

8 Anhang

8.1 Oligonukleotidsequenzen

8.1.1 Oligonukleotide für die Klonierung der Expressionsplasmide

pET28-yNAC

yβ fw (EcoRI): 5' – CCC CGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AG – 3'

yβ rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pET28-yNAC βΔ1-11

yβ Δ1-11 fw (EcoRI): 5' – CCC GAA TTC ATG CAA AAG TTG TCT GCT AAC AAC AAA GTT G – 3'

yβ rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pET20-yNAC

T7 fw: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TA – 3'

yβ ohne Stopp-Codon rev (XhoI): 5' – CCC CTC GAG TTC GAC GTC AGC ATC AAA AGT TTG AC – 3'

pET28-yNAC N-Strep α

yα Strep fw (NdeI): 5' – CGC GCG CCA TAT GTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA AAT GTC TGC TAT CCC AGA AAA CGC CAA CGT TAC C – 3'

pET-28a rev: 5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GCA G – 3'

pET28-yNAC C-Strep α

T7 fw: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TA – 3'

yα Strep rev (BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA TTT AGA CAA GGA CAT GAT AGC GTT G – 3'

pET28-yNAC C-c-myc α

T7 fw: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TA – 3'

yα c-myc rev (BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA CAG ATC TTC TTC GCT AAT CAG TTT CTG TTC TTT AGA CAA GGA CAT GAT AGC GTT G – 3'

pET28-yNAC C-Protein C α

T7 fw: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TA – 3'

yα Protein C rev (BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA TTT ACC ATC GAT CAG ACG CGG ATC AAC CTG ATC TTC TTT AGA CAA GGA CAT GAT AGC GTT G – 3'

pET28-yNAC C-Strep β

y β fw (EcoRI): 5' – CCC CGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AG – 3'

y β Strep rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC
ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pET28-yNAC C-c-myc β

y β fw (EcoRI): 5' – CCC CGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AG – 3'

y β c-myc rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ACA GAT CTT CTT CGC TAA TCA GTT
TCT GTT CTT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pET28-yNAC C-Protein C β

y β fw (EcoRI): 5' – CCC CGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AG – 3'

y β Protein C rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT TAC CAT CGA TCA GAC GCG
GAT CAA CCT GAT CTT CTT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pET28-yNAC β I3C

y β I3C fw: 5' – GGC TGC AGG AAT TCA TGC CAT GCG ACC AAG AAA AAT TAG CTA
AGC – 3'

y β I3C rev: 5' – GCT TAG CTA ATT TTT CTT GGT CGC ATG GCA TGA ATT CCT GCA
GCC – 3'

pET28-yNAC β Q5C

y β Q5C fw: 5' – CTG CAG GAA TTC ATG CCA ATT GAC TGC GAA AAA TTA GCT AAG
CTA C – 3'

y β Q5C rev: 5' – GTA GCT TAG CTA ATT TTT CGC AGT CAA TTG GCA TGA ATT CCT
GCA G – 3'

pET28-yNAC β K7C

y β K7C fw: 5' – GGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA ATG CTT AGC TAA GCT ACA
AAA GTT GTC TG – 3'

y β K7C rev: 5' – CAG ACA ACT TTT GTA GCT TAG CTA AGC ATT CTT GGT CAA TTG
GCA TGA ATT CC – 3'

pET28-yNAC β A9C

y β A9C fw: 5' – GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT ATG CAA GCT ACA AAA GTT GTC
TGC – 3'

y β A9C rev: 5' – GCA GAC AAC TTT TGT AGC TTG CAT AAT TTT TCT TGG TCA ATT
GGC – 3'

pET28-yNAC β L11C

y β L11C fw: 5' – GAC CAA GAA AAA TTA GCT AAG TGC CAA AAG TTG TCT GCT AAC
AAC – 3'

y β L11C rev: 5' – GTT GTT AGC AGA CAA CTT TTG GCA CTT AGC TAA TTT TTC TTG
GTC – 3'

pET28-yNAC α -BCCP

T7 fw: 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TA – 3'

y α BCCP rev: 5' – CGC TGC TGC TGG CGC TTC CAT GCC GCC TTT AGA CAA GGA
CAT GAT AGC GTT G – 3'

y α BCCP fw: 5' – GCT ATC ATG TCC TTG TCT AAA GGC GGC ATG GAA GCG CCA
GCA GCA GCG – 3'

