

7 Anhang

7.1 Reinigung von heterodimerem humanem wt - NAC

Im folgenden sind beispielhaft die Chromatogramme und SDS-PAGE Ergebnisse der Fraktionen für eine Reinigung von heterodimerem wt – NAC aus *H. sapiens* dargestellt. Nach dem Aufschluss wurde der Rohextrakt im ersten Schritt über Ni-Affinitätschromatographie (Ni-NTA, Qiagen) aufgetrennt und das vereinigte Eluat über Nacht bei 4°C mit Thrombin verdaut. Danach wurden die im folgenden illustrierten Schritte der Heparin Chromatographie (20HE, POROS), Anionen Austausch Chromatographie (PL-SAX, PolymerLabs) und Gelfiltration (S75, Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Fraktionen der Gelfiltration wurden vereinigt und für die weiteren Versuche verwendet.

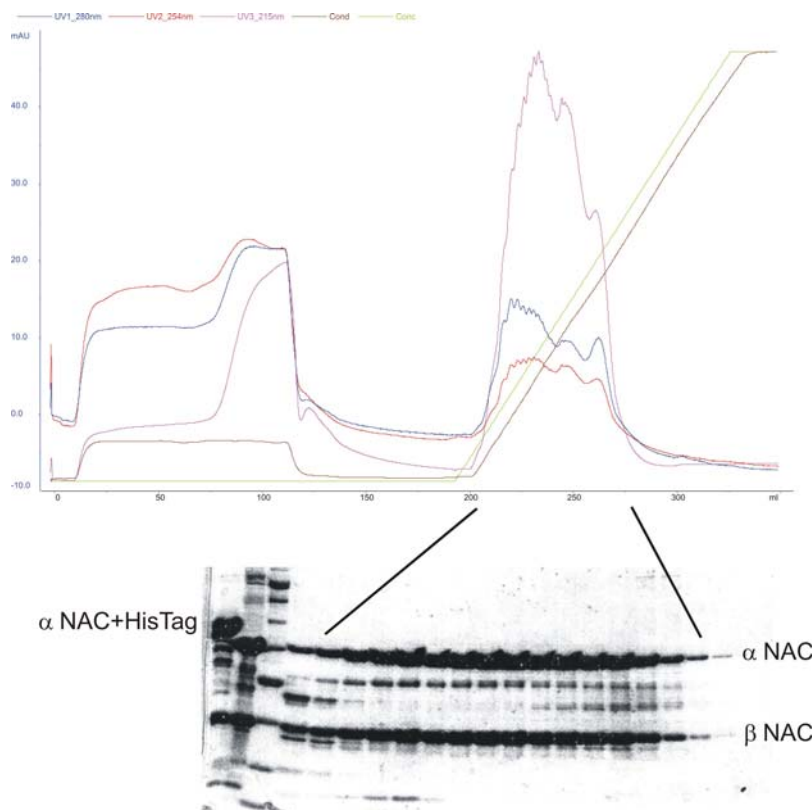


Abbildung 46 Heparin Chromatographie (20HE, POROS). Die Abbildung zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE Ergebnisse der jeweiligen Fraktionen. Markiert sind die Banden von α und β NAC. Die beiden ersten Spuren am linken Rand vor der Längenmarker Spur zeigt das Eluat der Ni-Affinitätssäule vor und nach dem Thrombinverdau. Verwendet wurden die folgenden Lösungen: Lösung A: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 ; 1 mM EDTA. Lösung B entspricht Lösung A plus 1 M NaCl.

