auf die Cysteinmutante C38A als auf den WT hatte (Abbildung 67 B, 12 und 24 h).



**Abbildung 67: Relative Absorption von GALL-MAK16 nach 6, 12 und 24 Stunden.**

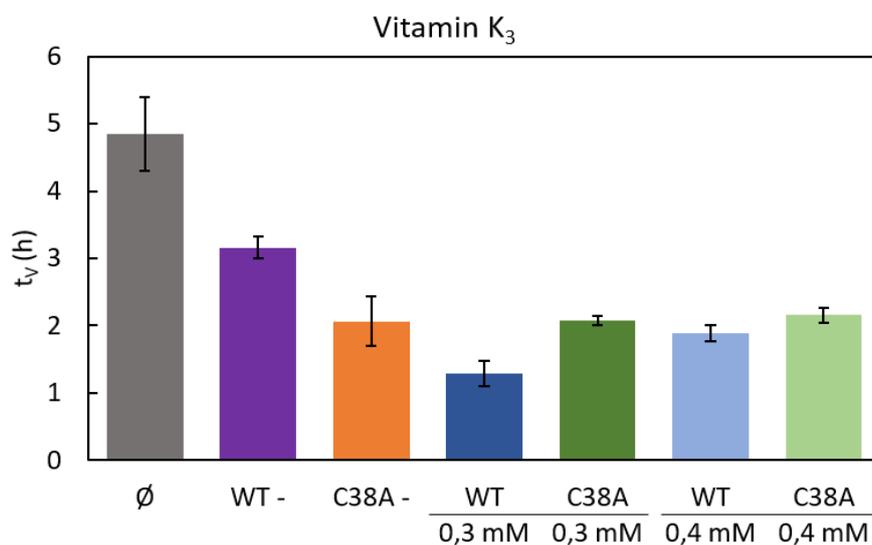
Die Datenpunkte bei 6, 12 und 24 Stunden nach 0,3 mM (A) und 0,4 mM (B) Vitamin K<sub>3</sub> Zugabe, wurden berechnet und relative zu einer 24 Stundenprobe ohne Stressor als 100 % aufgetragen. Dateinamen: Relative Absorption 0,3mM Vitamin K3.png, Relative Absorption 0,4mM Vitamin K3.png.

Unter optimalen Bedingungen besitzen *E. coli* Bakterien eine Generationszeit (Verdopplungszeit) von ca. 20 Min (0,3 h), während die optimale Verdopplungszeit bei *S. cerevisiae* Hefe in Vollmedium ca. 1,5 h und in Minimalmedium ca. 2,3 h beträgt (Sherman, 2002). In Tabelle 44 und in Abbildung 68 wurden die Verdopplungszeiten der stressinduzierten und nicht-stressinduzierten Zellen miteinander verglichen.

Die Verdopplungszeit der Zellen ohne Mak16 ( $\emptyset$  –) weisen mit  $4,8 \pm 0,5$  h die längste Verdopplungszeit auf, welche im Einklang mit der Erwartung liegt. Die Verdopplungszeit von WT–Mak16 ohne Vitamin K<sub>3</sub> liegt bei  $3,2 \pm 0,2$  h, wohingegen sich die C38A–Mak16 Mutantenzellen ohne Vitamin K<sub>3</sub>–Einfluss mit einer Verdopplungszeit von  $2,1 \pm 0,4$  h etwas schneller verdoppeln. Die kürzeste Verdopplungszeit besitzen die WT–Mak16 Zellen, die mit 0,3 mM Vitamin K<sub>3</sub> behandelt wurden, mit  $1,3 \pm 0,2$  h, wohingegen die C38A–Mak16 Mutantenzellen die mit 0,3 mM Vitamin K<sub>3</sub> behandelt wurden, eine Verdopplungszeit von  $2,1 \pm 0,1$  h aufwiesen. Der Einfluss von 0,4 mM Vitamin K<sub>3</sub> auf WT– und C38A–Mak16 Zellen liefert ähnliche Verdopplungszeiten von  $1,9 \pm 0,1$  h und  $2,2 \pm 0,1$ .

**Tabelle 44: Berechnete Verdopplungszeiten der mit Vitamin K<sub>3</sub> behandelten Zellen**

Zellkultur (in Glukose nach 16 h)		Verdopplungszeit $t_v$ (h)
1.	$\emptyset$ –	$4,8 \pm 0,5$
2.	WT –	$3,2 \pm 0,2$
3.	C38A –	$2,1 \pm 0,4$
4.	WT mit Vitamin K <sub>3</sub> [0,3 mM]	$1,3 \pm 0,2$
5.	C38A mit Vitamin K <sub>3</sub> [0,3 mM]	$2,1 \pm 0,1$
6.	WT mit Vitamin K <sub>3</sub> [0,4 mM]	$1,9 \pm 0,1$
7.	C38A mit Vitamin K <sub>3</sub> [0,4 mM]	$2,2 \pm 0,1$



**Abbildung 68: Berechnete Verdopplungszeit von mit Vitamin K<sub>3</sub> stressinduzierten Zellen.**

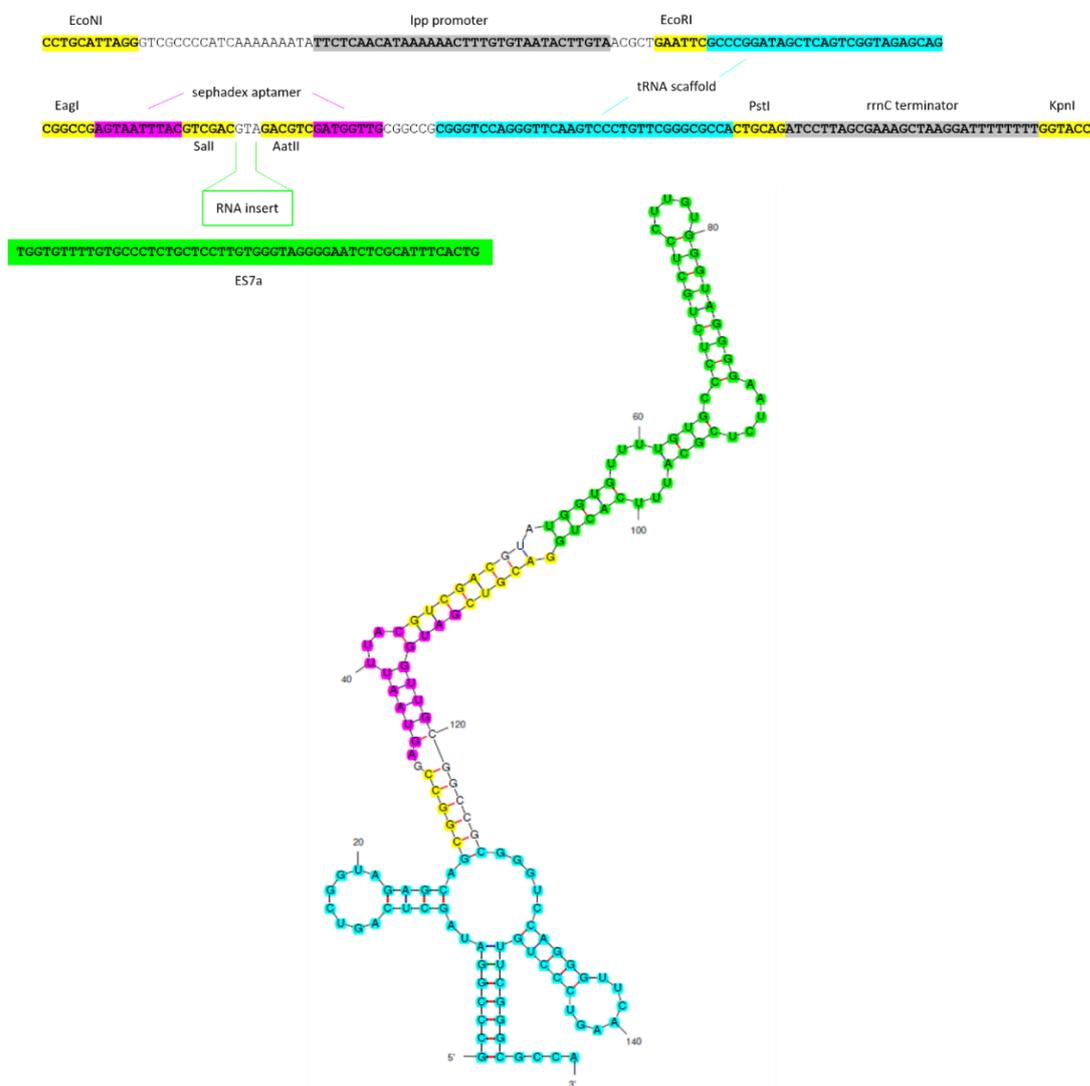
Die Zellen wurden 16 h in glukosehaltigem Medium depletiert, am nächsten Tag auf eine OD<sub>600</sub> von 0.2 verdünnt und für 2–3 h kultiviert, um die mittlere logarithmische Phase von OD<sub>600</sub> von 0,4 zu erreichen. Die Zellen wurden mit oder ohne Vitamin K<sub>3</sub> behandelt und für 2 h kultiviert. Zellen einer OD<sub>600</sub>: 0,5 wurden geerntet und mit Wasser gewaschen und mit SC-Medium mit Glukose 5-fach verdünnt, um eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen mit dem Plattenlesegerät BioTek ELx808 alle 10 min, nach 3 Sekunden schütteln, bei einer OD<sub>630</sub> und 30 °C Wachstumstemperatur gemessen. Die Verdopplungszeit wurde aus dem Datensatz der Gen5-Software berechnet. Dateiname: Verdopplungszeit von stressinduzierten Zellen.png.

### 4.3 rRNA–Interaktion zwischen dem rRNA–Expansionssegment ES7a und dem Mak16–Modul

Aufgrund von Kryo–EM–Strukturen konnte Mak16 als Protein mit direktem Kontakt zu dem rRNA–Expansionssegment ES7a identifiziert werden (Kater *et al.*, 2017). Im Folgenden wurde die Interaktion zwischen dem rRNA–Expansionssegment ES7a und dem Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul untersucht.

#### 4.3.1 Isolierung des rRNA–Expansionssegments ES7a

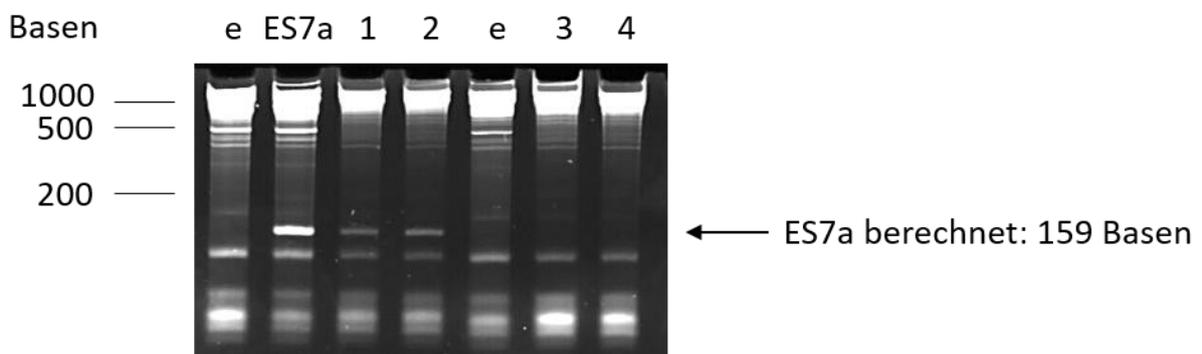
Für die Untersuchung der rRNA–Protein Interaktion, wurde die entsprechende rRNA–Sequenz von ES7a in den pCDF–Vektor kloniert (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Klonierungsschema und RNA–Faltvorhersage von ES7a in pCDF–Duet Vektor.**

Klonierungsschema des rRNA–Segmentes ES7a in pCDF–Duet. Eigene Abbildung nach Ponchon *et al.*, 2009. Die RNA–Faltvorhersage der Sekundärstruktur wurde mittels „mFold“–Software erstellt nach Zuker, 2003. Dateiname: Klonierungsschema und RNA–Faltvorhersage von ES7a in pCDF–Duet Vektor.png.

Dieser gehört ebenfalls zur Duet-Vektor Familie und ist somit kompatibel mit dem pETDuet-1-Vektor. Um das komplette Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul zusammen mit der rRNA ES7a isolieren zu können, musste im ersten Schritt eine erfolgreiche Überexpression und Isolierung der rRNA gewährleistet sein. Dafür wurden in einem ersten Versuch *E. coli* Zellen mit dem pCDF-ES7a Vektor und ohne diesen Vektor exprimiert und mit der RETSCH-Methode aufgeschlossen (Kapitel 3.5.2). Anschließend wurde die rRNA mittels RNA-Isolierungsmethode aufgereinigt und mittels UREA-Acrylamidgel nachgewiesen (Kapitel . Nach erfolgreicher Überexpression der rRNA ES7a wurde das Expansionssegment ES7a mit *MAK16* und *RPF1<sub>58-295</sub>* sowie mit dem kompletten Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul bestehend aus den Genen *MAK16*, *RPF1<sub>58-295</sub>*, *RRP1* und *NSA1* koexprimiert. In der Abbildung 70 wird das Acrylamidgel mit den RNA-Proben gezeigt. Als Kontrollen wurden die isolierten RNAs der Lysatproben von Zellen ohne Plasmid (e: *empty* (leer)) und mit ES7a-Plasmid (ES7a, 159 Basen) aufgetragen. In den Proben 1 und 2, His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> + ES7a und His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Rrp1/Nsa1 + ES7a, konnte eine passende Bande für das rRNA-Expansionssegment ES7a erfolgreich nachgewiesen werden. Zum Vergleich konnte in den Proben drei und vier, His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> und His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Rrp1/Nsa1, keine passende Bande für ES7a-rRNA detektiert werden.

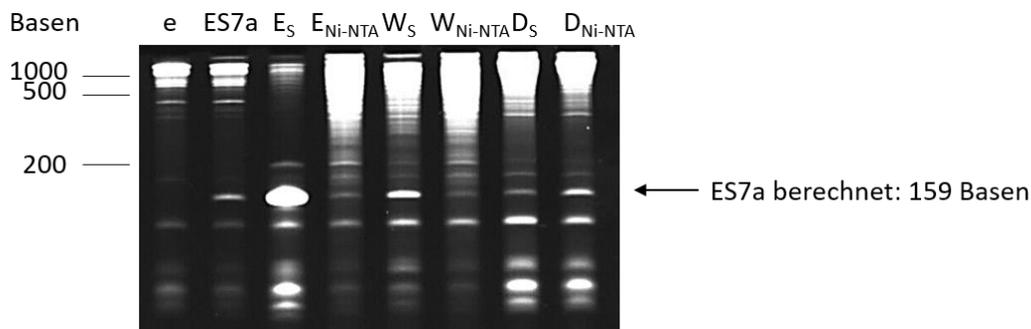


**Abbildung 70: Nachweis des ES7a-Expansionssegmentes der 25S rRNA im Lysat.**

Das Acrylamidgel (10 %) zeigt die mit der TriReagent®-Methode isolierte RNA. Es wurden folgende Proben aufgetragen: ohne Plasmid (e), mit pCDF-ES7a Plasmid (ES7a), His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> +ES7a (1), His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Rrp1/Nsa1+ES7a (2), His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> (3), His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Rrp1/Nsa1 (4). Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder (200–6000 bp, ThermoFisher SM1821). Dateiname: Nachweis des ES7a-Expansionssegmentes der 25S rRNA im Lysat.png.