BCCP rev (EcoRI): 5' – CCC GAA TTC TTA CTC GAT GAC GAC CAG CGG CTC – 3'

pET28-yNAC β -BCCP

y β fw (EcoRI): 5' – CCC CGA ATT CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AG – 3'

y β BCCP rev: 5' – CGC TGC TGC TGG CGC TTC CAT GCC GCC TTC GAC GTC AGC
ATC AAA AGT TTG AC – 3'

y β BCCP fw: 5' – GTC AAA CTT TTG ATG CTG ACG TCG AAG GCG GCA TGG AAG
CGC CAG CAG CAG CG – 3'

BCCP rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ACT CGA TGA CGA CCA GCG GCT C – 3'

pET28-rpL25

L25 fw (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GAT GGC TCC ATC TGG TAT GTG AAC TG – 3'

L25 rev (BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA AAT GTA ACC GAT TCT GTT AGC – 3'

L25 Δ Intron fw: 5' – CTA AGG CTA CTG CCG CTA AGA AAG CTG – 3'

L25 Δ Intron rev: 5' – CAG ATG GAG CCA TCT CGA GGG GGG – 3'

L25 fw (NdeI): 5' – CCC CCC CCA TAT GGC TCC ATC TGC TAA GGC TAC TGC – 3'

pET28-rpL35

L35 fw (NdeI): 5' – CCC CCC CCA TAT GGC CGG CGT TAA AGC TTA CGA AC – 3'

L35 rev (BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA AGC CTT GAT AGC GTA CTT TCT TTG TG – 3'

pET28-rpL19

L19 fw (NdeI): 5' – CCC CCC CCA TAT GGC TAA TTT ACG TAC TCA AAA GAG – 3'

L19 rev(BamHI): 5' – CCC GGA TCC TTA AGC GTC TTC CTT CAA TAA AGC ATC – 3'

pET28-rpL17

L17 fw (NdeI): 5' – CCC CCC CCA TAT GGC TCG CTA CGG TGC TAC TTC – 3'

L17 Exon1 rev: 5' – GTA CAA TTT AGT AGC ATC CAA ACC TTT AGC TTC AGC GTT
GGC AGC GGC GTT TTG CAA CAA AC – 3'

L17 Exon2 fw: 5' – CAA AAC GCC GCT GCC AAC GCT GAA GCT AAA GGT TTG GAT
GCT ACT AAA TTG TAC – 3'

L17 rev (EcoRI): 5' – CCC GAA TTC TTA AGC AGC AAT ACG CTT TTG GGC GG – 3'

pET28-rpL4

L4 fw (NdeI): 5' – CCC CCC CCA TAT GAG CCG TCC ACA AGT TAC TGT TCA CTC TTT G – 3'

L4 rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT AAT CGT GTT TCA AAG TTT CGG TGA AAA CAG – 3'

pYES-y α WT

y α Kozak fw (KpnI): 5' – CCC GGT ACC GCC ACC ATG TCT GCT ATC CCA GAA AAC GC – 3'

pET-28a rev: 5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GCA G – 3'

pRS425-y β WT

y β Kozak fw (HindIII): 5' – CCC CAA GCT TGC CAC CAT GCC AAT TGA CCA AGA AAA ATT AGC TAA GCT ACA AAA GTT GTC TGC TAA CAA CAA AGT TGG TGG TAC TAG AAG AAA ACT TAA CAA GAA GG – 3'

y β rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pRS425-y β Δ 1-11

y β D1-11 Kozak fw (HindIII): 5' – CCG GAA GCT TGC CAC CAT GCA AAA GTT GTC TGC TAA CAA CAA AGT TGG TG – 3'

y β rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pRS425-y β EKL/AAA

y β EKL/AAA Kozak fw (HindIII): 5' – CCC GAA GCT TGC CAC CAT GCC AAT TGA CCA AGC TGC TGC TGC TAA GCT ACA AAA GTT GTC TG – 3'

y β rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pRS425-y β KLQ/AAA

GAL1 fw: 5' – TTA ACG TCA AGG AGA AAA AAC CCC – 3'

y β KLQ/AAA rev: 5' - GTT AGC AGA CAA CTT AGC AGC AGC AGC TAA TTT TTC TTG GTC AAT TGG - 3'

y β KLQ/AAA fw: 5' - CAA GAA AAA TTA GCT GCT GCT GCT AAG TTG TCT GCT AAC AAC AAA GTT G - 3'

y β rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pYES HA-rpL31

L31B Exon2 fw: 5' – CTA CAT GGT GTC AGT TTC AAA AAG AGA G – 3'

