

**Erste Kristallstrukturen des Nascent
Polypeptide-Associated Complex (NAC)**

-

Implikationen für die Funktion am Ribosom

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)**

Vorgelegt dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von Thomas Spreter von Kreudenstein
(geboren in Kiel)

Berlin, Januar 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2002 bis November 2005 unter Anleitung von Dr. Birgitta Beatrix und Prof. Dr. Wolfram Saenger am Institut für Chemie-Biochemie/Kristallographie der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger
2. Gutachter: Prof. Dr. Knud H. Nierhaus

Disputation am 23.02.2006

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	1 Ångström = 0,1 nm
ATP	Adenosintri-phosphat
Crosslink	kovalente Querverknüpfung von zwei Proteinen über ein bifunktionales quervernetzendes Agens (Crosslinker)
Cryo-EM	Cryo - <u>E</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
DLS	<u>D</u> ynamische <u>L</u> icht <u>s</u> treuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DnaK	Haupt- Hsp70 Chaperon in Eubakterien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintri-phosphat
HisTag	Kurzer N-terminaler Anhang bestehend aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinen
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HeLa Zellen	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterkrebs)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethan sulfonsäure
Hsp	Hitze Schock Protein (<i>heat shock protein</i>)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilo Dalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	mol/l
M _w	Molekulargewicht, g/mol
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite eines Vektors
MS	Massenspektrometrie
NAC	<u>N</u> ascent Polypeptide- <u>A</u> ssociated <u>C</u> omplex
NAC-Domäne	Der am höchsten konservierter Kern Bereich, den alle NAC Proteine besitzen, definiert nach der CDD (Conserved Domain Database)
αβ-NAC	heterodimeres NAC bestehend aus α- und β- Untereinheit
aeNAC	Archaeobakterielles NAC Homolog
Δ18-aeNAC	N-terminal verkürztes aeNAC, das kristallisiert wurde
ΔUBA-aeNAC	C-terminal verkürztes aeNAC, das um die UBA-Domäne (aa 75-117) verkürzt ist
N-terminal	Amino-terminal
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OB – Fold	<u>O</u> ligonucleotide/ <u>O</u> ligosachharide <u>B</u> inding – <u>F</u> old
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Brookhaven Protein Data Bank</i>
RBS	Ribosom-Bindungs-Stelle (<i>ribosome binding site</i>)
rmsd	Abweichung von der Wurzel des mittleren Fehlerquadrates (<u>r</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quare <u>d</u> eviation)
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <u>I</u> nterferenz

RNC	<i>R</i> ibosome <i>n</i> ascent- <i>c</i> hain <i>c</i> omplex
Seeding	Impfen
SRP	<u>S</u> ignal <u>r</u> ecognition <u>p</u> article
TF	<u>T</u> ri <u>g</u> ger <u>F</u> aktor
TF-BD	Trigger Faktor Ribosomen-Bindungs-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBA	Ubiquitin-associated (domain)
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
% (w/v)	x % (w/v) bedeutet x Gramm des Stoffes pro 100 ml fertige Lösung

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Proteinsynthese in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle	1
1.2	Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC).....	4
1.2.1	NAC – heterodimerer Komplex am Ribosom	4
1.2.2	Funktion des heterodimeren NAC am Ribosom	8
1.2.3	Funktionen der individuellen NAC Untereinheiten	12
1.3	Schicksal der naszierenden Polypeptidkette in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle - kotranslationale Ereignisse am Ribosom	14
1.3.1	Kotranslationale Ereignisse am Ribosom und der ribosomale Tunnelausgang.....	14
1.3.2	Proteinfaltung und Faltungshelfer in Prokaryonten und Eukaryonten	16
1.3.3	Ribosomen - assoziierte Chaperone am Tunnelausgang	18
1.4	Zielsetzung.....	24
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	25
2.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	27
2.2.1	Transformation und Stammkulturen	27
2.2.2	Plasmidpräparation und Sequenzierung.....	27
2.2.3	Planen von <i>primern</i> für die Mutagenese	28
2.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	28
2.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	28
2.2.6	Klonierung der verschiedenen NAC Konstrukte	28
2.3	Proteinpräparation	30
2.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	30
2.3.2	Expression und Reinigung von Selenomethionin-derivatisiertem Protein.....	31
2.3.3	Zellaufschluss	31
2.3.4	Proteinreinigung durch chromatographische Methoden	31
2.3.5	Konzentrieren von Proteinlösungen.....	32
2.4	Proteincharakterisierung	33
2.4.1	Konzentrationsbestimmungen.....	33
2.4.2	Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) und Isoelektrische Fokussierung (IEF)....	33
2.4.3	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
2.4.4	Dynamische Lichtstreuung	34
2.4.5	Circular Dichroismus - Spektroskopie.....	34
2.4.6	NMR – Spektroskopie (¹ HID – NMR)	35
2.4.7	Analytische Ultrazentrifugation	36
2.4.8	Limitierte Proteolyse.....	37
2.5	Biochemische Charakterisierung	37
2.5.1	Antikörper.....	37
2.5.2	<i>In vitro</i> Transkription, Translation und Isolierung von Ribosome Nascent Chain Complexes37	
2.5.3	Photoaktivierbarer Querverknüpfungs-Nachweis	38
2.5.4	Assoziation von aeNAC mit Ribosomen	38
2.6	Kristallisation.....	38
2.6.1	Mikro Seeding.....	39