## Ergebnisse

Nachdem die ES7a-rRNA erfolgreich im Überstand nachgewiesen wurde, wurde im nächsten Schritt die Bindung zwischen dem Proteinkomplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> und dem rRNA-Expansionssegment ES7a weiter untersucht werden. Dies sollte auf zwei unterschiedlichen Wegen realisiert werden. Zum einen sollte die Bindung der rRNA an den Mak16-Rpf1-Komplex mittels Sephadex G-200 als Säulenmaterial nachgewiesen werden (Ponchon *et al.*, 2007). Dabei bindet die rRNA mit ihrem Sephadex-Aptamer-Bereich an das Säulenmaterial und bei einer Bindung von ES7a zum Mak16-Komplex müsste dieser im Eluat (E<sub>S</sub>) nachgewiesen werden können. Zum anderen wurde als Säulenmaterial Ni-NTA-Agarose verwendet, um den Mak16-Komplex zu binden und um anschließend die an den Proteinkomplex gebundene rRNA im Eluat (E<sub>Ni-NTA</sub>) nachzuweisen. In Abbildung 71 wurden die Ergebnisse der beiden Aufreinigungsmethoden mittels Acrylamidgel visualisiert. Durch die Aufreinigung mittels Sephadex G-200, wird die RNA stark gebunden und liegt angereichert in der Eluatprobe (E<sub>S</sub>) vor. In der Eluatprobe der Ni-NTA Aufreinigung (E<sub>Ni-NTA</sub>) konnte die ES7a-rRNA hingegen nur schwach detektiert werden.



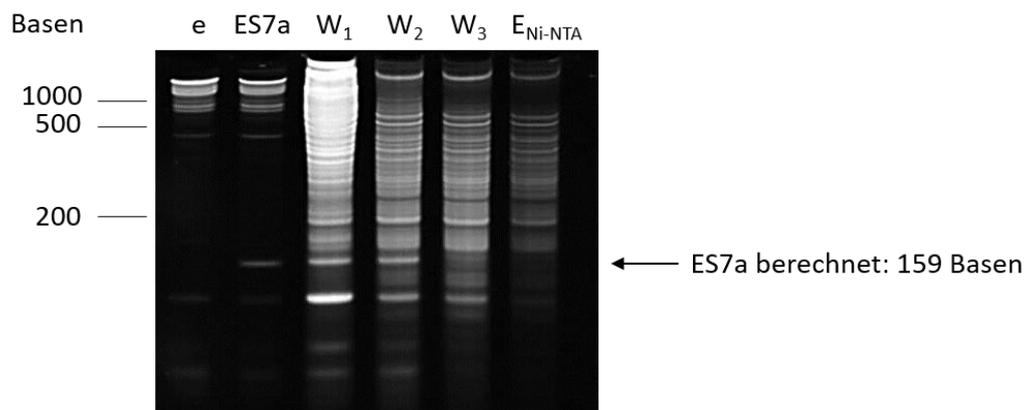
**Abbildung 71: Nachweis des ES7a-Expansionssegments im Eluat der aufgereinigten Proteine.**

Das Acrylamidgel (10 %) zeigt die mit TRIZOL isolierte und aufgereinigte RNA von Proben während und nach zwei Reinigungsverfahren. S: Nach dem Zellaufschluss wurde die RNA mittels Sephadex G-200 gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Ni-NTA: Nach dem Zellaufschluss wurden die Proteine an Ni-NTA gebunden, gewaschen und eluiert. Es wurden folgende Proben aufgetragen: ohne Plasmid (e), mit pCDF-ES7a Plasmid (ES7a), Sephadex-Eluat (E<sub>S</sub>), Ni-NTA-Eluat (E<sub>Ni-NTA</sub>), Sephadex-Waschfraktion (W<sub>S</sub>), Ni-NTA-Waschfraktion (W<sub>Ni-NTA</sub>), Sephadex-Durchlauf (D<sub>S</sub>), Ni-NTA-Durchlauf (D<sub>Ni-NTA</sub>). Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder (200– 6000 bp, ThermoFisher SM1821). Dateiname: Nachweis des ES7a-Expansionssegmentes der 25S rRNA im Eluat.png.

Bei genauer Betrachtung der Durchfluss- und Waschproben beider Isolierungsmethoden mittels Acrylamidgel, konnte auch in diesen ein Signal bei 159 Basen detektiert werden. Nach der Isolierung mittels Sephadex-Agarose, konnte in der Eluatprobe die stärkste Bande in einer

Höhe, die passend zum ES7a rRNA–Segment (159 Basen) ist, beobachtet werden. Eine geringe Menge wurde in der Durchflussprobe detektiert, was auf eine ausgelastete Säulenkapazität hindeutet. Aufgrund dieser ausgereizten Kapazität konnte auch in der Waschfraktion das ES7a rRNA–Segment bei einer Größe passend zu 159 Basen detektiert werden. Die Durchflussprobe der Ni–NTA–Agaroseaufreinigung zeigte die intensivste Bande und die Wasch- und Eluatfraktionen zeigten schwächere, aber dennoch deutliche Banden bei einer Größe von 159 Basen (Abbildung 71).

Um die Bindung der ES7a rRNA an das Modul nach Ni–NTA–Agaroseaufreinigung genauer beurteilen zu können, wurden weitere Waschschrte des Ni–NTA–Eluats durchgeführt (Abbildung 72). Nach dem dritten Waschschrte konnte kein Signal für die ES7a rRNA bei einer Größe von 159 Basen detektiert werden. Dieser Versuch konnte keine deutliche Bindung zwischen der rRNA ES7a und dem Mak16–Komplex nach der Ni–NTA–Agaroseaufreinigung aufzeigen.



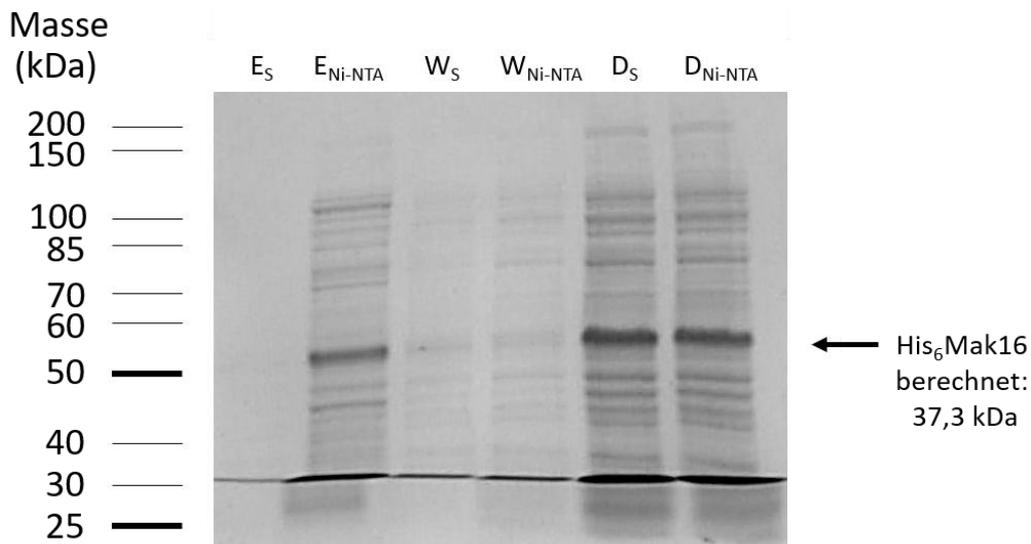
**Abbildung 72: Verlust vom ES7a–Expansionssegment nach Ni–NTA–Aufreinigung.**

Nach weiteren Waschschrten des Eluats ( $E_{Ni-NTA}$ ) wurde die RNA mittels TRIZOL–Verwendung isoliert, aufgereinigt und auf ein Acrylamidgel (10 %) aufgetragen. Es wurden folgende Proben aufgetragen: ohne Plasmid (e), mit pCDF–ES7a Plasmid (ES7a), Ni–NTA–Waschfraktion 1 ( $W_1$ ), Ni–NTA–Waschfraktion 2 ( $W_2$ ), Ni–NTA–Waschfraktion 3 ( $W_3$ ), Ni–NTA–Eluat ( $E_{Ni-NTA}$ ). Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder (200–6000 bp, ThermoFisher SM1821). Dateiname: Verlust vom ES7a–Expansionssegment nach Ni–NTA–Aufreinigung.png.

Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen mittels SDS–PAGE auf die Anwesenheit von His<sub>6</sub>Mak16 untersucht. Abbildung 73 zeigt eine deutliche Proteinbande bei einer Größe von ca. 52 kDa in den Durchlaufproben der Sephadex– und Ni–NTA–Aufreinigung. Eine schwache Bande selber Größe konnte ebenfalls in den Waschproben detektiert werden. Der direkte Vergleich der Eluatproben zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied. Während bei der Eluatprobe nach der Ni–NTA–Aufreinigung eine Bande detektiert werden konnte, zeigt die

## Ergebnisse

Eluatprobe nach der Sephadex–Aufreinigung keine Proteinbanden. Es konnte keine Bindung zwischen der rRNA ES7a und Mak16 nach der Sephadex–Aufreinigung aufgezeigt werden.



**Abbildung 73: SDS–PAGE der beiden Aufreinigungsmethoden Sephadex und Ni–NTA–Agarose.**

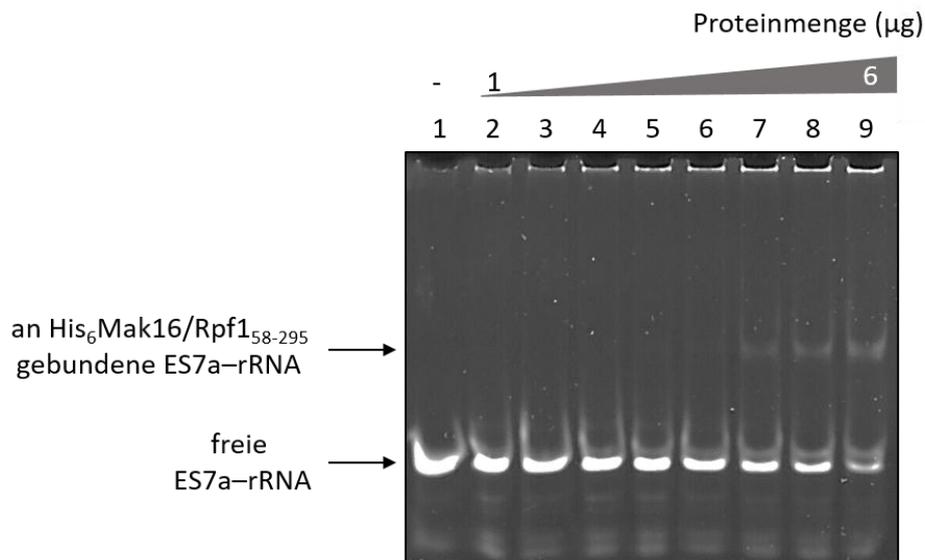
Dargestellt sind die Proben von Fraktionen, die während und nach der Aufreinigung mittels Sephadex– und Ni–NTA–Aufreinigung gesammelt wurden. Folgende Proben wurden aufgetragen: Sephadex–Eluat ( $E_S$ ), Ni–NTA–Eluat ( $E_{Ni-NTA}$ ), Sephadex–Waschfraktion ( $W_S$ ), Ni–NTA–Waschfraktion ( $W_{Ni-NTA}$ ), Sephadex–Durchlauf ( $D_S$ ), Ni–NTA–Durchlauf ( $D_{Ni-NTA}$ ). Marker: Unstained Protein Standard, Broad Range (10–200 kDa, NEB #P7717). Dateinamen: SDS–PAGE der beiden Aufreinigungsmethoden Sephadex und Ni–NTA–Agarose.png.

### 4.3.2 EMSA–Interaktionsassay zwischen dem rRNA–Expansionssegment ES7a und His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>

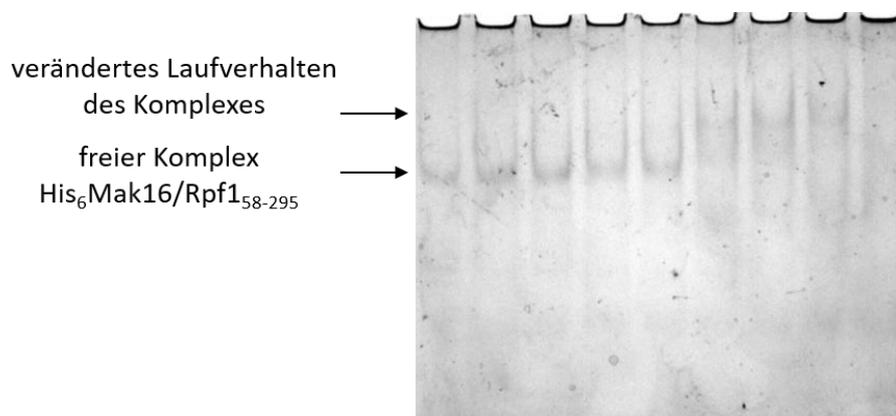
Aufgrund dieser Ergebnisse sollte mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) die Protein–RNA–Wechselwirkung untersucht werden. Dieses Verfahren kombiniert die Prinzipien der Protein– und Oligonukleotidelektrophorese, um die biochemischen Beziehungen zwischen diesen Spezies zu bestimmen. Sobald bei Zugabe des Proteins mit steigender Proteinkonzentration zur freien RNA eine Protein–RNA–Wechselwirkung erfolgt, migriert dieser Komplex im Vergleich zur freien RNA langsamer und wird daher bei seiner Migration durch das TBE–Polyacrylamidgel verlangsamt (Summer *et al.*, 2009). In Abbildung 74 A ist das TBE–Polyacrylamidgel des EMSA–Assays von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> und der ES7a–rRNA dargestellt. Bei einer gleichbleibenden ES7a rRNA–Konzentration und steigender Proteinkonzentration kann eine eindeutige Verschiebung der Bande in den Spalten 6 und 7 beobachtet werden. Das bedeutet, dass der Proteinkomplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> mit der ES7a rRNA *in vitro* mit den jeweils einzeln aufgereinigten Komponenten eine Bindung eingeht.

Zusätzlich wurde das TBE–Polyacrylamidgel anschließend mit Coomassie–Blau eingefärbt (Abbildung 74 B). Es ist eine Proteinbande für den Komplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> erkennbar und dass sich diese Banden mit steigender Proteinmenge und gleichbleibender ES7a rRNA–Konzentration in den Spalten 6 und 7 verschieben.

A



B



**Abbildung 74: Nachweis der Protein–RNA–Wechselwirkung mittels EMSA und SDS–PAGE.**

Die aufgereinigte ES7a–rRNA (2,5 µg) wurde mit einer steigenden Menge an aufgereinigtem Proteinkomplex (1– 6 µg) für 30 Min bei Raumtemperatur in Bindungs–Puffer (50 mM PP<sub>i</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Igepal, 10 % Glycerol der Gesamtmenge) inkubiert. A) RNase–freies, natives TBE–Polyacrylamidgel (5 %): In die Spuren 1 (nur RNA) bis 9 (maximale Menge an Proteinkomplex 6 µg) wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese für 90 Min bei 60 V vollzogen. B) Anschließende Coomassie–Blau–Färbung des TBE–Gels über Nacht und anschließende Entfärbung mit Coomassie–Entfärbungslösung. Dateinamen: Nachweis der Protein–RNA–Wechselwirkung mittels EMSA.png., Färbung des TBE–Gels mit Coomassie–Blau zeigt die Proteine.png.

## Ergebnisse

In der Tabelle 45 sind die molaren Verhältnisse zwischen dem His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub>-Komplex und der ES7a rRNA dargestellt. In den Spalten 6 und 7, in denen die Verschiebung am deutlichsten ist, liegt der Komplex mit der rRNA ca. in einem Verhältnis von 1:1 vor.