L31B rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT AAG CAT CTT CTT CAA CGA CAA C – 3'

L31B HA Kozak fw (HindIII): 5' – CCC AAG CTT GCC ACC ATG GGC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT ATG GCC GGT TTA AAA GAC GTT GTC ACT CGT GAA TAC ACC ATC AAC TTG CAC AAA AGA CTA CAT GGT GTC AGT TTC AAA AAG AGA GCT CCA AGA GCT GTG AAG – 3'

pYES rpL31-HA

L31B Kozak fw (HindIII): 5' – CCC CAA GCT TGC CAC CAT GGC CGG TTT AAA AGA CGT TGT C – 3'

L31B HA rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT AAG CAT AAT CTG GAA CAT CAT ATG GAT AAG CAT CTT CTT CAA CGA CAA CG – 3'

pYES MBP

MBP Kozak fw (HindIII): 5' – CGC AAG CTT GCC ACC ATG GGT AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG – 3'

MBP rev (XhoI): 5' – GGGG CTC GAG TTA AGT CTG CGC GTC TTT CAG GG – 3'

pYES EGD1¹⁻¹⁴-MBP

EGD1 (L14) – MBP Kozak fw (HindIII): 5' – CGC AAG CTT GCC ACC ATG CCA ATT GAC CAA GAA AAA TTA GCT AAG CTA CAA AAG TTG GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT ATG AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG GTA ATC TG – 3'

yβ rev (XhoI): 5' – CCC CCT CGA GTT ATT CGA CGT CAG CAT CAA AAG TTT GAC – 3'

pYES EGD1¹⁻²³-MBP

GAL1 fw: 5' – TTA ACG TCA AGG AGA AAA AAC CCC – 3'

EGD1 (T23) – MBP rev: 5' – CAC CAC CAG AAC CAC CAC CAC CAG TAC CAC CAA CTT TGT TGT TAG C – 3'

EGD1 (T23) – MBP fw: 5' – GCT AAC AAC AAA GTT GGT GGT ACT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G – 3'

MBP rev (XhoI): 5' – GGGG CTC GAG TTA AGT CTG CGC GTC TTT CAG GG – 3'

pYES EGD1¹⁻³⁹-MBP

GAL1 fw: 5' – TTA ACG TCA AGG AGA AAA AAC CCC – 3'

EGD1 (K39) – MBP rev: 5' – CAC CAC CAG AAC CAC CAC CAC CCT TGT TGG CAC CGG CAG AAG AGC C – 3'

EGD1 (K39) – MBP fw: 5' – GGC TCT TCT GCC GGT GCC AAC AAG GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G – 3'

MBP rev (XhoI): 5' – GGGG CTC GAG TTA AGT CTG CGC GTC TTT CAG GG – 3'

8.1.2 Oligonukleotide für die Herstellung einer rpL31-Nullmutante

ΔrpL31A-HIS3 fw: 5' – ACT AGT GAT AAT TTC ATT CAA GTT TTA AAG AAA GAA TTA ATA AGC AAA CAG AAC TCA ATC AAA GGA AAA GCA GAT TGT ACT GAG AGT GCA C – 3'

ΔrpL31A-HIS3 rev: 5' – TAT ACA AAT CGA AAA TGT TTA CTT TAT ATT TAT TAA TAT AAA ATG AGT ATT ATT TTT ATT TAA TTG ATC CTT TCT CGC CAC GTT CGC CGG CTT TCC CC – 3'

8.1.3 Oligonukleotide für die Amplifizierung der Gene *rpl31a* und *rpl31b*

rpL31 fw: 5' – ATG GCC GGT TTG AAA GAC GTT GTC ACT C – 3'

rpL31 rev: 5' – AGC ATC TTC TTC GAC AAC AAC AGT TTG TAG AC – 3'

Mit Hilfe der Oligonukleotide lassen sich beide für rpL31 kodierenden Gene spezifisch amplifizieren. Anhand der unterschiedlich langen Intronsequenzen ist es möglich eine Unterscheidung zwischen *rpl31a* und *rpl31b* zu treffen.

