

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Å	1 Ångström = 0,1 nm
aa	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU <sub>260</sub>	Absorptions-Einheit bei 260 nm
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-di-methylammonio)-1-propane-sulfonate
<i>Cross-Link</i>	kovalente Verknüpfung von zwei Proteinen über ein bifunktionales quervernetzendes Reagenz ( <i>Cross-Linker</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGD1	β-NAC Homolog in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EGD2	α-NAC Homolog in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA-tag	kurzes fusioniertes Peptid (Y-P-Y-D-Y-P-D-Y-A) des Hämagglutinin
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterkrebs)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan sulfonsäure
His-tag	kurzes fusioniertes Peptid bestehend aus 6 aufeinander folgenden Histidinen
Hsp	Hitze Schock Protein ( <i>heat shock protein</i> )
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kryo-EM	Kryo-Elektronen-Mikroskopie
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	mol/l
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht [g/mol]
NAC	Nascent Polypeptide-Associated Complex
NAC-Domäne	Der am höchsten konservierte Kern-Bereich, den alle NAC Proteine besitzen, definiert nach der CDD (Conserved Domain Database).
α-NAC	α-Untereinheit des heterodimeren NAC
β-NAC	β-Untereinheit des heterodimeren NAC
aeNAC	archaebakterielles NAC Homolog
yNAC	heterodimeres Hefe NAC
NMR	kernmagnetische Resonanz
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	<i>Brookhaven Protein Data Bank</i>

PTH	Phenylthiohydantoin
RAC	Ribosome-Associated Complex
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNC	<i>Ribosome Nascent Chain Complex</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
S	Svedberg Einheit
SD-Medium	synthetisch definiertes Medium ( <i>Synthetic Defined</i> )
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunde
SR	SRP Rezeptor
SRP	Signal Recognition Particle
TF	Trigger Faktor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>temperature of melting</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> ) (Die Definition 1 U ist abhängig vom Enzym)
UBA-Domäne	Ubiquitin-Associated Domain
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
X xg	X-faches der Erdbeschleunigung

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	- 1 -
1.1	Proteinsynthese in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle ...	- 1 -
1.2	Schicksal der naszierenden Polypeptidkette in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle .....	- 5 -
1.2.1	Kotranslationale Ereignisse am Ribosom und der ribosomale Tunnelausgang .....	- 6 -
1.2.2	Proteinfaltung und Faltungshelfer in Prokaryonten und Eukaryonten .....	- 8 -
1.2.3	Ribosomen-assoziierte Chaperone am Tunnelausgang .....	- 10 -
1.3	Nascent Polypeptide-Associated Complex – NAC .....	- 15 -
1.3.1	NAC – heterodimerer Proteinkomplex am Ribosom.....	- 15 -
1.3.2	Funktion des heterodimeren NAC am Ribosom .....	- 20 -
1.3.3	Funktion der individuellen NAC Untereinheiten .....	- 24 -
1.3.4	Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC Homologs.....	- 25 -
1.4	Zielsetzung .....	- 28 -
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	- 29 -
2.1	Materialien .....	- 29 -
2.1.1	Geräte, Materialien und Kits .....	- 29 -
2.1.2	Proteine, Chemikalien und Enzyme.....	- 29 -
2.1.3	Cross-linking Reagenzien .....	- 31 -
2.1.4	Bakterienstämme .....	- 31 -
2.1.5	Hefestämme.....	- 32 -
2.1.6	Plasmide .....	- 32 -
2.1.7	Oligonukleotide .....	- 35 -
2.1.8	Antikörper.....	- 35 -
2.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	- 36 -
2.2.1	Generelle molekularbiologische Methoden.....	- 36 -
2.2.2	Anzucht von Zellen und Stammkonservierung .....	- 36 -
2.2.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	- 37 -
2.2.4	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 37 -
2.2.5	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	- 38 -
2.2.6	Positions-spezifische Mutagenese .....	- 38 -
2.2.7	Restriktion von DNA.....	- 38 -
2.2.8	DNA-Ligation.....	- 39 -
2.2.9	Präparation von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	- 39 -
2.2.10	Herstellung einer genomischen Deletionsmutante in <i>S. cerevisiae</i> .....	- 40 -
2.2.11	Mating, Sporulation und Tetraden-Analyse von <i>S. cerevisiae</i> .....	- 41 -
2.2.12	Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	- 42 -
2.2.13	Sequenzierung.....	- 42 -
2.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	- 42 -
2.3.1	Konzentrationsbestimmung .....	- 42 -
2.3.2	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese – SDS-PAGE .....	- 42 -
2.3.3	Western-Blot .....	- 43 -
2.3.4	Immunreaktion und Detektion von Antikörpern .....	- 43 -
2.3.5	TCA-Präzipitation von Proteinen .....	- 45 -