**Tabelle 45: Berechnete molare Verhältnisse zwischen dem Proteinkomplex und der rRNA**

Spur	Ratio: His <sub>6</sub> Mak16/Rpf1 <sub>58-295</sub> / ES7a-rRNA
1	0,00
2	0,34
3	0,41
4	0,47
5	0,54
6	0,85
7	1,36
8	1,70
9	2,03

## 5. Diskussion

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Lill wurde mittels Immunopräzipitation gezeigt, dass die menschlichen CIA-Zielkomplex-Proteine mit bekannten Eisen-Schwefel-Proteinen assoziieren, wie zum Beispiel Rli1 (Stehling *et al.*, 2012), welches für die Initiierung der eukaryotischen Translation sowie für die Ribosomenbiogenese erforderlich ist (Yu *et al.*, 2023). Weitere koimmunopräzipitierte Proteine identifizierten potenzielle Kandidaten für Eisen-Schwefel-Proteine, unter anderem welche, die  $Zn^{2+}$  in ihrer Struktur enthielten, wie die replikative DNA-Polymerase. Durch Untersuchungen an der katalytischen Einheit der replikativen Polymerase konnte gezeigt werden, dass diese anstelle von  $Zn^{2+}$  ein [4Fe-4S]-Cluster koordiniert (Netz *et al.*, 2011). Ein weiteres Protein welches mittels Immunopräzipitation identifiziert wurde, ist Mak16 (Stehling *et al.*, 2012). Dieses unerforschte Mak16-Protein ist von großem Interesse, da es als eines der essenziellen Kernproteine an der Reifung der prä-rRNA beteiligt ist (Pellett *et al.*, 2006). Die Betrachtung des Sequenzalignements von Mak16 ließ auch bei diesem Protein eine Koordination von Metallionen vermuten.

Anschließend konnten erste *in vivo* Untersuchungen mittels etablierter  $^{55}Fe$ -Eisenchlorid Markierung in Hefezellen eine *de novo* Eisen-Schwefel-Clusterinkorporation in Mak16 zeigen (Pierik *et al.*, 2009, DFG-Antrag, Dr. habil. Daili J. A. Netz, Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau). Ebenso konnte bei Expression in Hefe eine beträchtliche Menge an eingebautem  $^{55}Fe$  in den drei Mak16-Proteine der Organismen *Homo sapiens* (*H. sapiens*), *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) und *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) nachgewiesen werden. Durch das Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-Clusters in Mak16 in diesen vier Eukaryoten, kann auf eine gemeinsame Rolle des Eisen-Schwefel-Clusters von Mak16 in diesen Eukaryoten geschlossen werden (DFG-Antrag, Dr. habil. Daili J. A. Netz, Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau).

### 5.1. Biochemische Charakterisierung von Hefe-Mak16 *in vitro*

Um die Eisen-Schwefel-Koordination an *S. cerevisiae* Mak16 *in vitro* untersuchen zu können, musste als grundlegender und essenzieller erster Schritt, ein stabiles Protein gewonnen werden. Bereits bei der Klonierung zeigten sich erste Schwierigkeiten. Aufgrund der toxischen Wirkung bei bereits geringer Mak16-Expression auf die DH5 $\alpha$ -Zellen, die keine

## Diskussion

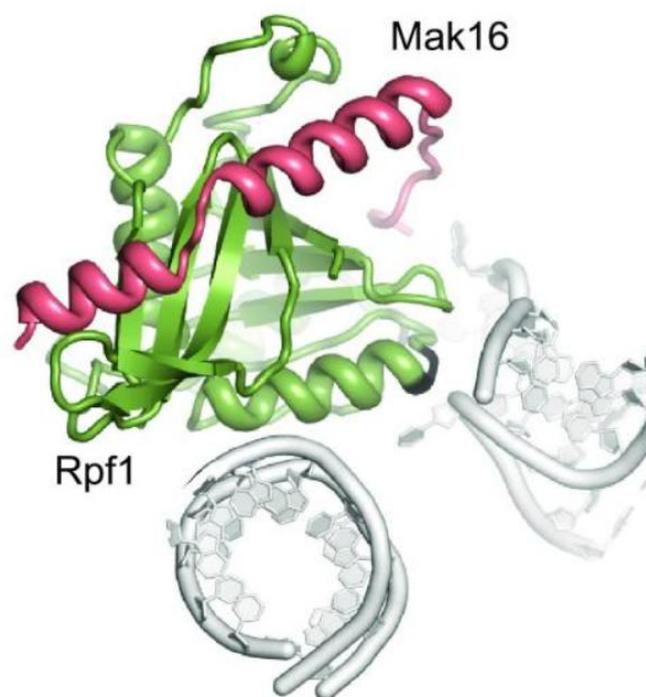
T7 RNA– Polymerase produzieren, konnte Mak16 ausschließlich bei 30 °C in *E. coli* erfolgreich kloniert werden, ohne die Zelle durch Mak16–Expression zu töten. Die toxische Wirkung von Mak16 auf Bakterien zu unterdrücken, erwies sich auch bei der Überexpression in BL21 Zellen als herausfordernd. Im Zuge meiner Masterarbeit konnte diese Toxizität erst durch eine Fusion mit einem vergleichsweise großen Protein, dem Maltose–Bindepotein (MBP), und die damit einhergehende Abschirmung von Mak16, teilweise unterdrückt werden (Wittmaack (Duppe), 2018). Die Expression mit MBP und Aufreinigung benötigte jedoch zusätzliche Arbeits– und Reinigungsschritte, weshalb in dieser Arbeit ein anderer *E. coli* BL21 Stamm, der T7 Express *lysY/l<sup>q</sup>* als Expressionsstamm verwendet wurde. Dabei wird die Basalexpression nahezu komplett unterdrückt und erst nach der Induktion mit Isopropyl–β–D–thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression des Zielgens aktiviert. Durch diese Expressionsänderung von Mak16 während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen gelang erstmals eine heterologe Proteinexpression von Hefe–His<sub>6</sub>Mak16 ohne Fusionsprotein (MBP) in *E. coli*.

Erste Aufreinigungsversuche von *S. cerevisiae* His<sub>6</sub>Mak16 lieferten ein trübes, leicht beiges Eluat. Betrachtet man bereits literaturbekannte, charakterisierte Eisen–Schwefel–Proteine, so weist das Eluat in der Regel eine rot–braune Färbung auf (Baranovskiy *et al.*, 2018; Ueda *et al.*, 2022). Die SDS–PAGE zeigte zudem eine deutlich ausgeprägte Bande bei ca. 70 kDa, die dem Chaperon Hsp70 zugeordnet werden kann (Mayer *et al.*, 2005). Dieses ist wahrscheinlich nicht in der Lage von fehlerhaft gefalteten Mak16 zu dissoziieren und wird auf der SDS–PAGE als Bande detektiert. Einige weitere Banden unter 30 kDa sind potentielle Abbauprodukte des strapazierten Proteins zuzuordnen. Die geringen gemessenen Eisen– und säure–labilen Schwefelwerte für Hefe–His<sub>6</sub>Mak16 mit ca. 0,7 Eisen– und 0,3 Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16 zeigen, dass es sich bei dem isolierten Protein hauptsächlich um Apo–Mak16 handelt.

Um das Protein zu stabilisieren, wurden eingehend Untersuchungen verschiedener Konditionen in den einzelnen Aufreinigungen, wie zum Beispiel unterschiedliche pH–Werte in verschiedenen Puffern mit variierendem Salzgehalt getestet. Dabei wurde eine stabilisierende Wirkung bei der Anwendung vom Pyrophosphat–Puffer, pH = 9,0, festgestellt. Die Wirkung dieses Puffers lässt sich anhand der Zuordnung von Mak16 in der Kryo–EM–Struktur des prä–60S Partikels erklären. Ein wichtiger Teil dieser ribosomalen Untereinheit besteht aus dem Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul, den vier Proteinen und den ummantelnden RNA–Domänen I und II (Sanghai *et al.*, 2018).

Dabei ist eine direkte Interaktion mit dem Expansionssegment ES7a der 25S RNA (Domäne II) und die unmittelbare Nähe zu ES7c mit Mak16 zu erkennen. Aufgrund der Interaktion von Mak16 mit dem ES7a–Segment konnte durch die Verwendung des Pyrophosphat–Puffers die negative Ladung der RNA imitiert und Hefe–His<sub>6</sub>Mak16 während der Aufreinigung teilweise stabilisiert werden. Hefe–His<sub>6</sub>Mak16 wurde dadurch als bräunliches Chromophor enthaltendes Protein eluiert, jedoch zeigte sich weiterhin eine Trübung des Eluats nach dem Schockfrieren und erneutem Auftauen. Dies deutete auf eine bestehende Instabilität hin, vermutlich durch Faltungsprobleme des Proteins.

Als nächster Schritt wurde die Koexpression von His<sub>6</sub>Mak16 mit dem Brix–Domänenprotein Rpf1 durchgeführt. Kristallstrukturen zeigen, dass eine  $\alpha$ –Helixregion von Mak16 räumlich so organisiert ist, dass es die Struktur und die damit einhergehende Faltung von Rpf1 vervollständigt und andersherum. Dadurch wiederum wird auch die Struktur von Mak16 vervollständigt. (Zhou *et al.*, 2019).



**Abbildung 75: Der Rpf1/Mak16–Komplex in der Rpf1–TAP prä–60S Ribosomenstruktur.**

*Eine  $\alpha$ –Helixregion von Mak16 bindet an das Brix–Domänenprotein Rpf1 (Proteine sind farblich gekennzeichnet: Mak16 in rosa, Rpf1 in grün. Die RNA ist in Silber dargestellt.) (Zhou *et al.*, 2019).*

Demnach wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mak16 durch die Vervollständigung seines Bindungspartners Rpf1 stabilisiert wird und seine physiologische räumliche Struktur

## Diskussion

einnehmen kann. Das strukturelle korrekte ausbilden der Sekundär-, Tertiär und Quartärstruktur ist von großer Bedeutung, um dem Eisen-Schwefel-Cluster einen zielgerichteten Einbau in His<sub>6</sub>Mak16 zu ebnet. Die Expression von Proteinkomplexen *in vitro* kann außerdem zu einer verbesserten Ausbeute und Löslichkeit im Vergleich zu einem einzelnen isolierten Protein führen (An *et al.*, 2011). Von Vorteil ist dabei außerdem, dass einzelne Untereinheiten, die vorher freibeweglich waren nach der Interaktion mit einem Bindungspartner vor einer möglichen Proteolyse geschützt werden können. Zusätzlich erzielte eine Temperatursenkung eine verbesserte Expressionsrate der rekombinanten Proteine (Francis *et al.*, 2010).

Durch die Koexpression der Proteine Rpf1 und His<sub>6</sub>Mak16 konnte der rekombinant exprimierte Komplex mit einem klaren braunen Chromophor gewonnen werden. Mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde ein breites Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 410\text{--}420\text{ nm}$  detektiert. Dieses Absorptionsmaximum ist charakteristisch für Eisen-Schwefel-Chromophore (Mukund *et al.*, 1990). Die Bestimmung von Eisen- und Sulfidionen im Eluat stieg auf das Vierfache von ca. 6,4 Eisen- und 4,4 Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1. Zusammenfassend deuten der Eisen- und säure-labile Schwefelgehalt, die Färbung des Eluats und der signifikante Spektrumsverlauf im UV/Vis-Spektrum auf das Vorhandensein eines einzelnen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster im Komplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 hin.

Mittels der Rpf1-Koexpression konnte erstmals His<sub>6</sub>Mak16 isoliert werden, ohne eine Trübung des Proteins nach dem Schockfrieren und erneutem Auftauen zu beobachten. Durch die Koexpression der Bindungspartner wurde eine Proteinmenge von 2,6 mg/L *E. coli* Kultur eines intakten Proteinkomplexes gewonnen.

Anhand von Strukturanalysen konnten sowohl bei His<sub>6</sub>Mak16 als auch bei Rpf1 freibewegliche Regionen in der Struktur gezeigt werden, die für eine Proteolyse anfällig sein können. So zeigen bisherige Kryo-EM-Daten Mak16 und Rpf1 nicht in ihren vollen Längen, sondern in gekürzten Formen, wie der Tabelle 46 zu entnehmen ist.

**Tabelle 46: Vergleich der identifizierten Aminosäuren (AA) der Hefe-Proteine Mak16 und Rpf1 in vorliegenden Kryo-EM-Strukturen**

Referenz	PDB	Auflösung (Å)	Mak16 (AA)	Rpf1 (AA)
Zhou <i>et al.</i>	5Z3G	3,65	2–170	88–177, 194–295
Kater <i>et al.</i>	6EM3	3,20	2–174	11–66, 78–160, 187–294
Sanghai <i>et al.</i>	6COF*	3,70	2–191	8–295
Sanghai <i>et al.</i>	8E5T**	4,00	2–131	–

(Zhou *et al.*, 2019), (Kater *et al.*, 2017), \* (Sanghai *et al.*, 2018), \*\* (Sanghai *et al.*, 2023b)

Bei den Strukturen konnte bei den Auflösungen >3,00 Å kein Metall/Cluster identifiziert werden, allerdings zeigen die Daten von Sanghai *et al.* ein Zn<sup>2+</sup>, welches in die Struktur moduliert wurde (Sanghai *et al.*, 2023a).

Anhand dieser Daten wurden der Komplex aus His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1 in gekürzter Form aufgereinigt und mittels SDS-PAGE auf Integrität miteinander verglichen. Für das Konstrukt His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> wurde eine sichtbare Abnahme der niedrigmolekularen Banden erzielt, sowie plausible Eisen- und säure-labile Schwefelwerte mit ca. 4,2 Eisen- und 3,0 Sulfidionen pro His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> im Vergleich zum Voll-längen-Proteinkomplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1 erhalten, weshalb für alle weiteren Versuche dieses Konstrukt verwendet wurde.

Mittels Größenausschlusschromatographie konnten aus dem Eluat des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>-Komplexes zwei Fraktionen gewonnen werden. Ein hochmolekulares Produkt wurde mit einer ungefähren Masse von ca. 222 kDa als Fraktion 1 (Max. 1) und der Komplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub> mit einer isolierten Größe von ca. 69 kDa als Fraktion 2 (Max. 2) identifiziert. Die Fraktionen wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht und Max. 1 zeigte ein Absorptionsmaximum von  $\lambda = 260$  nm. Bei dieser Wellenlänge lassen sich Nukleinsäuren detektieren. Da jedoch DNA und RNA beide ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  nm aufweisen, können diese nicht allein photometrisch voneinander unterschieden werden. Sowohl in Max. 1 als auch in Max. 2 konnte mittels RNase A-Verdau die Bandenintensität auf dem Agarosegel verringert werden, wohingegen die Inkubation mit DNase I keine Wirkung auf die Proben hatte. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der hochmolekularen Fraktion 1 (Max. 1) wahrscheinlich um ein Proteinkomplex mit stark aggregierter RNA und bei der Fraktion 2 (Max. 2) wahrscheinlich um

## Diskussion

His<sub>6</sub>Mak16–Rpf<sub>158–295</sub> mit einem sehr geringen Anteil akkumulierter RNA als Nukleinsäure handelt.