8.2 Rückbindungstest von Hefe NAC an Ribosomen aus *E. coli*

In Eubakterien wie *Escherichia coli* gibt es kein NAC Homolog. So wurde im Rahmen dieser Arbeit auch festgestellt, dass rekombinantes Hefe wt NAC nicht so effizient an Ribosomen aus *E. coli* bindet, wie an Ribosomen aus *S. cerevisiae*. Da in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Wegrzyn *et al.* das gegenteilige Ergebnis präsentiert wurde (Wegrzyn *et al.*, 2006), welches allerdings auf die artifizielle Verstärkung eines N-terminalen His-tags an EGD2 zurückzuführen ist, soll dies im folgenden Vergleich noch mal verdeutlicht werden. Im Rückbindungstest wurde zum einen NAC ohne His-tag (yNAC) und zum anderen mit His-tag (yNAC His α) eingesetzt, jeweils in Kombination mit Ribosomen aus Hefe und aus *E. coli*. Nach Inkubation wurden die Ribosomen unter physiologischen Bedingungen durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Die Analyse der Überstände (S) und der Ribosomen-Pellets (P) erfolgte nach SDS-PAGE mittels Western-Blot mit Antiseren gegen EGD2 (α -NAC) und EGD1 (β -NAC) (Abbildung 52). Der Ansatz mit NAC ohne His-tag (yNAC) zeigt ganz deutlich, dass Hefe NAC nicht so effizient mit Ribosomen aus *E. coli* assoziiert, wie mit Hefe Ribosomen (52A; Spuren 4 und 6). Insbesondere EGD1 ist nur in extrem geringen Mengen im *E. coli* Ribosomen-Pellet nachzuweisen (52A; Spur 6). Wird der N-terminale His-tag an EGD2 jedoch nicht durch einen proteolytischen Verdau abgetrennt (yNAC His α), zeigt sich in der Analyse, dass Hefe NAC anscheinend vergleichbar an Ribosomen aus *E. coli* bindet (52B; Spuren 4 und 6). Der Vergleich verdeutlicht gut den Einfluss des His-tags bei der Assoziation von NAC mit Ribosomen. Außerdem zeigt er, dass sich das

heterologe System Hefe NAC in Kombination mit Ribosomen aus *E. coli* überhaupt nicht für Studien eignet.