2.3.6	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	- 45 -
2.3.7	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	- 46 -
2.3.8	Proteinreinigung durch chromatographische Methoden .....	- 46 -
2.3.9	Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen .....	- 47 -
2.3.10	Protein-Totalextrakt aus Hefe .....	- 48 -
2.3.11	Präparation von 80S Ribosomen aus <i>S. cerevisiae</i> .....	- 49 -
2.3.12	Analytische Sedimentation von 80S Ribosomen aus <i>S. cerevisiae</i> .....	- 50 -
2.3.13	Ribosomen-Rückbindungstest .....	- 51 -
2.3.14	Sedimentation über Saccharose-Stufengradient .....	- 51 -
2.3.15	<i>In vitro</i> Transkription.....	- 52 -
2.3.16	<i>In vitro</i> Translation und Isolation von <i>Ribosome Nascent Chain Complexes</i> .....	- 52 -
<b>2.4</b>	<b><i>Cross-linking</i></b> .....	- 53 -
2.4.1	Photo- <i>Cross-linking</i> Nachweis .....	- 53 -
2.4.2	Chemisches <i>Cross-linking</i> .....	- 54 -
2.4.3	Positions-spezifisches <i>Cross-linking</i> .....	- 55 -
2.4.4	Präparative <i>Cross-linking</i> Ansätze und Reinigung.....	- 55 -
<b>2.5</b>	<b>Synthese und Analyse einer Zellulose-gebundenen Peptid-Bibliothek von rpL31</b> .....	- 56 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	- 58 -
<b>3.1</b>	<b>Homologe Expression von NAC in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	- 58 -
3.1.1	Klonierung und Expression von <i>egd2</i> und <i>egd1</i> .....	- 58 -
3.1.2	Vergleich der Assoziation mit Ribosomen .....	- 60 -
<b>3.2</b>	<b>Funktion der N-terminalen Sequenz von <math>\beta</math>-NAC bei der Assoziation mit Ribosomen</b> .....	- 62 -
<b>3.3</b>	<b><math>\beta</math>-NACs Assoziation mit Ribosomen ist übertragbar</b> .....	- 65 -
<b>3.4</b>	<b>Heterologe Expression von Hefe NAC in <i>E. coli</i></b> .....	- 67 -
3.4.1	Klonierung und Expression von <i>egd2</i> und <i>egd1</i> .....	- 67 -
3.4.2	Reinigung des rekombinanten Hefe wt NAC .....	- 67 -
3.4.3	Funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Hefe NAC .....	- 70 -
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der Bindung von NAC am Ribosom</b> .....	- 73 -
3.5.1	<i>Cross-linking</i> Studien mit rekombinanten Hefe wt NAC .....	- 73 -
3.5.2	<i>Cross-linking</i> Studien mit Hefe NAC EGD1 $\Delta$ 1-11.....	- 75 -
3.5.3	Positionsspezifische <i>Cross-linking</i> Studien vom N-Terminus von EGD1 .....	- 79 -
<b>3.6</b>	<b>Identifizierung der ribosomalen Bindungspartner</b> .....	- 81 -
3.6.1	Tests mit Antikörpern gegen ribosomale Proteine .....	- 81 -
3.6.2	Reinigung der <i>Cross-Link</i> Produkte .....	- 82 -
3.6.3	Präparative <i>Cross-linking</i> Ansätze und Edman-Sequenzierung.....	- 87 -
<b>3.7</b>	<b><math>\gamma</math>X15 ist das Cross-Link Produkt zwischen EGD1 und dem ribosomalen Protein rpL31</b> .....	- 91 -
<b>3.8</b>	<b>rpL31 ist sehr wahrscheinlich ein essentielles ribosomales Protein</b> ....	- 92 -
3.8.1	Deletion von rpL31 mittels homologer Rekombination .....	- 92 -
3.8.2	Analyse eines letalen Phänotyps mittels Tetraden-Analyse .....	- 93 -

<b>3.9</b>	<b>NAC kann nicht effizient mit Ribosomen aus Eubakterien assoziieren</b> .....	- 95 -
<b>3.10</b>	<b>Bindung von <math>\beta</math>-NAC an eine Peptid-Bibliothek von rpL31</b> .....	- 96 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	- 100 -
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	- 121 -
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	- 123 -
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	- 125 -
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	- 134 -
<b>8.1</b>	<b>Oligonukleotidsequenzen</b> .....	- 134 -
8.1.1	Oligonukleotide für die Klonierung der Expressionsplasmide .....	- 134 -
8.1.2	Oligonukleotide für die Herstellung einer rpL31-Nullmutante .....	- 138 -
8.1.3	Oligonukleotide für die Amplifizierung der Gene <i>rpL31a</i> und <i>rpL31b</i> .....	- 139 -
<b>8.2</b>	<b>Rückbindungstest von Hefe NAC an Ribosomen aus <i>E. coli</i></b> .....	- 139 -
<b>8.3</b>	<b>Sequenzvergleich von eukaryontischen rpL31 Homologen</b> .....	- 141 -
<b>9</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	- 142 -