Die im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie durchgeführte Heparin–Chromatographie zeigte ein vielversprechendes Ergebnis in der Reduzierung der Nebenprodukte. Allerdings verblieb nach drei aufeinanderfolgenden Aufreinigungsmethoden am Ende nur eine sehr geringe Menge an Protein. Aus einer 12 Liter *E. coli* Kultur wurden nach den ersten Ni–NTA–Affinitätschromatographieschritten mit anschließender Entsalzung 42 mg (ca. 6 ml Eluat) Protein gewonnen. Das gesamte Eluat wurde mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und 7 mg (ca. 2 ml Eluat, Fraktion 2) Protein erhalten. Nach Auftragung des gesamten Materials auf die Heparin–Sepharose wurde am Ende eine geringe Menge von ca. 0,1 mg (ca. 100 µl Eluat) Protein erhalten. Für Kristallisationsstudien kann diese Art der dreifachen Aufreinigung durchaus überskaliert und weiterverfolgt werden. Für die Arbeiten in der vorliegenden Dissertation wurde das Eluat, das mittels Ni–NTA–Affinitätschromatographie gewonnen und anschließend entsalzt wurde, für alle weiteren Experimente verwendet.

Die Elektronenspinresonanz–Spektroskopie ist eine attraktive und feinfühligere Technik zur Identifizierung und Untersuchung von Spezies, die eine ungerade Anzahl an Elektronen besitzen, wie Radikale, Radikalkationen und –anionen sowie einige Übergangsmetallspezies (Compton *et al.*, 1988). Zuerst wurde die Stabilität des His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub>–Komplexes durch Natriumdithionitreduktion bei unterschiedlichen pH–Werten und Phosphat–Puffern mittels ESR–Spektroskopie untersucht. Die deutlichste Reduktion wurde im PP<sub>i</sub>–Puffer bei einem pH–Wert von 9 festgestellt. Bei einem höheren pH–Wert von 10 zeigte der reduzierte Mak16–Komplex eine schwächere Reduktion und ein zusätzliches Signal. Die Stabilität des reduzierten His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub>–Komplexes erwies sich damit als pH–abhängig.

Die ESR–Spektroskopie für den Komplex His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub> (PP<sub>i</sub>–Puffer, pH = 9) zeigte in der isolierten Probe nur einen  $g$ –Wert. Dieses Signal bei  $g_z = 2,005$  ist charakteristisch für einen oxidierten [3Fe–4S]<sup>1+</sup>–Cluster. Dieses Signal verblieb unverändert bei Zugabe von Ferricyanid. Der [4Fe–4S]–Cluster in His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub> wurde in einem diamagnetisch stillen Zustand als [4Fe4S]<sup>2+</sup>–Cluster angetroffen. Durch die Behandlung mit Natriumdithionit bleichte die sichtbare Extinktion des Eluats von His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158–295</sub> und erzeugte paramagnetische ESR–Signale mit einer rhombischen Hauptspezies mit  $g$ –Werten von  $g_x = 1,886$ ,  $g_y = 1,912$  und

$g_z=2,015$ , die einem reduzierten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster zugeordnet werden können. Verglichen mit bekannten  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster der CIA-Proteinen (Dre2, Cfd1 und Nbp35), zeigten sich Übereinstimmungen in den ESR-Eigenschaften (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Biophysikalische Eigenschaften verschiedener  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster in Proteinen**

Protein ( <i>S. cerevisiae</i> )	Mak16	Dre2	Cfd1	Nbp35
ESR	$g_z= 2,02$ $g_y= 1,91$ $g_x= 1,89$	$g_z=2,01$ $g_y=1,95$ $g_x=1,80$ *	$g_z=2,04$ $g_y=1,93$ **	$g_z=2,05$ $g_y=1,93$ **

\* (Netz *et al.*, 2010), \*\* (Netz *et al.*, 2007)

Die durchgeführten Analysen zeigten eindeutig, dass aus Hefe isoliertes His<sub>6</sub>Mak16 ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster enthält, der bei der Reinigung teilweise zu einem  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster abgebaut wird. Forschungen berichten von einer DNA-vermittelte Elektrochemie die mittels *Charge transport communication* (CT) durch doppelsträngige DNA realisiert wird. Dabei konnten an DNA gebundene Proteine Elektronen durch die DNA weiterleiten bis zu einem Empfänger Molekül/Protein. Bei den Untersuchungen stellte sich für DNA prozessierende Enzyme dabei eine Verschiebung des Redoxpotentials des Clusters heraus, wodurch das Protein als Redoxschalter dienen kann (Barton *et al.*, 2019).

**Tabelle 48: Redoxpotential-Verschiebungen einiger DNA prozessierender Enzyme**

Redoxpotential	DNA Primase	DNA Helikase	Pol $\delta$
mV ( <i>electrode</i> )	-130 bis -140 **	~ -390	-
mV ( <i>DNA-modified electrode</i> )	$160 \pm 4$ *	~ 80 ***	$113 \pm 5$ ****

(O'Brien *et al.*, 2018)\*, (O'Brien *et al.*, 2017)\*\*, (Ren *et al.*, 2009)\*\*\*, (Bartels *et al.*, 2017)\*\*\*\*

Diese Forschungen lieferten uns den Anreiz zu überprüfen, ob eine Verschiebung des Redoxpotentials bei dem RNA bindenden Protein Mak16 detektiert werden kann. Daraufhin wurde das Redoxpotentials des Clusters von Mak16 mittels zwei verschiedener Methoden untersucht.

## Diskussion

Die erste Methode war die anaerobe ESR-spektroskopisch detektierende Redoxtitration. Während dieser schrittweisen ESR-Redoxtitration mit steigender Natriumdithionitkonzentration konnte in ersten Versuchen kein ESR-Signal von His<sub>6</sub>Mak16 gemessen werden. Das könnte an einem vorzeitigen Zerfall des Clusters aufgrund der benötigten Zeit für die Einstellung des Potentials liegen. Um einen Zerfall des Clusters ausschließen zu können, wurde zu jedem Titrationszeitpunkt eine zweite Probe entnommen und mit einem Überschuss an Natriumdithionit behandelt. Mittels dieser Methode konnte zu jedem Schritt der Redoxtitration eine vollständige Reduktion des intakten Proteins überprüft werden und ein Zerfall des Clusters ausgeschlossen werden. Mittels dieser Art der Redoxtitration und Kontrollpunkten konnte nach einigen Versuchen ein sehr niedriges elektrochemisches Potential von ca. -530 mV ermittelt werden.

Die zweite Methode war die neu etablierte automatische UV/Vis-spektroskopisch detektierende Redoxtitration, mit der ebenfalls das Potential unter anaeroben Bedingungen untersucht wurde. Dafür konnten nach der jeweiligen Zugabe an Natriumdithionit kontinuierlich UV/Vis-Spektren aufgenommen und parallel das elektrochemische Potential gemessen werden. Mittels dieser Methode wurde ein elektrochemisches Potential von -470 mV ermittelt.

Vergleicht man beide Methoden miteinander, ist die ESR-begleitende Redoxtitration eine gute Methode um sich in größeren mV-Schritten (30–50 mV) dem Potential des Proteins von Interesse zu Nähern. Wenn man dadurch dann das Potential auf einen bestimmten Bereich eingrenzen kann, wird in weiteren Redoxtitrationen mit kleineren mV-Schritten das Potential mittels ESR-Spektroskopie analysiert. Die eingefrorenen Proben wurden anschließend dann einzeln vermessen und ausgewertet. Dahingegen können bei der UV/Vis-spektroskopisch detektierenden Redoxtitration alle 4 min Spektren aufgenommen werden und die Titration direkt visuell verfolgt werden. Die Daten wurden anschließend ausgewertet und das elektrochemische Potential berechnet ohne einen weiteren Messschritt zu benötigen. Beide Methoden liefern ein vergleichbares niedriges Potential von -470 bis -530 mV. Dieses niedrige Potential liegt innerhalb der Erwartungen, wenn man diesen Wert mit anderen [4Fe4S]-Proteinen vergleicht. Die wichtige Eisen-Schwefel-Proteinklasse der [4Fe-4S]-Ferrodoxinen, die erstmals aus dem Bakterium *Clostridium pasteurianum* isoliert wurden, besitzt mit ca. -420 mV ein vergleichbares niedriges Redoxpotential (Mortenson, 1962; Cammack *et al.*, 1981).

Interessanterweise besitzt das an der Regulation der Translation und Ribosomenrecycling involvierte Protein Rli1 zwei Eisen–Schwefel–Cluster, einen N-terminalen ferredoxinähnlichen und einen Rli1 typischen Eisen–Schwefel–Cluster. Das bedeutet, dass die Cystein– und Prolinreste nach dem gleichen Muster angeordnet sind wie in den typischen clostridialen Ferredoxinen (Beinert, 1990), wodurch auch bei Rli1 ein niedriges Redoxpotential von ca. –400 mV vermutet werden kann. Jedoch wären diese Ergebnisse aufgrund der zwei Eisen–Schwefel–Cluster etwas komplexer zu interpretieren. Für den Eisen–Schwefel–Cluster der FeFe–Hydrogenase aus *C. pasteurianum* konnte ein niedriges Redoxpotential von weniger als –450 mV ermittelt werden (Artz *et al.*, 2017). Nar1, das FeFe–Hydrogenase Homolog in *S. cerevisiae*, weist ein ebenso niedriges Redoxpotential von –460 mV auf (Fujii *et al.*, 2009; Hagedoorn *et al.*, 2014). Das Redoxpotential der Nitrogenase (*Azotobacter vinelandii*) wurde mit ca. –280 mV bestimmt (Stephens *et al.*, 1996), weshalb anhand der Ähnlichkeit zu anderen „Cluster–Brücken“-Komplex, wie Cfd1 und Nbp35, sich auch hier ein ähnliches niedriges Redoxpotential erwarten lässt. In Tabelle 49 sind die Redoxpotentiale der Eisen–Schwefel–Cluster der oben genannten Proteine im Vergleich zu dem ermittelten Wert für Mak16 tabellarisch dargestellt.

**Tabelle 49: Redoxpotential einiger [4Fe–4S]–Cluster wichtiger Eisen–Schwefel–Proteine**

Redoxpotential	[4Fe–4S]– Ferredoxine ( <i>C. pasteurianum</i> )	[FeFe]– Hydrogenase ( <i>S. cerevisiae</i> )	Nitrogenase ( <i>A. vinelandii</i> )	Mak16 ( <i>E. coli</i> )
mV	–420	–460	–280	–470 bis –550
	(Cammack <i>et al.</i> , 1981)	(Hagedoorn <i>et al.</i> , 2014)	(Stephens <i>et al.</i> , 1996)	(diese Arbeit)

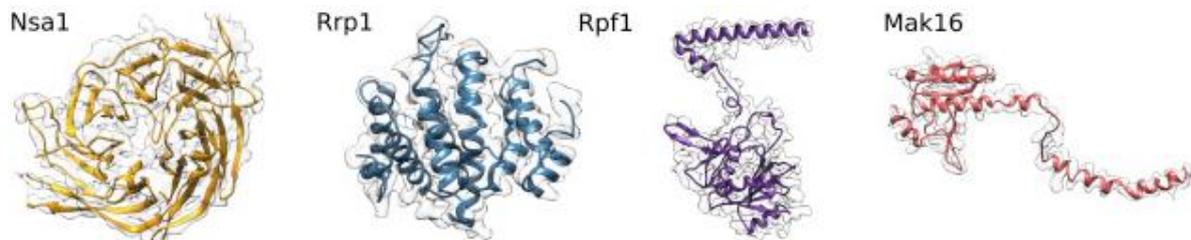
Das Redoxpotential des Clusters von Mak16 zu ermitteln sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erwies sich als herausfordernd. Um nun eine Verschiebung des Redoxpotentials des Clusters in Anwesenheit von RNA untersuchen zu können, muss die unspezifisch gebundene RNA zuerst verdaut, danach das ES7a rRNA–Segment gebunden und eine erneute Titration durchgeführt werden. All diese zeitbeanspruchenden und strapazierenden Aspekte führten dazu, dass dieser Versuch nicht Teil dieser Arbeit wurde.

## Diskussion

Die Mößbauer-Spektroskopie konnte Aufschluss auf die räumliche Struktur des Clusters geben. Dafür wurden eine oxidierte und eine reduzierte Probe von Wildtyp Mak16 untersucht. In der oxidierten Probe wurde ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster aus jeweils 2 Eisenpaaren mit formaler Ladung von 2,5+ detektiert. Das Spektrum für die reduzierte Probe von Mak16 enthielt einen Beitrag von weniger als 5 % an restlichem oxidierten Cluster. Mößbauer-Studien zum Protein Dre2 detektierten Isomerieverschiebungen von  $\delta = 0,43$  mm/s und Quadrupolaufspaltungen von 0,99 und 1,29 mm/s, welche beide typisch für valenz-delokalisierte  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$ -Paare vom oxidierten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster sind, welches durch Cystein-Reste gebunden wird (Netz *et al.*, 2016). Diese Werte stimmen mit den gemessenen Werten für Mak16 überein. Das reduzierte Spektrum von Dre2 zeigte etwas höhere Isomerieverschiebungen von  $\delta = 0,53$  mm/s und  $\delta = 0,64$  mm/s, die typisch für den eisenhaltigen Charakter mit formaler Ladung von  $\text{Fe}^{2,25+}$  in valenz-delokalisierten reduzierten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster sind (Netz *et al.*, 2016). Auch diese Werte sind vergleichbar mit der reduzierten Probe von Mak16, wodurch gezeigt wurde, dass diese aus einem reduzierten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster aus jeweils 2 Eisenpaaren mit formaler Ladung von 2,5+ und 2+ ( $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ ) ( $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ ) bestehen. Studien zu den Mößbauer-Spektren von Cfd1, Nbp35 und deren Komplex, zeigten eine Hauptkomponente mit einer Isomerieverschiebung von  $\delta = 0,43$  mm/s und einer Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = 1,18$  mm/s (Netz *et al.*, 2012). Diese für cysteinkoordinierende  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster typischen Werte sind mit denen von Mak16 vergleichbar und untermauern die Aussage, dass Mak16 einen tetraedrischen  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster mittels Cystein-Liganden koordiniert.

Frühere Mößbauer-Studien an dem anaerob aufgereinigtem *E. coli* Transkriptionsfaktor FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktion) zeigten einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, der bei Sauerstoffeinwirkung in einen  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster umgewandelt wird, ein Prozess, der die DNA-Bindung an FNR reduziert. Der Verlust des  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters sowie der Verlust der spezifischen DNA-Bindung bei der Einwirkung von Sauerstoff auf FNR deutet darauf hin, dass der  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster aufgrund seiner intrinsischen Instabilität als Sauerstoffsensordient (Lazazzera *et al.*, 1996), (Khoroshilova *et al.*, 1997), (Popescu *et al.*, 1998). Die Mößbauer-Spektroskopiedaten von Mak16 hingegen, zeigen keine Clusterumwandlung bei einer Oxidation des  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters. Mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass der Proteinkomplex der unter Sauerstoffeinwirkung vermessen wurde einen deutlichen Clusterverlust von ca. 50 % aufweist. Der Proteinkomplex der unter Sauerstoffausschluss vermessen wurde, wies hingegen innerhalb mehrerer Stunden einen geringeren Clusterabbau von 20 % auf.

Nach der Erfolgreichen Koexpression und Charakterisierung der beiden Bindungspartner His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1<sub>58–295</sub>, wurde anschließend das Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Modul aufgereinigt.



**Abbildung 76: Proteine des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls.**

Dargestellt sind die, durch Kryo-EM modellierten Assemblierungsfaktoren, Proteine aus dem Zustand C: Nsa1 (gelb), Rrp1 (blau), Rpf1 (lila) und Mak16 (rot) (Kater et al., 2017).