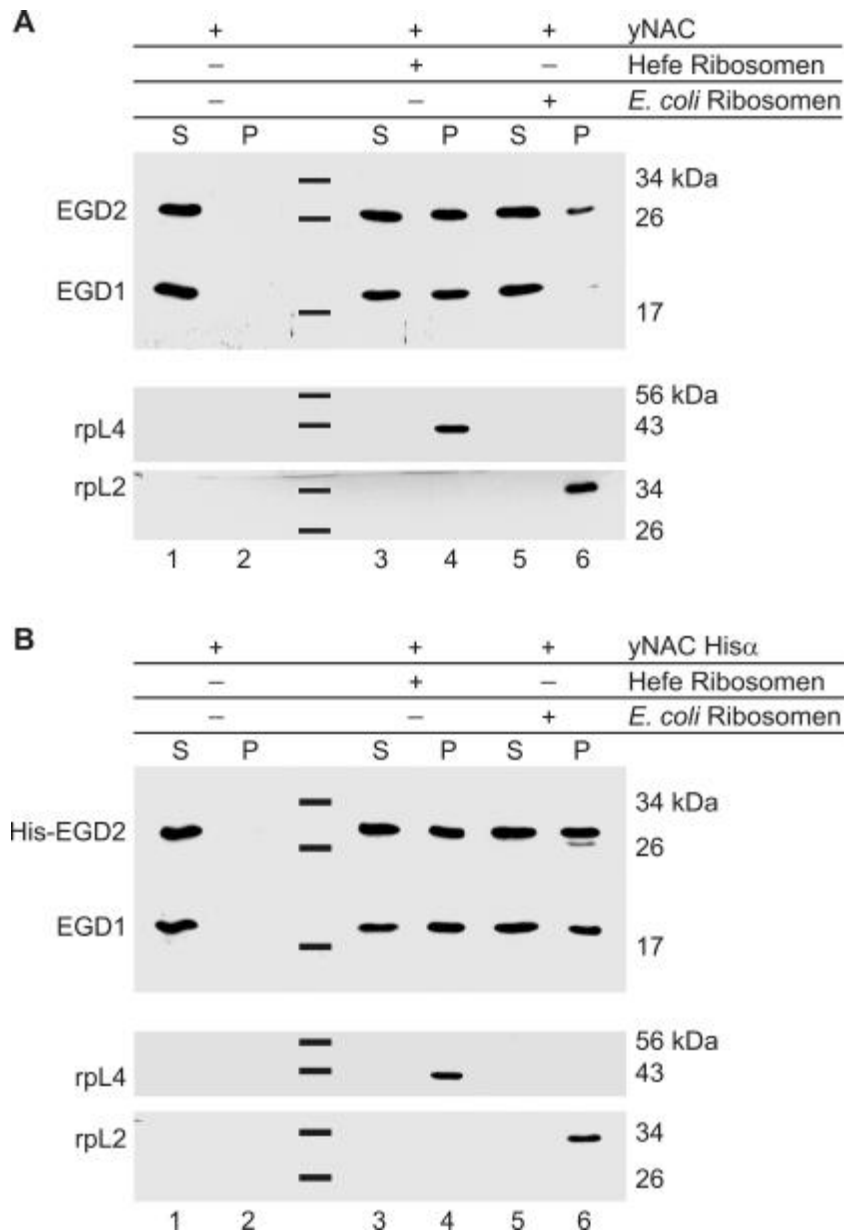


Abbildung 52 Vergleich der Assoziation von Hefe wt NAC **A** ohne His-tag (yNAC) und **B** mit His-tag (yNAC His α) an 80S Ribosomen aus *S. cerevisiae* und 70S Ribosomen aus *E. coli*. **A** Die Analyse zeigt deutlich, dass im *E. coli* Ribosomen-Pellet nur sehr geringe Mengen NAC nachweisbar sind (vergleiche Spuren 4 + 6). **B** Im Ansatz von yNAC His α führt die artifizielle Verstärkung des His-tags zu einer anscheinend vergleichbaren Assoziation an Ribosomen aus Hefe und *E. coli* (Spuren 4 + 6). Die Analyse des Western-Blots erfolgte mit Antiseren gegen EGD2 (α -NAC) und EGD1 (β -NAC). Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Ribosomen-Sedimentation wurde der untere Teil desselben Blots mit Antikörpern gegen die ribosomalen Proteine rpL4 (aus *S. cerevisiae*) bzw. rpL2 (aus *E. coli*) überprüft.

8.3 Sequenzvergleich von eukaryontischen rpL31 Homologen

In Abbildung 53 ist ein Sequenzvergleich von eukaryontischen rpL31 Homologen dargestellt. Darüber sind die in den Untersuchungen mit einer Peptid-Bibliothek von rpL31 aus *S. cerevisiae* identifizierten Peptid-Sequenzen (siehe 3.10), die wahrscheinlich an der Bindung von β -NAC beteiligt sind, schematisch illustriert. Die Pfeile (blau und rot) markieren die in den Modellen zum Bindungsmechanismus von β -NAC an rpL31 (siehe Abbildung 48) farbig hervorgehobenen positiv bzw. negativ geladenen Aminosäurereste.