2.7	Kristallographische Methoden	39
2.7.1	Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten	39
2.7.2	Indizierung und Integration der Diffraktionsdaten	40
2.7.3	Strukturbestimmung	40
2.7.4	Modellbau und Verfeinerung	42
2.7.5	Koordinatenanalyse und Abbildungen.....	43
2.8	Proteinstruktur Vorhersage	44
2.8.1	Vorhersage von intrinsisch ungeordneten Sequenzbereichen	44
2.8.2	Faltungserkennung und Homologie-Modellierung	44
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
3.1	Charakterisierung von heterodimerem eukaryontischem NAC	45
3.1.1	Expression und Reinigung von humanem und Hefe NAC	45
3.1.2	Eukaryontisches NAC ist intrinsisch ungeordnet	46
3.2	Identifikation und Charakterisierung eines archaebakteriellen NAC Homologs.....	51
3.2.1	Archaebakterielles α -NAC Homolog	51
3.2.2	Biochemische Charakterisierung	53
3.3	Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC aus <i>M. marburgensis</i>	55
3.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung eines löslichen aeNAC Konstruktes	55
3.3.2	Kristallisation von Δ 18-aeNAC und seinem Selenomethionin Derivat	56
3.3.3	Strukturbestimmung von Δ 18-aeNAC mit Se-MAD	58
3.3.4	Kristallstruktur von Δ 18-aeNAC	60
3.4	Implikationen der Kristallstruktur von aeNAC	64
3.4.1	Struktur - Funktions Analyse	64
3.4.2	Modell für wt - aeNAC	71
3.5	Kristallstruktur der konservierten NAC-Domäne von heterodimerem humanem $\alpha\beta$-NAC..	74
3.5.1	Expression, Reinigung und Kristallisation von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC.....	74
3.5.2	Kristallisation und Strukturbestimmung der heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC.....	77
3.5.3	Kristallstruktur der konservierten heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC.....	79
3.6	Implikationen der Kristallstruktur der humanen heterodimeren NAC-Domäne	84
3.6.1	Konservierung der Faltung und der Dimerisierung über die NAC-Domäne	84
3.6.2	Elektrostatische Oberfläche der NAC-Domäne	86
3.6.3	Konservierte hydrophobe Oberfläche der NAC-Domäne.....	88
3.7	Vergleich zum Trigger Faktor und Modell der NAC-Domäne am Ribosom	90
3.7.1	Vergleich zur Ribosomen-Bindungs-Domäne von Trigger Faktor	90
3.7.2	Modell der konservierten heterodimeren NAC-Domäne am Ribosom.....	96
3.7.3	Vergleich des Modells am Ribosom zu archaebakteriellem NAC.....	100
3.8	Modell für eukaryontisches wt - NAC	102
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	106
5	SUMMARY	108
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	109
7	ANHANG	118

7.1	Reinigung von heterodimerem humanem wt - NAC	118
7.2	Kristallisation von heterodimerem humanem wt NAC.....	120
7.3	Konservierung der hydrophoben Oberflächenreste in eukaryontischem und archaebakteriellem NAC.....	121
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	124