Die Expression aller vier Proteine erfolgte gleichzeitig in *E. coli*, dabei wurden Mak16 und Rrp1 mit einem N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag modifiziert. Die Aufreinigung verlief analog zur Komplexaufreinigung von His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1<sub>58–295</sub> und das bräunlich isolierte Chromophor zeigt auf der SDS-PAGE deutliche Banden, die His<sub>6</sub>Mak16 (37,3 kDa) und His<sub>6</sub>Rrp1 (34,8 kDa) zugeordnet werden konnten. Dem gekürzten Rpf1<sub>58–295</sub>, konnte ebenfalls eine Bande bei ca. 28 kDa zugeordnet werden. Für Nsa1 konnte keine einzelne Bande detektiert werden, allerdings besteht die Möglichkeit, dass His<sub>6</sub>Mak16 (37,3 kDa) und Nsa1 (52 kDa) auf derselben Höhe im Gel gelaufen sind, da Mak16 ein irreguläres Laufverhalten aufweist und bei ca. 50 kDa detektiert wird. Mittels Massenspektrometrie konnten alle vier Proteine: Nsa1, Rrp1, Rpf1 und Mak16, unterschiedlich stark angereichert, im Eluat identifiziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Isolierung aller vier Proteine des Nsa1–Rrp1–Rpf1–Mak16–Moduls möglich ist und ein erster Schritt zur Isolierung des Moduls gegeben wurde.

Nachdem bereits die Existenz des [4Fe–4S]-Clusters in Mak16 anhand verschiedener spektroskopischer Untersuchungen belegt wurde, sollten anschließend die Clusterliganden *in vitro* identifiziert werden. Dabei führte der Austausch von potentiellen Cystein-Clusterliganden zu Alaninen teilweise zu veränderten Eigenschaften im Vergleich zum isolierten Wildtyp-His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58–295</sub>-Komplex.

Die Eluate einiger Cysteinmutanten-Komplexe zeigten eine deutliche Veränderung in ihren Chromophoren, von einem bräunlichen Farbton des Wildtyps über rotbraune Färbungen der Einzel-Cysteinmutanten bis hin zum kompletten Farbverlust der Doppel-Cysteinmutante.

## Diskussion

Diese Chromophoränderung deutet auf eine Clusterveränderung im Protein hin. Diese kann dadurch entstehen, dass es durch die jeweiligen fehlenden Cystein-Liganden zu räumlich strukturellen Änderungen im Protein kommt und dadurch der [4Fe-4S]-Cluster nur schwer eingebaut werden kann oder nicht ausreichend stabil ist. Den kompletten Farbverlust im Eluat der Doppel-Cysteinmutante ist durch eine zu große strukturelle Veränderung erklärbar, welche die Koordination eines Eisen-Schwefel-Clusters komplett verhindert (C38A/C43A). Mittels der elektrophoretischen Auftrennung konnten bei den Cysteinmutanten-Komplexen C28A, C38A und C55A sowohl für His<sub>6</sub>Mak16 als auch für den Bindungspartner Rpf<sub>158-295</sub> Banden in der SDS-PAGE detektiert werden. Demnach führten diese strukturellen Änderungen *in vitro* nicht zum Verlust der Fähigkeit eine Bindung mit Rpf<sub>158-295</sub> einzugehen. Bei dem Doppel-Cysteinmutanten-Komplex (C38A/C43A) hingegen konnten neben den beiden Hauptbanden für His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf<sub>158-295</sub> weitere Banden detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass dieser Cysteinmutanten-Komplex durch einige Abbauprodukte (unter ca. 30 kDa) und wahrscheinlich akkumulierten Faltungsproteinen (ca. 70 kDa), der instabilste Komplex ist.

UV/Vis- und ESR-Daten belegen die optisch und auf der SDS-PAGE beobachteten Veränderungen der Cysteinmutanten aus spektroskopischer Sicht. Der Wildtyp-Komplex und der C55A-Komplex zeigten im UV/Vis-Spektrum einen [4Fe-4S]-Cluster charakteristischen Verlauf. Bei dem C28A-, C38A- und dem Doppel-Cysteinmutanten-C38A/C43A-Komplex konnte ein Peak bei  $\lambda = 325$  nm detektiert werden. Dieser Peak, sowie der in dem C38A-Komplex detektierte Peak bei  $\lambda = 550-570$  nm, sind charakteristisch für [2Fe-2S]-Cluster (Mapolelo *et al.*, 2012), (Raza *et al.*, 2024). In diesen Cysteinmutanten können durch die strukturellen Bedingungen bevorzugt [2Fe-2S]-Cluster eingebaut werden (C28A und C38A). Die ESR-Spektren der Cysteinmutanten-Komplexe zeigen außerdem leichte Verschiebungen zu höheren *g*-Werten (C38A) bzw. zeigen kein Signal (C28A und C38A/C34A). Damit zeigt sich deutlich, dass es bei den Cysteinmutanten-Komplexen, zu Clusterumwandlungen und Clusterdestabilisierungen kommt, da durch die fehlenden Cysteine der Cluster wohlmöglich nur als [2Fe-2S]-Cluster eingebaut und von den übrigen Cysteinliganden koordiniert werden kann, oder es zu einem kompletten Clusterverlust kommt.

Es konnten ebenso Unterschiede in der Proteinausbeute im Vergleich zum Wildtyp-Komplex erhalten werden. So erzielten der Wildtyp-Komplex und der Cysteinmutanten-Komplex C55A einen ähnlichen Mittelwert von ca. 2,6 mg/l *E. coli*, während die Cysteinmutanten-Komplexe

C28A und C38A sowie der Doppel-Cysteinmutanten-Komplex weitaus geringere Mengen an Protein (ca. 1 mg/l) ergaben. Damit einhergehend zeigten die niedrigen Eisen- und Sulfidionen Werte pro His<sub>6</sub>Mak16/Rpf<sub>158-295</sub>-Komplex der Cysteinmutanten C28A, C38A und in der Doppel-Cysteinmutante C38A/C43A, dass es durch die strukturellen Änderungen zu einer Destabilisierung des Clusters kam. Anhand der charakteristischen Untersuchungen der Cysteinmutanten-Komplexe konnten die vermuteten Cystein-Liganden C28A, C38A und C43A auf dieser Ebene ermittelt werden. Da sich der Cysteinmutanten-Komplex C55A wie der Wildtyp-Komplex verhielt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei C55 um keinen Cluster-Liganden handelt. Anhand des Cysteinmotivs ist ein weiterer potentieller Clusterligand C15, welcher in den nachfolgenden *in vivo* Studien näher untersucht wurde.

## 5.2 Struktur-/Funktionsstudien am Eisen-Schwefel-Cluster von Hefe-Mak16 *in vivo*

Anhand der *in vitro* Daten in dieser Arbeit, bei denen mittels zielgerichteter Mutagenese zentrale Cysteine zu Alaninen ausgetauscht wurden, konnten bereits drei essentielle Cysteine als mögliche Eisen-Schwefel-Clusterliganden identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die konservierten Cysteine am N-Terminus von Mak16, C28, C38 und C43.

Mittels Wachstumskomplementation in Hefe wurde die vollständige oder teilweise Aufhebung der Eisen-Schwefel-Koordination in Mak16 untersucht. Dabei zeigte die Mutation des Cysteinrests C28 zu Alanin einen eindeutigen Wachstumsdefekt, wohingegen die Mutation von C38 zu Alanin einen intermediären Phänotyp aufwies. Die Mutation des Cysteinrests C15 zu Alanin zeigte keinen Wachstumsphänotyp, wohingegen die Doppel-Cysteinmutante C15A/C38A in Komplementationsstudien einen additiven Effekt der synthetischen Letalität zeigte, verglichen mit dem Phänotyp der Einzel-Cysteinmutante C38A und verstärkte diesen Phänotyp deutlich. Die Mutation des Cysteinrests C43 zu Alanin zeigte einen harten Phänotyp, vergleichbar mit dem Phänotyp der Mutation des Cysteinrests C28 zu Alanin und der Doppel-Cysteinmutante C15A/C38A. Dadurch konnten die clusterligierenden Cysteinreste an den Positionen 15, 28, 38 und 43 als Liganden identifiziert werden.

Die Untersuchung einer genetischen Interaktion zwischen dem Eisen-Schwefel-Clustereinbau und der Funktion von Mak16 erwies sich zunächst als herausfordernd. Es sollte der Einfluss der Depletion von CIA-Maschinenproteine in Kombination mit einer defekten Eisen-

## Diskussion

Schwefel-Koordination in Mak16 auf den Phänotyp bewertet und dabei der Effekt der synthetischen Letalität untersucht werden. Die konstruierten galaktose-regulierbaren Stämme und die unter einem natürlichen Promotor stehenden temperatursensitiven Mutanten (Mak16 und CIA-Maschinenproteine), ließen sich jedoch nicht miteinander vereinbaren, denn die gleichzeitige Depletion der CIA-Mitglieder Cia1, Cfd1, Nbp35 und Mak16, verminderten die Fähigkeit der WT-Plasmidkopien, das Wachstum der Zellen wiederherzustellen.

Daraufhin sollte der Unterschied zwischen einer Änderung der Eisen-Schwefel-Koordinationsstörung in Mak16 und der Auswirkung des Mangels an Mak16, mithilfe der Cysteinmutante C38A von Mak16 untersucht werden. Dabei zeigte diese Mutante einen intermediären Phänotyp im *GALL-MAK16* Stamm und führt damit zu einer Reduktion des Wachstums von ca. zwei seriellen Verdünnungen. Diese Ergebnisse gehen einher mit der Forschung von Pellett *et al.*, 2006, bei denen ein Hefe-Allel mit der C38Y-Mutante trotz zahlreicher Defekte in der 25S-rRNA-Reifung, welche typisch ist für eine Mak16 Fehlfunktion, überlebte. Die zusätzliche Depletion von dem CIA-Protein Nbp35 veränderte den intermediären C38A-Phänotyp signifikant. Dabei erlitten die Zellen einen stärkeren Verlust der Lebensfähigkeit, von ca. drei seriellen Verdünnungen, vergleichbar mit der Lebensfähigkeit von Zellen ohne Mak16. Diese Ergebnisse wurden am deutlichsten, da die Depletionszeiten zwischen Mak16 und Nbp35 vergleichbar waren (16h), wohingegen Cia1 und Cfd1 noch bei 40 h endogene Proteine vorliegen hatten.

Die Interaktion zwischen Mak16 und Rpf1 wurde mittels *in vivo* Immunopräzipitation-Assays untersucht. Die Expression der 3HA-Mak16-Plasmidkopien lieferte eine Bande von 55 kDa und die Myc-Rpf1-Plasmidkopien zeigten eine Bande von 36 kDa. Diese Ergebnisse stimmen mit der SDS-PAGE nach der Aufreinigung des Komplexes überein. In den Zellextrakten liegen durch TCA-Fällung vergleichbare Gesamtproteinmengen vor. Indem entweder HA-Mak16 oder Myc-Rpf1 als Köder verwendet wurden, konnte eine Ko-Immunopräzipitation des Partnerproteins die untersuchte Interaktion zeigen.

Mittels dieses Verfahrens sollte ebenfalls die Destabilisierung des Eisen-Schwefel-Clusters auf die Protein-Komplex-Bindung untersucht werden. Dazu wurden Cysteinmutanten gewählt, die entweder keinen Phänotyp (C55A), einen intermediären Phänotyp (C38A) oder einen starken Phänotyp (C28A und C15A/C38A) in Komplementationsstudien zeigten.

Aufgrund des verwendeten Methionin-Promotor (*MET25*) wurden die Proteine stärker exprimiert als unter dem natürlichen Promotor, wie er in den *in vitro* Assays verwendet wurde. Um einen Einfluss der Proteine aufeinander zu sehen, musste die Promotorstärke feinreguliert werden. Deshalb wurden unterschiedliche Konzentrationen an Methionin verwendet, welches den Zellen während dem Wachstum hinzugegeben wurden. Wurde den Zellen kein Methionin hinzugegeben, ließ sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Cysteinmutanten erkennen. Das deutlichste Ergebnis konnte bei einer Zugabe von 0,5 mM Methionin erzielt werden. Die Ergebnisse zeigten eine klare direkte Korrelation: Je schwerwiegender die Cysteinmutante in Bezug auf die Eisen-Schwefel-Koordination ist, desto stärker wird die Proteininteraktion unterbrochen. Dies lag nicht einfach nur an einem willkürlichen Cysteinaustausch, da sich die Cysteinmutante C55A, die nicht an der Eisen-Schwefel-Koordination beteiligt ist, ähnlich wie der Wildtyp verhielt.

Der Austausch von Cysteinen zu Alaninen führt *in vivo* zu einer Aufhebung der Interaktion von Mak16 mit Rpf1. Die beeinträchtigte Integrität durch die semi-Apo-Form oder Mak16 ohne Eisen-Schwefel-Cluster in rekombinant exprimierten Proteinen, sorgte in *E. coli* zwar auch für einen destabilisierten Cluster, allerdings zeigten die Ergebnisse keinen vollständigen Verlust des Interaktionspartners Rpf1. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass in Hefe der N-terminale intakte [4Fe-4S]-Cluster entscheidend in der Aufrechterhaltung der Proteinstabilität von His<sub>6</sub>Mak16 und in der Komplexbildung zwischen His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1<sub>58-295</sub> ist, anstelle einer Apo- oder zinkbesetzten Form von Mak16.

Anschließend wurde eine mögliche erhöhte Empfindlichkeit der Zellen, bedingt durch die Destabilisierung der Eisen-Schwefel-Koordination in Mak16, mittels Redox-Stressoren untersucht. Forschungen zeigten, dass die rRNA-Spaltung von 25S mit subletalen Dosen von ROS-erzeugenden Substanzen in Hefezellen durch einen unbekanntem Mechanismus erfolgt. Dieser beruht nicht auf durch ROS induzierte RNA-Strangspaltung in der c-Schleife vom ES7a-Segment, sondern auf redoxaktives Eisen in den Ribosomen. Die Quelle des freien Eisens in den Ribosomen war bisher unklar (Zinskie et al., 2018). Da Mak16 einen redoxaktiven [4Fe-4S]-Cluster enthält und mit ES7a interagiert, wurden die Auswirkungen einer Destabilisierung der Eisen-Schwefel-Koordination in Mak16 auf Zellen untersucht, die Redox-Stressoren ausgesetzt waren. Dafür wurde als intermediärer Phänotyp die Cysteinmutante C38A im Vergleich mit dem WT und der Gabe von verschiedenen Redox-Stressoren getestet und die Wachstumskomplementation mittels Tüpfeltest bewertet.

## Diskussion

Von den ausgewählten Redox-Reagenzien hatte Paraquat (20 mM) keinen Einfluss auf den Phänotyp, während mit DTT und  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelte Zellen einen dosisabhängigen Wachstumsdefekt auf die Zelle zeigten. Dabei wuchsen die mit DTT (35 mM) behandelten WT- und Mutantenzellen eine serielle Verdünnungsstufe weniger als die unbehandelten Zellen. Die WT- und Mutantenzellen, die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM) behandelt wurden, wuchsen beide um zwei Verdünnungsstufen weniger als unbehandelte Zellen. Durch die Inkubation der Zellen mit Vitamin  $\text{K}_3$  konnte eine signifikante Erhöhung der Letalität in der C38A-Cysteinmutante im Vergleich zu unbehandelten Zellen gezeigt werden. Die mit Vitamin  $\text{K}_3$  (0,4 mM) behandelten Zellen wuchsen um zwei Verdünnungsstufen weniger im Vergleich zu unbehandelten WT-Zellen. Die C38A-Cysteinmutante wuchs hingegen um drei Verdünnungsstufen weniger als unbehandelte C38A-Mutantenzellen. Da es sich bei diesen Ergebnissen um Endpunktaufnahmen handelt, wurde ebenfalls der dosisabhängige inhibitorische Charakter von Vitamin  $\text{K}_3$  während der Wachstumsphase mittels einer Wachstumskurve untersucht und die Verdopplungszeiten der Stämme bestimmt. Durch die Zugabe des Redox-Stressors Vitamin  $\text{K}_3$  (0,3 mM), zeigte sich bei WT-Zellen eine kürzere Verdopplungszeit im Vergleich zu WT-Zellen, die nicht mit Vitamin  $\text{K}_3$  behandelt wurden. Bei den, mit Vitamin  $\text{K}_3$  behandelten C38A-Mak16 Mutantenzellen stellte sich hingegen ein etwas langsames Zellwachstum gegenüber den Zeiten der WT-Zellen ein. Die eingesetzten Redox-Reagenzien zeigten bei Zellen mit einer destabilisierten Eisen-Schwefel-Koordination (C38A) zum Teil eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ROS-erzeugenden Substanzen.