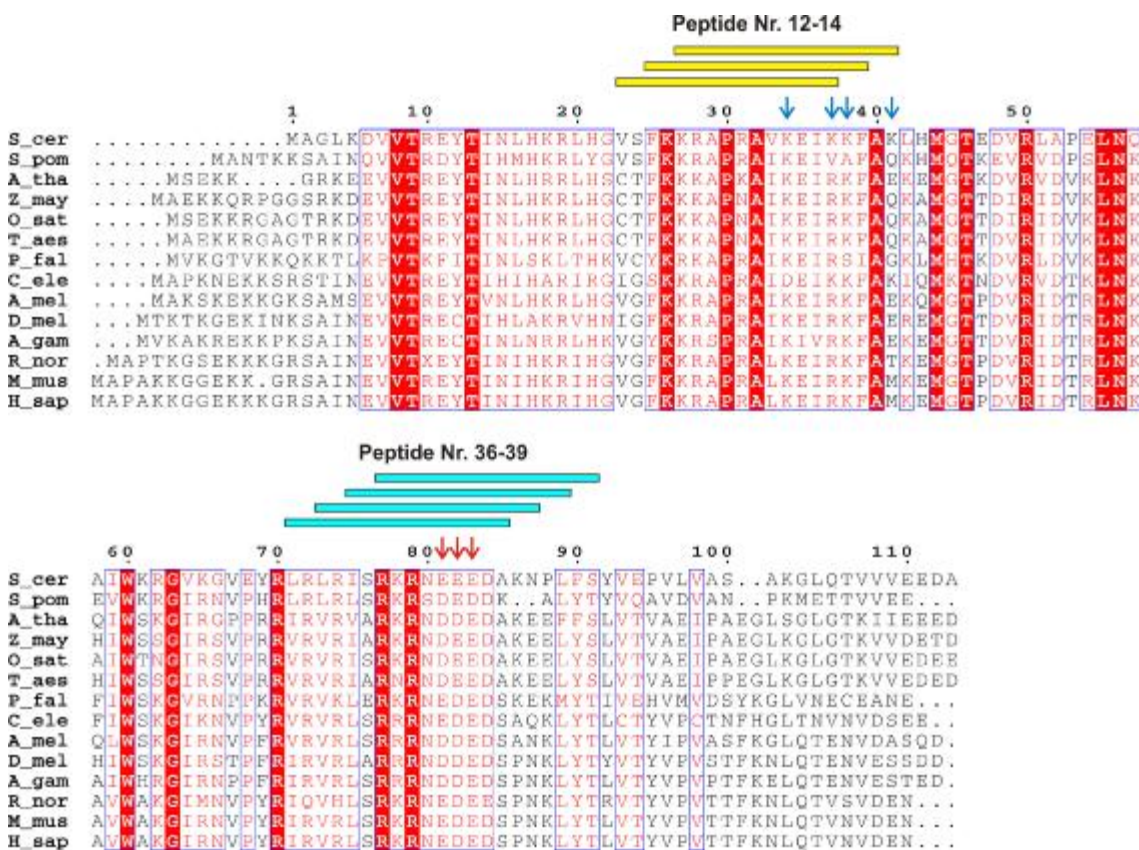


Abbildung 53 Sequenzvergleich von eukaryontischen rpL31 Homologen:

S_cer: *Saccharomyces cerevisiae*, # AAB82359; S_pom: *Schizosaccharomyces pombe*, # CAB63499; A_tha: *Arabidopsis thaliana*, # NP_194353; Z_may: *Zea mays*, # AAV28627; O_sat: *Oryza sativa*, # XP_467485; T_aes: *Triticum aestivum*, # TC240167; P_fal: *Plasmodium falciparum*, # CAD51403; C_ele: *Caenorhabditis elegans*, # CAB63331; A_mel: *Apis mellifera*, # XP_397314; D_mel: *Drosophila melanogaster*, # AAM71074; A_gam: *Anopheles gambiae*, # EAA00150; R_nor: *Rattus norvegicus*, # XP_578768; M_mus: *Mus musculus*, # XP_930429; H_sap: *Homo sapiens*, # NP_000984

Über alle Organismen konservierte Aminosäuren sind mit rotem Hintergrund, konservierte Aminosäureaustausche sind in Rot auf Weiß dargestellt. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTAL W 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) berechnet und mit ESPript 2.2 (Gouet *et al.*, 1999) unter Verwendung der Matrix BLOSUM62 bearbeitet.

9 Veröffentlichungen

Markus Pech, Thomas Spreter, Birgitta Beatrix. Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) binds via multiple contacts to the eukaryotic ribosome with Rpl31 providing the crucial contact site. *Manuscript in preparation*

Thomas Spreter, Markus Pech, Birgitta Beatrix. The Crystal Structure of Archaeal Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) Reveals a Unique Fold and the Presence of a Ubiquitin-associated Domain. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (16), 15849-15854

Thomas Spreter, Markus Pech, Birgitta Beatrix. The NAC domain of human Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) contacts the nascent chain on the ribosome. *Manuscript in preparation*

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Birgitta Beatrix für das gleichermaßen interessante wie auch herausfordernde Thema, sowie ihr Vertrauen und die freundliche und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Prof. Dr. Wolfram Saenger für das große Interesse an dem Thema und die Möglichkeit, die Arbeiten in seiner Gruppe durchzuführen.

Prof. Dr. Knud Nierhaus danke ich für die Übernahme des Koreferats und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Jana Bauer danke ich herzlich für ihren unermüdlichen Einsatz bei den zahlreichen Klonierungen und Proteinreinigungen, wie auch Clemens Langner für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe bei technischen Problemen und der Präparation von Ribosomen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Kollegen Dr. Thomas Spreter für die hilfreichen Gespräche, Diskussionen und Anregungen.

Dr. Werner Schröder danke ich für die prompte Synthese der zahlreichen Oligonukleotide und Claudia Alings für ihr exzellentes Gedächtnis.

Dr. Udo Schmidt danke ich für die Möglichkeit und die Hilfe bei der Durchführung der Tetraden-Analyse.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Saenger bedanken, die mir in den vergangenen Jahren in unterschiedlicher Art und Weise geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern und meiner Schwester für ihr großes Vertrauen und ihre Unterstützung, die sie mir gegeben haben.