Die Ergebnisse der Redox-Stressoren Experimente dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei der Quelle des redoxaktiven Eisens in den Ribosomen, welche zur RNA-Strangspaltung in der c-Schleife vom ES7a-Segment führt, um das Eisen-Schwefel-Protein Mak16 handeln kann. Die Feststellung, dass die ES7-rRNA-Spaltung in adaptiven Phasen der oxidativen Stressreaktion stattfindet, legt nahe, dass eisenvermittelte rRNA-Spaltungen nicht rein destruktiv sind, sondern in gesunden Zellen eine nützliche biologische Funktion haben können, was die kürzere Verdopplungszeit bei WT-Mak16 Zellen bei niedriger Dosis an Vitamin  $\text{K}_3$  erklären kann.

Während der Transkription der eukaryotischen ribosomalen DNA im Nukleolus gibt es „Kontrollpunkte“, die die Bildung stabiler Vorstufen der kleinen und großen ribosomalen Untereinheiten gewährleisten. Das Zwischenprodukt, welches aus den Assemblierungsfaktoren Noc1-Noc2 im Zusammenspiel mit Mak16 und Rrp1, sowie den

hochgradig verschlungenen rRNA–Domänen I und II besteht, ist für den Zusammenbau der großen ribosomalen Untereinheiten verantwortlich, welches als „Kontrollpunkt“ dient (Sanghai *et al.*, 2023a). Der Eisen–Schwefel–Cluster in Mak16, könnte hierbei der „Kontrollpunkt“ sein, indem unter Stresseinwirkung die Destabilisierung des Clusters und das daraus resultierende freie Fe<sup>2+</sup> beispielsweise die Proteinbiosynthese bereits in dieser Vorstufe vorübergehend herunterreguliert, um die Beanspruchung der Zellen während der Stressantwort zu minimieren.

Interessanterweise besitzen die Hefearten *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis* und *Nakaseomyces delphensis* zwei Mak16–Orthologe, Mak16a und Mak16b (Benchouaia *et al.*, 2018). Anhand eines Sequenzvergleichs von *S. cerevisiae* Mak16 mit den beiden Mak16–Orthologen aus *C. glabrata* zeigt sich, dass das Cystein–Motiv nicht in allen drei Mak16 Proteinen konserviert vorliegt.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mak16	--MSDEIVWQVINQSFCSHRIKAPNGQNF <sup>C</sup> RNEYNVTGLCTRQSC <sup>C</sup> PLANSKYATVK--CD	56 (306 As)
<i>Candida glabrata</i> Mak16a	--MSDEIVWQVINQQFCAYKVKTDKGQTF <sup>C</sup> RNEYNVTGLCSRQSC <sup>C</sup> PLANSKYATVK--SE	56 (297 As)
<i>Candida glabrata</i> Mak16b	MNVSDDLWIDIINHGF <sup>C</sup> ATKIKTKVGQTFDRDPYNVTGLFTRQSC <sup>C</sup> PLANSKYATVREYGD	60 (310 As)

**Abbildung 77: Mak16 Sequenzvergleich von *S. cerevisiae* und *C. glabrata*.**

Gezeigt ist die Sequenzübereinstimmung im N–Terminus von *S. cerevisiae* Mak16 mit *C. glabrata* Mak16a und Mak16b. Die Cysteine an den Positionen 15, 28, 38 und 43 sind in rot aufgezeigt und die Aminosäureanzahl ist in Klammern angegeben.

Dies könnte darauf hindeuten, dass *C. glabrata* Mak16a wie *S. cerevisiae* Mak16 ebenfalls einen Eisen–Schwefel–Cluster enthält, *C. glabrata* Mak16b hingegen nicht.

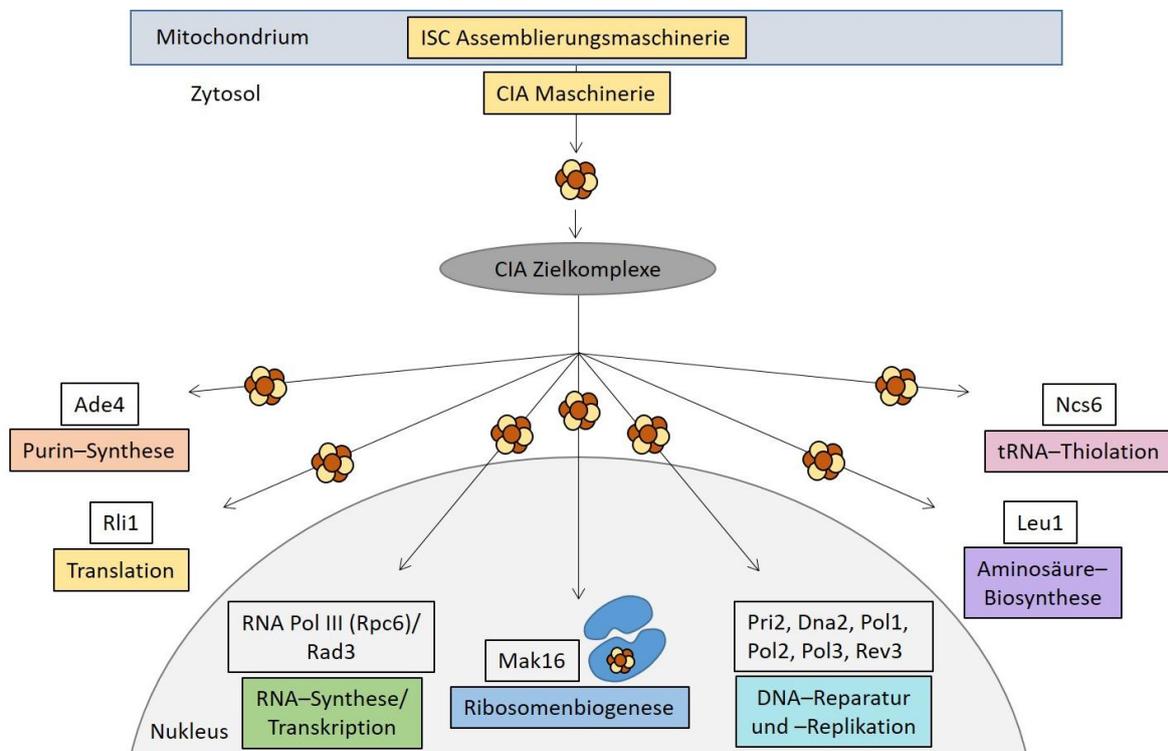
Die Ergebnisse von Benchouaia *et al.* zeigten, das *C. glabrata* Mak16b nicht essentiell ist. Die Stressoren Selenit, Cadmium und Bathophenanthrolindisulfonat erzielten einen Anstieg des Expressionsprofils von Mak16b in der Zelle als Reaktion auf Eisenmangel, während das Expressionsprofil von Mak16a unverändert blieb bzw. unterdrückt wurde (Benchouaia *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Komplexität von Mak16–Expressionsprofilen in Zusammenhang mit Redox–Stressoren.

### 5.3 Untersuchung der rRNA-Bindung an Mak16 durch EMSA-Interaktionsassay

Als ein weiterer und letzter Teil in dieser Arbeit wurden Aspekt zur Stabilisierung durch die Anlagerung der RNA beobachtet und untersucht. Hierbei handelt es sich um das Expansionssegment ES7a der 25S rRNA, welches Teil des Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Moduls ist. Die Stabilisierung von Mak16 erfolgt *in vivo* vermutlich auch durch die Interaktion mit dieser rRNA. Durch die Größenausschlusschromatographie wurde deutlich, dass sich nicht nur His<sub>6</sub>Mak16 und Rpf1 zu einem Komplex zusammensetzen, sondern auch ein hochmolekularer Komplex gebildet wird. Aufgrund der Lokalisierung von Mak16 in den Ribosomen und der Affinität zur Bindung von negativgeladenen Nukleinsäuren, sollte nun in einem weiteren Versuch getestet werden, ob es möglich ist spezifische rRNA zu binden. In einem Bindungsassay wurde das exprimierte und mittels Sephadex G-200 isolierte ES7a rRNA-Segment mit aufgereinigtem His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1-Komplex inkubiert und anschließend mittels UREA-Polyacrylamid-Gel analysiert (Ponchon *et al.*, 2007; Summer *et al.*, 2009). Die molaren Verhältnisse zwischen His<sub>6</sub>Mak16/Rpf1<sub>58-295</sub> und ES7a-rRNA wurden berechnet, um das physiologische Verhältnis zu ermitteln, an dem der Protein-Komplex und die rRNA 1:1 vorliegen. Betrachtet man die Spuren 6 und 7 (Ratio 0,85 und 1,36) in der Abbildung 74, so lässt sich eine Verschiebung der Banden beobachten. Dies bedeutet, dass sich ein rRNA/Protein-Komplex gebildet hat, der größer ist und ein anderes Laufverhalten im Gel aufweist, als die einzelnen, ungebundenen Komponenten. Die Verschiebung trat genau bei einem Verhältnis von 1:1 von Protein zu rRNA auf. Allerdings könnte es sein, dass das in dieser Arbeit verwendete RNA-Konstrukt teilweise unspezifisch an Proteine binden kann und weitere Untersuchungen notwendig sind.

## 6. Fazit und Ausblick

Eisen–Schwefel–Proteine sind eine entscheidende Proteinklasse für lebenswichtige Prozesse in Organismen. Ihre Beteiligung an einer Vielzahl essenzieller Vorgänge unterstreicht die Notwendigkeit einer detaillierten Erforschung dieser Proteine. Im Zytosol sind Eisen–Schwefel–Proteine zum Beispiel an der Aminosäure–Biosynthese (Leu1), der Purin–Synthese (Ade4) und der Translation (Rli1) beteiligt. Im Nucleus sind sie für die DNA–Reparatur und –Replikation (Pri2, Dna2, Pol1, Pol2, Pol3 und Rev3), sowie für die RNA–Synthese (RNA Pol III) mittels Transkription (Rad3) notwendig (Netz *et al.*, 2011; Puig *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2018). In mitten dieser wichtigen Prozesse reiht sich, mit dem Start der Ribosomenbiogenese im Nucleus, Mak16 als essentielles Eisen–Schwefel–Protein ein.



**Abbildung 78: Funktion einzelner zellulärer Hefe [4Fe–4S]–Zielproteine, mit dem dazugehörigem Eisen–Schwefel–Protein Mak16.**

Die CIA Zielkomplexe liefern Eisen–Schwefel–Cluster an Proteine im Zytosol und im Zellkern. Die jeweiligen zellulären Funktionen der einzelnen [4Fe–4S]–Zielproteine sind in den unteren Kästen dargestellt. Eigene Darstellung, nach Paul *et al.*, 2015a und Vasquez *et al.*, 2023.

Die präsentierten Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen zahlreiche Möglichkeiten für weitere Forschungsansätze an Mak16.

## Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von vier Cysteinresten am N-terminalen Ende von Mak16 essentiell für die Clusterkoordination und damit für die Funktion der Zellen sind.

Die Essentialität des Cysteinrests C15 wurde durch Komplementationsstudien überprüft. Die Tatsache, dass die Einzel-Cysteinmutante C15A in der Lage war, das Wachstum von Mak16-depletierten Zellen zu komplementieren, lässt vermuten, dass eine benachbarte Aminosäure in der Sequenz oder ein Wassermolekül die Bindungsfunktion übernimmt. Interessanterweise zeigen das externe Cystein in dem N-terminalen [4Fe-4S]-Cluster in Nbp35, sowie die externen Cysteine in den C-terminalen [4Fe-4S]-Clustern in Nbp35 und Dre2 in Wachstumskomplementationsstudien ähnliche Ergebnisse (Netz *et al.*, 2012), was diese Vermutung unterstützt.

Um die Struktur von Holo-Mak16 zu bestimmen, können weitere Studien mittels anaeroben Kristallisationsversuchen von Mak16-Proteinen weiterverfolgt werden. Dazu müssten die Mak16-Proteine in größeren Ansätzen heterolog exprimiert, aufgereinigt und konzentriert werden, um so möglicherweise Kristalle in ausreichender Größe und Qualität für strukturelle Studien zu erhalten. Grundlagen hierfür wurden in dieser Arbeit, mit der erstmaligen Charakterisierung von Mak16 gereinigt aus *E. coli*, geschaffen.

Bisher konnte der C-Terminus von Mak16 in keiner Kryo-Struktur visualisiert werden. Die abwechselnden Regionen aus hoch-basischen und -sauen Segmenten in den Aminosäureresten sind dabei wahrscheinlich für die Interaktion mit der rRNA essentiell. Genauere Untersuchungen zeigten, dass C-terminal gekürzte Hefe-Mak16 Proteinsegmente die korrekte Mak16-Funktion nicht gewährleisten können. Dabei können die gekürzten Mak16 Varianten wohlmöglich zum einen keine vollständige Bindung mit dem Brix-Protein Rpf1 eingehen und zum anderen wird die rRNA-Bindung unterbunden, was das Scheitern von C-terminaltrunkierten Mak16 Proteinen zur Rettung von Mak16 depletierten Zellen erklären kann (Langner, 2018).

Basierend darauf wäre es sinnvoll, das Nsa1-Rrp1-Rpf1-Mak16-Modul unter anaeroben Bedingungen genauer zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für das Zusammenspiel der Proteine in Bezug auf ihre Struktur und Funktion zu erlangen.

Tiefgehende Untersuchungen der Funktion von den Mak16-like Proteinen, wie zum Beispiel den *Heimdallarchaeota*, versprechen weiterhin interessante Aspekte bezüglich der Frage nach der evolutionären Entwicklung von Proteinfunktionen zu erschließen. Motivation weiterer Forschung sollte sein, essenzielle biochemische Informationen über Mak16 zu analysieren, wie zum Beispiel Mak16 in *Candida glabrata*. Interessanterweise besitzt diese haploide Hefe zwei Varianten von Mak16, wobei nur eine davon konservierte Cysteinreste besitzt die einen Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren können. Dies könnte auf eine spezifische Funktion oder Regulation der beiden Proteine hinweisen, die weiter erforscht werden könnte. Möglicherweise könnten Untersuchungen zur Struktur und Funktion der beiden Mak16-Varianten in *C. glabrata* und *S. cerevisiae* neue Erkenntnisse über ihre Rolle im Zellstoffwechsel oder anderen biologischen Prozessen, wie der Stressantwort liefern. Dabei wäre es interessant zu testen, ob *C. glabrata* Mak16a bei Depletion des Mak16 von *S. cerevisiae* in Wachstumskomplementationsstudien die Zellen retten kann und ob *C. glabrata* Mak16b ebenfalls dazu in der Lage ist, oder sogar unter Stressbedingungen eine bessere Rettung erzeugt.

Mit Hilfe des EMSA-Interaktionsassays konnte bereits eine erste Protein-RNA-Wechselwirkung gezeigt werden. Allerdings lässt sich hierbei nicht vollständig ausschließen, dass die RNA auch unspezifisch am Protein bindet. Um sicher zu stellen, dass es sich um eine spezifische Protein-RNA-Wechselwirkung handelt, bedarf es weiterer Modifizierungsschritte des ES7a rRNA-Expansionssegments mit anschließenden Interaktionsstudien. Nachdem eine spezifische Protein-RNA-Wechselwirkung aufgezeigt werden konnte, kann mittels ESR-Spektroskopie das Redox-Verhalten des Protein-Komplexes im Vergleich zum RNA-Protein-Komplex untersucht werden. Dies könnte dazu beitragen, ein tieferes Verständnis für die Funktion des Proteins zu erlangen.

Zusammenfassend lieferte diese Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis im Umgang mit dem Eisen-Schwefel-Protein Mak16. Durch die stabilisierende Komplexbildung mit Rpf1 wurde ein wichtiger Grundstein geschaffen, um all die genannten und weiteren neu aufkommenden Aspekte zu untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

- Ahrens-Botzong, A.; Janthawornpong, K.; Wolny, J. A.; Tambou, E. N.; Rohmer, M.; Krasutsky, S. et al. (2011)** Biosynthesis of Isoprene Units: Mössbauer Spectroscopy of Substrate and Inhibitor Binding to the [4Fe-4S] Cluster of the LytB/IspH Enzyme. *Angew. Chem.* **123**, 12182–12185.
- An, Y.; Meresse, P.; Mas, P. J.; Hart, D. J. (2011)** CoESPRIT: a library-based construct screening method for identification and expression of soluble protein complexes. *PLoS one* **6**, e16261.
- Anthis, N. J.; Clore, G. M. (2013)** Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein science : a publication of the Protein Society* **22**, 851–858.
- Artz, J. H.; Mulder, D. W.; Ratzloff, M. W.; Lubner, C. E.; Zadvornyy, O. A.; LeVan, A. X. et al. (2017)** Reduction Potentials of FeFe-Hydrogenase Accessory Iron-Sulfur Clusters Provide Insights into the Energetics of Proton Reduction Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 9544–9550.
- Badalyan, A.; Yang, Z.-Y.; Seefeldt, L. C. (2019)** A Voltammetric Study of Nitrogenase Catalysis Using Electron Transfer Mediators. *ACS Catal.* **9**, 1366–1372.
- Baranovskiy, A. G.; Siebler, H. M.; Pavlov, Y. I.; Tahirov, T. H. (2018)** Iron-Sulfur Clusters in DNA Polymerases and Primases of Eukaryotes. *Methods in enzymology* **599**, 1–20.
- Bartels, P. L.; Stodola, J. L.; Burgers, P. M. J.; Barton, J. K. (2017)** A Redox Role for the 4Fe4S Cluster of Yeast DNA Polymerase  $\delta$ . *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18339–18348.
- Barton, J. K.; Silva, R. M. B.; O'Brien, E. (2019)** Redox Chemistry in the Genome: Emergence of the 4Fe4S Cofactor in Repair and Replication. *Annual review of biochemistry* **88**, 163–190.
- Baßler, J.; Hurt, E. (2019)** Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annual review of biochemistry* **88**, 281–306.
- Beinert, H. (1990)** Recent developments in the field of iron-sulfur proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **4**, 2483–2491.
- Beinert, H.; Holm, R. H.; Münck, E. (1997)** Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 653–659.
- Beißel, C.; Neumann, B.; Uhse, S.; Hampe, I.; Karki, P.; Krebber, H. (2019)** Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3. *Nucleic acids research* **47**, 4798–4813.
- Ben-Aroya, S.; Coombes, C.; Kwok, T.; O'Donnell, K. A.; Boeke, J. D.; Hieter, P. (2008)** Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **30**, 248–258.
- Benchouaia, M.; Ripoche, H.; Sissoko, M.; Thiébaut, A.; Merhej, J.; Delaveau, T. et al. (2018)** Comparative Transcriptomics Highlights New Features of the Iron Starvation Response in the Human Pathogen *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology* **9**, 2689.

- Benjdia, A.; Balty, C.; Berteau, O. (2017)** Radical SAM Enzymes in the Biosynthesis of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides (RiPPs). *Frontiers in chemistry* **5**, 87.
- Ben-Shem, A.; Garreau de Loubresse, N.; Melnikov, S.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. (2011)** The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 1524–1529.
- BIOVIA (2019)**: Discovery Studio Visualizer, San Diego: Dassault Systèmes. Version v19.1.0.18287.
- Bisbal, C.; Martinand, C.; Silhol, M.; Lebleu, B.; Salehzada, T. (1995)** Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13308–13317.
- Black, J. J.; Johnson, A. W. (2021)** Genetics animates structure: leveraging genetic interactions to study the dynamics of ribosome biogenesis. *Current genetics* **67**, 729–738.
- Boisvert, F.-M.; van Koningsbruggen, S.; Navascués, J.; Lamond, A. I. (2007)** The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 574–585.
- Braymer, J. J.; Lill, R. (2017)** Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **292**, 12754–12763.
- Broderick, J. B.; Duffus, B. R.; Duschene, K. S.; Shepard, E. M. (2014)** Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chemical reviews* **114**, 4229–4317.
- Brown, N. M.; Kennedy, M. C.; Antholine, W. E.; Eisenstein, R. S.; Walden, W. E. (2002)** Detection of a 3Fe-4S cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1. Insights into the mechanism of Fe-S cluster cycling. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7246–7254.
- Cammack, R.; Rao, K. K.; Hall, D. O. (1981)** Metalloproteins in the evolution of photosynthesis. *Bio Systems* **14**, 57–80.
- Card2Brain**: Mikroorganismen. Online verfügbar unter <https://card2brain.ch/box/mikroorganismen1>, zuletzt geprüft am 25.11.2021.
- Cech, T. R. (2000)** Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science (New York, N.Y.)* **289**, 878–879.
- Chen, J.; Zhang, L.; Ye, K. (2020)** Functional regions in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. *RNA (New York, N.Y.)* **26**, 866–877.
- Chen, W.; Xie, Z.; Yang, F.; Ye, K. (2017)** Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast. *Nucleic acids research* **45**, 6837–6847.
- Cho, A. K.; Sioutas, C.; Miguel, A. H.; Kumagai, Y.; Schmitz, D. A.; Singh, M. et al. (2005)** Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental research* **99**, 40–47.
- Chromas**: Version 2.6.6, Technelysium, Tewantin, Queensland, Australia.
- Compton, R. G.; Waller, A. M. (1988)**: ESR Spectroscopy of Electrode Processes. In: Robert James Gale (Hg.): Spectroelectrochemistry. Boston, MA: Springer US, 349–398.

- Constantinescu-Aruxandei, D.; Petrovic-Stojanovska, B.; Penedo, J. C.; White, M. F.; Naismith, J. H. (2016)** Mechanism of DNA loading by the DNA repair helicase XPD. *Nucleic acids research* **44**, 2806–2815.
- Criddle, D. N.; Gillies, S.; Baumgartner-Wilson, H. K.; Jaffar, M.; Chinje, E. C.; Passmore, S. et al. (2006)** Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *The Journal of biological chemistry* **281**, 40485–40492.
- Fernández-Pevida, A.; Kressler, D.; La Cruz, J. de (2015)** Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **6**, 191–209.
- Fontecave, M. (2006)** Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature chemical biology* **2**, 171–174.
- Francis, D. M.; Page, R. (2010)** Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science* **Chapter 5**, Unit 5.24.1-29.
- Fujii, M.; Adachi, N.; Shikatani, K.; Ayusawa, D. (2009)** FeFe-hydrogenase-like gene is involved in the regulation of sensitivity to oxygen in yeast and nematode. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **14**, 457–468.
- Fuss, J. O.; Tsai, C.-L.; Ishida, J. P.; Tainer, J. A. (2015)** Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochimica et biophysica acta* **1853**, 1253–1271.
- Gadal, O.; Strauss, D.; Kessl, J.; Trumpower, B.; Tollervey, D.; Hurt, E. (2001)** Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Molecular and cellular biology* **21**, 3405–3415.
- Gartenbista:** Indische Lotusblume. Online verfügbar unter <https://www.gartenbista.de/pflanzen/lotosblume-lotus-nelumbo-anzucht-aus-samen-pflege-9767>, zuletzt geprüft am 25.11.2021.
- Gómez Ramos, L. M.; Smeekens, J. M.; Kovacs, N. A.; Bowman, J. C.; Wartell, R. M.; Wu, R.; Williams, L. D. (2016)** Yeast rRNA Expansion Segments: Folding and Function. *Journal of molecular biology* **428**, 4048–4059.
- Gray, J. P.; Heck, D. E.; Mishin, V.; Smith, P. J. S.; Hong, J.-Y.; Thiruchelvam, M. et al. (2007)** Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H:paraquat oxidoreductase: identification of the enzyme as thioredoxin reductase. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7939–7949.
- Greth, C. (2018):** Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung. Dissertation. Fachbereich Chemie, RPTU.
- Haeusler, R. A.; Engelke, D. R. (2006)** Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic acids research* **34**, 4826–4836.
- Hage, A. E.; Tollervey, D. (2004)** A Surfeit of Factors: Why is Ribosome Assembly So Much More Complicated in Eukaryotes than Bacteria? *RNA Biology* **1**, 9–14.
- Hagedoorn, P.-L.; van der Weel, L.; Hagen, W. R. (2014)** EPR monitored redox titration of the cofactors of *Saccharomyces cerevisiae* Nar1. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e51611.

- Hein, N.; Hannan, K. M.; George, A. J.; Sanij, E.; Hannan, R. D. (2013)** The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in molecular medicine* **19**, 643–654.
- Hou, L.; Wei, Y.; Lin, Y.; Wang, X.; Lai, Y.; Yin, M. et al. (2020)** Concurrent binding to DNA and RNA facilitates the pluripotency reprogramming activity of Sox2. *Nucleic acids research* **48**, 3869–3887.
- Jacobson, M. R.; Cash, V. L.; Weiss, M. C.; Laird, N. F.; Newton, W. E.; Dean, D. R. (1989)** Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular & general genetics : MGG* **219**, 49–57.
- Jacquot (Hg.) (2018):** Iron–Sulfur Clusters in Chemistry and Biology Volume 2: Biochemistry, Biosynthesis and Human Diseases. Edited by Tracey Rouault. De Gruyter, Jacquot (74).
- Jain, R.; Aggarwal, A. K.; Rechkoblit, O. (2018)** Eukaryotic DNA polymerases. *Current opinion in structural biology* **53**, 77–87.
- Janke, C.; Magiera, M. M.; Rathfelder, N.; Taxis, C.; Reber, S.; Maekawa, H. et al. (2004)** A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962.
- Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K. (2005)** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* **74**, 247–281.
- Kargas, V.; Castro-Hartmann, P.; Escudero-Urquijo, N.; Dent, K.; Hilcenko, C.; Sailer, C. et al. (2019)** Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife* **8**.
- Kater, L.; Thoms, M.; Barrio-Garcia, C.; Cheng, J.; Ismail, S.; Ahmed, Y. L. et al. (2017)** Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell* **171**, 1599-1610.e14.
- Kehrer, J. P. (2000)** The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43–50.
- Khoroshilova, N.; Popescu, C.; Münck, E.; Beinert, H.; Kiley, P. J. (1997)** Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: 4Fe-4S to 2Fe-2S conversion with loss of biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6087–6092.
- Klinge, S.; Woolford, J. L. (2019)** Ribosome assembly coming into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **20**, 116–131.
- Koay, M. S.; Antonkine, M. L.; Gärtner, W.; Lubitz, W. (2008)** Modelling low-potential Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> clusters in proteins. *Chemistry & biodiversity* **5**, 1571–1587.
- Kobayashi, T. (2011)** Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 1395–1403.
- Konikkat, S.; Woolford, J. L. (2017)** Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *The Biochemical journal* **474**, 195–214.
- Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. (2017)** A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in biochemical sciences* **42**, 640–654.
- Kressler, D.; Roser, D.; Pertschy, B.; Hurt, E. (2008)** The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *The Journal of cell biology* **181**, 935–944.

- Kumar, M.; Gromiha, M. M.; Raghava, G. P. S. (2008)** Prediction of RNA binding sites in a protein using SVM and PSSM profile. *Proteins* **71**, 189–194.
- Landgraf, B. J.; McCarthy, E. L.; Booker, S. J. (2016)** Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Human Health and Disease. *Annual review of biochemistry* **85**, 485–514.
- Langner, L. (2018)**: Struktur- und Funktionsanalyse von Mak16, einem ribosomalen Assemblierungsfaktor in Hefezellen. Bachelorarbeit. Fachbereich Chemie, RPTU.
- Lascano, R.; Munoz, N.; Robert, G.; Rodriguez, M.; Melchiorre, M.; Trippi, V.; Quero, G. (2012)**: Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. In: Mohammed Nagib Hasaneen (Hg.): Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds: InTech.
- Lazizzera, B. A.; Beinert, H.; Khoroshilova, N.; Kennedy, M. C.; Kiley, P. J. (1996)** DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *The Journal of biological chemistry* **271**, 2762–2768.
- Lebaron, S.; Segerstolpe, A.; French, S. L.; Dudnakova, T.; Lima Alves, F. de; Granneman, S. et al. (2013)** Rrp5 binding at multiple sites coordinates pre-rRNA processing and assembly. *Molecular cell* **52**, 707–719.
- Leśniewska, E.; Boguta, M. (2017)** Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open biology* **7**.
- Lill, R. (2009)** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838.
- Lill, R. (2020)** From the discovery to molecular understanding of cellular iron-sulfur protein biogenesis. *Biological chemistry* **401**, 855–876.
- Lill, R.; Dutkiewicz, R.; Elsässer, H.-P.; Hausmann, A.; Netz, D. J. A.; Pierik, A. J. et al. (2006)** Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta* **1763**, 652–667.
- Ling, H.-Z.; Xu, S.-Z.; Leng, R.-X.; Wu, J.; Pan, H.-F.; Fan, Y.-G. et al. (2020)** Discovery of new serum biomarker panels for systemic lupus erythematosus diagnosis. *Rheumatology (Oxford, England)* **59**, 1416–1425.
- Link, T. A. (1999)** The Structures of Rieske and Rieske-Type Proteins **47**, 83–157.
- MacLeod, F.; Kindler, G. S.; Wong, H. L.; Chen, R.; Burns, B. P. (2019)** Asgard archaea: Diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. *AIMS microbiology* **5**, 48–61.
- Malkin, R.; Rabinowitz, J. C. (1966)** The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **23**, 822–827.
- Mapolelo, D. T.; Zhang, B.; Naik, S. G.; Huynh, B. H.; Johnson, M. K. (2012)** Spectroscopic and functional characterization of iron-sulfur cluster-bound forms of *Azotobacter vinelandii* (Nif)IscA. *Biochemistry* **51**, 8071–8084.
- Mayer, M. P.; Bukau, B. (2005)** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 670–684.
- Mendel, R. R.; Hercher, T. W.; Zupok, A.; Hasnat, M. A.; Leimkühler, S. (2020)** The Requirement of Inorganic Fe-S Clusters for the Biosynthesis of the Organometallic Molybdenum Cofactor. *Inorganics* **8**, 43.

- Meyer, J. (2008)** Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **13**, 157–170.
- Mortenson (1962)** An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **7**, 448–452.
- Moss, T.; Stefanovsky, V. Y. (2002)** At the Center of Eukaryotic Life. *Cell* **109**, 545–548.
- Mroczek, S.; Kufel, J. (2008)** Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. *Nucleic acids research* **36**, 2874–2888.
- Mukund, S.; Adams, M. W. (1990)** Characterization of a tungsten-iron-sulfur protein exhibiting novel spectroscopic and redox properties from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of biological chemistry* **265**, 11508–11516.
- Mumberg, D.; Müller, R.; Funk, M. (1994)** Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic acids research* **22**, 5767–5768.
- Netz, D. J. A.; Genau, H. M.; Weiler, B. D.; Bill, E.; Pierik, A. J.; Lill, R. (2016)** The conserved protein Dre2 uses essential 2Fe-2S and 4Fe-4S clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly. *The Biochemical journal* **473**, 2073–2085.
- Netz, D. J. A.; Pierik, A. J.; Stümpfig, M.; Bill, E.; Sharma, A. K.; Pallesen, L. J. et al. (2012)** A bridging 4Fe-4S cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 12365–12378.
- Netz, D. J. A.; Pierik, A. J.; Stümpfig, M.; Mühlenhoff, U.; Lill, R. (2007)** The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature chemical biology* **3**, 278–286.
- Netz, D. J. A.; Stith, C. M.; Stümpfig, M.; Köpf, G.; Vogel, D.; Genau, H. M. et al. (2011)** Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nature chemical biology* **8**, 125–132.
- Netz, D. J. A.; Stümpfig, M.; Doré, C.; Mühlenhoff, U.; Pierik, A. J.; Lill, R. (2010)** Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature chemical biology* **6**, 758–765.
- O'Brien, E.; Holt, M. E.; Salay, L. E.; Chazin, W. J.; Barton, J. K. (2018)** Substrate Binding Regulates Redox Signaling in Human DNA Primase. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17153–17162.
- O'Brien, E.; Holt, M. E.; Thompson, M. K.; Salay, L. E.; Ehlinger, A. C.; Chazin, W. J.; Barton, J. K. (2017)** The 4Fe4S cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. *Science (New York, N.Y.)* **355**.
- Oliveira, M. V. de; Oliveira, A. C. d. F.; Shida, C. S.; Oliveira, R. C. de; Nunes, L. R. (2013)** Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **60**, 101–109.
- Pandelia, M.-E.; Lanz, N. D.; Booker, S. J.; Krebs, C. (2015)** Mössbauer spectroscopy of Fe/S proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1853**, 1395–1405.
- Paul, V. D.; Lill, R. (2015a)** Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et biophysica acta* **1853**, 1528–1539.

- Paul, V. D.; Mühlenhoff, U.; Stümpfig, M.; Seebacher, J.; Kugler, K. G.; Renicke, C. et al. (2015b)** The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* **4**, e08231.
- Pellett, S.; Tracy, J. W. (2006)**: Mak16p is required for the maturation of 25S and 5.8S rRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast* (23), 495–506.
- Pierik, A. J.; Netz, D. J. A.; Lill, R. (2009)** Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nature protocols* **4**, 753–766.
- Ponchon, L.; Beauvais, G.; Nonin-Lecomte, S.; Dardel, F. (2009)** A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in *Escherichia coli* using a tRNA scaffold. *Nature protocols* **4**, 947–959.
- Ponchon, L.; Dardel, F. (2007)** Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nature methods* **4**, 571–576.
- Popescu, C. V.; Bates, D. M.; Beinert, H.; Münck, E.; Kiley, P. J. (1998)** Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13431–13435.
- Prindle, M. J.; Loeb, L. A. (2012)** DNA polymerase delta in DNA replication and genome maintenance. *Environmental and molecular mutagenesis* **53**, 666–682.
- Puig, S.; Ramos-Alonso, L.; Romero, A. M.; Martínez-Pastor, M. T. (2017)** The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics : integrated biometal science* **9**, 1483–1500.
- Py, B.; Barras, F. (2010)** Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 436–446.
- Raza, M.; Jeyachandran, V.; Bashir, S. (2024)** Investigating Iron-Sulfur Proteins in Infectious Diseases: A Review of Characterization Techniques. *Inorganics* **12**, 25.
- Ren, B.; Duan, X.; Ding, H. (2009)** Redox control of the DNA damage-inducible protein DinG helicase activity via its iron-sulfur cluster. *The Journal of biological chemistry* **284**, 4829–4835.
- Roche, B.; Aussel, L.; Ezraty, B.; Mandin, P.; Py, B.; Barras, F. (2013)** Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta* **1827**, 455–469.
- Roscoe, J. M.; Sevier, C. S. (2020)** Pathways for Sensing and Responding to Hydrogen Peroxide at the Endoplasmic Reticulum. *Cells* **9**.
- Rudolf, J.; Makrantonis, V.; Ingledew, W. J.; Stark, M. J. R.; White, M. F. (2006)** The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular cell* **23**, 801–808.
- Salim, D.; Bradford, W. D.; Freeland, A.; Cady, G.; Wang, J.; Pruitt, S. C.; Gerton, J. L. (2017)** DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. *PLoS genetics* **13**.
- Sanghai, Z. A.; Miller, L.; Molloy, K. R.; Barandun, J.; Hunziker, M.; Chaker-Margot, M. et al. (2018)** Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature* **556**, 126–129.
- Sanghai, Z. A.; Piwowarczyk, R.; Broeck, A. V.; Klinge, S. (2023a)** A co-transcriptional ribosome assembly checkpoint controls nascent large ribosomal subunit maturation. *Nature structural & molecular biology* **30**, 594–599.

- Sanghai, Z. A.; Piwowarczyk, R.; Broeck, A. V.; Klinge, S. (2023b)** Yeast co-transcriptional Noc1-Noc2 RNP assembly checkpoint intermediate.
- Sazanov, L. A.; Hinchliffe, P. (2006)** Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science (New York, N.Y.)* **311**, 1430–1436.
- Schmitt, M. J.; Breinig, F. (2002)** The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS microbiology reviews* **26**, 257–276.
- Sharma, K.; Tollervey, D. (1999)** Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA processing. *Molecular and cellular biology* **19**, 6012–6019.
- Shedlovskiy, D.; Zinskie, J. A.; Gardner, E.; Pestov, D. G.; Shcherbik, N. (2017)** Endonucleolytic cleavage in the expansion segment 7 of 25S rRNA is an early marker of low-level oxidative stress in yeast. *The Journal of biological chemistry* **292**, 18469–18485.
- Sherman, F. (2002)**: Getting started with yeast. In: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B, Bd. 350: Elsevier (Methods in Enzymology), 3–41.
- Spatzal, T.; Aksoyoglu, M.; Zhang, L.; Andrade, S. L. A.; Schleicher, E.; Weber, S. et al. (2011)** Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 940.
- Stehling, O.; Vashisht, A. A.; Mascarenhas, J.; Jonsson, Z. O.; Sharma, T.; Netz, D. J. A. et al. (2012)** MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 195–199.
- Stephens, P. J.; Jollie, D. R.; Warshel, A. (1996)** Protein Control of Redox Potentials of Ironminisulfur Proteins. *Chemical reviews* **96**, 2491–2514.
- Sterrett, M. C.; Enyenihi, L.; Leung, S. W.; Hess, L.; Strassler, S. E.; Farchi, D. et al. (2021)** A budding yeast model for human disease mutations in the EXOSC2 cap subunit of the RNA exosome complex. *RNA (New York, N.Y.)* **27**, 1046–1067.
- Summer, H.; Grämer, R.; Dröge, P. (2009)** Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Thomas, B. J.; Rothstein, R. (1989)** Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619–630.
- Thomson, E.; Ferreira-Cerca, S.; Hurt, E. (2013)** Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of cell science* **126**, 4815–4821.
- Thomson, E.; Tollervey, D. (2010)** The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **30**, 976–984.
- Ueda, C.; Langton, M.; Chen, J.; Pandelia, M.-E. (2022)** The HBx protein from hepatitis B virus coordinates a redox-active Fe-S cluster. *The Journal of biological chemistry* **298**, 101698.
- Vasquez, S.; Marquez, M. D.; Brignole, E. J.; Vo, A.; Kong, S.; Park, C. et al. (2023)** Structural and biochemical investigations of a HEAT-repeat protein involved in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway. *Communications biology* **6**, 1276.
- Vicuña, L.; Fernandez, M. I.; Vial, C.; Valdebenito, P.; Chaparro, E.; Espinoza, K. et al. (2019)** Adaptation to Extreme Environments in an Admixed Human Population from the Atacama Desert. *Genome biology and evolution* **11**, 2468–2479.

- Visentin, M.; Pagnoni, A.; Sarti, E.; Pietrogrande, M. C. (2016)** Urban PM2.5 oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **219**, 72–79.
- Welt.de:** Daran erkennst du, wie es einer Maus geht. Unter Mitarbeit von Getty Images/Robert Trevis-Smith. Online verfügbar unter <https://www.welt.de/kmpkt/article207452739/Gesichtsausdruck-einer-Maus-verraet-wie-es-ihr-geht.html>, zuletzt geprüft am 25.11.2021.
- Werst, M. M.; Kennedy, M. C.; Houseman, A. L.; Beinert, H.; Hoffman, B. M. (1990)** Characterization of the 4Fe-4S<sup>+</sup> cluster at the active site of aconitase by 57Fe, 33S, and 14N electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 10533–10540.
- Whiteley, H. R.; Woolfolk, C. A. (1962)** Ferredoxin-dependent reactions in *Micrococcus lactilyticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **9**, 517–522.
- Wickner, R. B. (1988)** Host function of MAK16: G1 arrest by a mak16 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6007–6011.
- Wickner, R. B.; Leibowitz, M. J. (1979)** Mak mutants of yeast: mapping and characterization. *Journal of bacteriology* **140**, 154–160.
- Wittmaack (Duppe), N. (2018):** Spektroskopische Charakterisierung der Homo sapiens Mak16 und Mak16-like Proteine von Loki- und Heimdallarchaen. Masterarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Woolford, J. L.; Baserga, S. J. (2013)** Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**, 643–681.
- Wootner, M.; Jaehning, J. A. (1990):** Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of biological chemistry* **265** (16), 8979–8982.
- Wu, Y.; Brosh, R. M. (2012)** DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic acids research* **40**, 4247–4260.
- Yarunin, A.; Panse, V. G.; Petfalski, E.; Dez, C.; Tollervey, D.; Hurt, E. C. (2005)** Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO journal* **24**, 580–588.
- Yu, S.-X.; Hu, L.-Q.; Yang, L.-H.; Zhang, T.; Dai, R.-B.; Zhang, Y.-J. et al. (2023)** RLI2 regulates Arabidopsis female gametophyte and embryo development by facilitating the assembly of the translational machinery. *Cell reports* **42**, 112741.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K.; Caceres, E. F.; Saw, J. H.; Bäckström, D.; Juzokaite, L.; Vancaester, E. et al. (2017)** Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* **541**, 353–358.
- Zhou, D.; Zhu, X.; Zheng, S.; Tan, D.; Dong, M.-Q.; Ye, K. (2019)** Cryo-EM structure of an early precursor of large ribosomal subunit reveals a half-assembled intermediate. *Protein & cell* **10**, 120–130.
- Zuker, M. (2003)** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406–3415.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei PD Dr. Daili J. A. Netz, meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der beträchtlichen Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete, bedanken. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder Austausch in Erinnerung bleiben.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Antonio J. Pierik für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Überlassung des interessanten Themas sowie notwendiger Quellen und Dokumente. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Ich danke Herrn Prof. Jörg Fahrer für die flexible, hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Ein großes Dankeschön gilt der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann, im besonderen Jonathan Oltmanns und Dr. Christina Müller, die die für diese Arbeit benötigten Messungen und anschließenden Simulationen der Mößbauerspektren durchgeführt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Laborgefährten und Freund Bazlur Rashid. Deine Unterstützung durch Worte und vor allem Taten trugen zum Erfolg dieser Arbeit bei. Danke für die schöne Arbeitsatmosphäre mit Dir.

Bei Kübra Nur möchte ich mich besonders herzlich für die schöne und produktive Zeit im Labor bedanken. Ich danke Dir, für Deine Hilfsbereitschaft, unseren stetigen Austausch und unsere Freundschaft.

Für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Messung der ESR-Spektren, möchte ich Bazlur Rahid und Jessica Sorares danken.

Ferner möchte ich mich bei Frau Doreen Knochenhauer für die Erledigung organisatorischer Aufgaben und der gentechnischen Unterstützung im Labor bedanken, sowie allen Mitarbeitern der Fachrichtung für die netten Gespräche und die lehrreiche Zeit.

## Danksagung

Mein herzlichstes Dankeschön gilt zu guter Letzt meiner Familie: meinen Schwiegereltern, meinem Schwager, meinen Großeltern und meinen Eltern.

Besonders meiner Mama bin ich unfassbar dankbar für Alles. Das Vertrauen und die Liebe, die Du in mich gesetzt hast, hat mich in den düstersten Momenten angetrieben und mir Kraft gegeben. Ohne Dich wäre das nicht möglich gewesen.

Ich möchte meinem Ehemann von ganzem Herzen danken. Deine unerschütterliche Unterstützung, dein Verständnis und deine Geduld während der gesamten Zeit unserer Dissertationen waren von unschätzbarem Wert. Du hast mir stets den Rücken freigehalten, mich in schwierigen Momenten motiviert und mir dabei geholfen, nie den Fokus zu verlieren. Deine Liebe und dein Vertrauen in mich, bedeuten mir alles. Liebe!

## Lebenslauf



### Kernkompetenzen

Hohe Standards  
 Projektleitung  
 Durchhaltevermögen  
 Teamfähig  
 Kommunikationsfähig

### Technische Fähigkeiten

DNA-Klonierung  
 PCR  
 Gel-Elektrophorese  
 RNA-Isolierung  
 Immunblot  
 Northern Blotting

### Sprachen

Englisch: B2  
 Spanisch: A2

### Interessen

Standardtanz, Malen, Fotografie,  
 Reisen, Bewegung in der Natur, Zeit  
 mit der Familie und Freunden

### Berufserfahrung

**10/2022 – heute** **Wissenschaftlerin in der Qualitätskontrolle RNA bei BioNTech IMFS, Vollzeit**

**03/2018 – 03/2025** **Promotion**  
**RPTU Kaiserslautern, Biochemie**  
 Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Pierik  
 „Untersuchung und Charakterisierung des ribosomalen Reifungsproteins Mak16 mit seinem Bindungspartner Rpf1“

“A non-canonical cytochrome c stimulates calcium binding by PilY1 for type IVa pili formation.”

M. Herfurth, A. Treuner-Lange, T. Glatter, N. Wittmaack, E. Hoiczky, A. J. Pierik, L. Sogaard-Andersen, *PNAS*, 2022, **119**, 6.

**04/2017 – 07/2017** **Auslandspraktikum**  
**Valencia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
 „Strategies to obtain iron-enriched yeasts“

L. Ramos-Alonso, N. Wittmaack, M.T. Martinez-Pastor und S. Puig, *Metallomics*, 2018, **10**, 1250.

### Ausbildung

**04/2016 – 03/2018** **Master of Science**  
**RPTU Kaiserslautern, Biochemie**  
 Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Pierik  
 „Spektroskopische Charakterisierung der Mak16-like Proteine von Menschen, Heimdall- und Lokiarchaen“

**10/2012 – 04/2016** **Bachelor of Science**  
**RPTU Kaiserslautern, Organische Chemie**  
 Arbeitskreis von Prof. Dr. Lukas J. Gooßen  
 “Entwicklung einer neuen Methode für die Synthese aromatischer Aryl-Aryl-Ketone mittels decarboxylierender Carbonylierung“

### Schulabschluss

**08/2004 – 06/2011** **Allgemeine Hochschulreife**  
**Goethe-Oberschule Berlin**  
 Leistungskurse: Biologie und Chemie

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Untersuchung und Charakterisierung des ribosomalen Reifungsproteins Mak16 mit seinem Bindungspartner Rpf1“**

selbstständig und ohne unerlaubte Zuhilfenahme Dritter und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die aufgeführten Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser, noch in einer ähnlichen Form, einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Kaiserslautern, den \_\_\_\_\_

---

(Nadine Duppe)