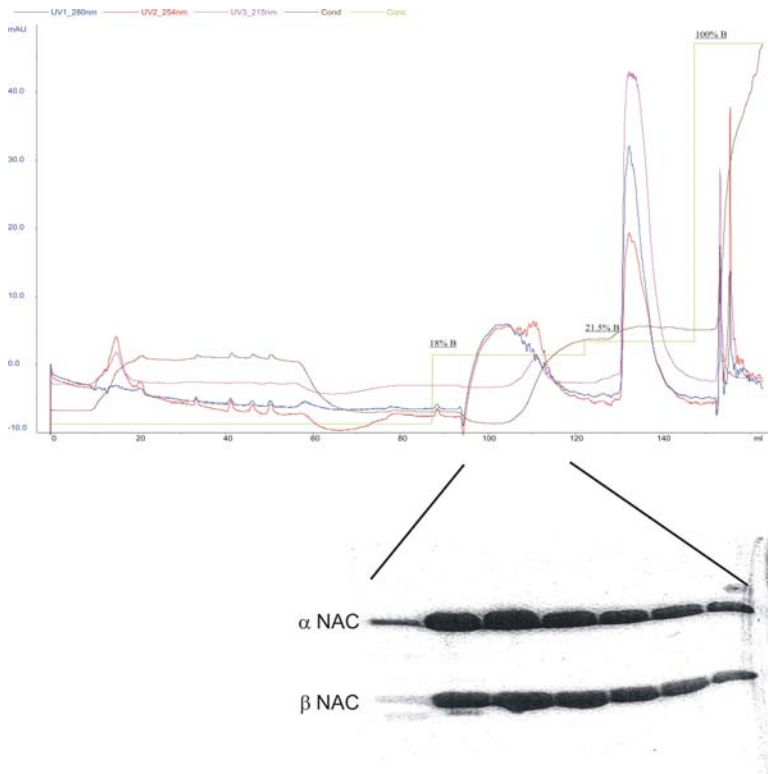


Abbildung 47 Anionen Austausch Chromatographie (PL-SAX, PolypmerLabs). Die Abbildung zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE Ergebnisse der jeweiligen Fraktionen. Markiert sind die Banden von α - und β -NAC. Die verwendeten Puffer entsprechen denen der Heparin Chromatographie.

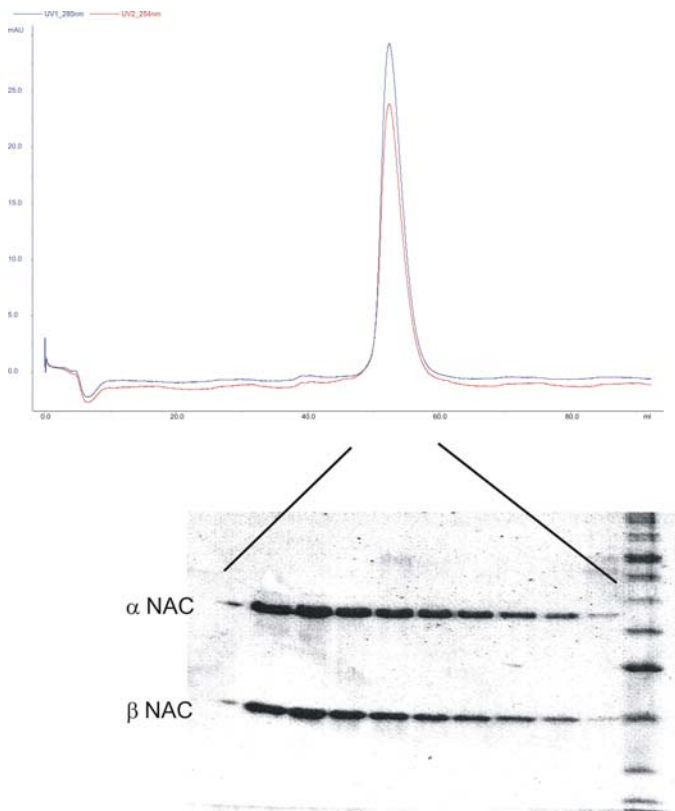


Abbildung 48 Gelfiltration (Superdex HiLoad S75, Amersham Biosciences). Verwendeter Puffer: 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA.

7.2 Kristallisation von heterodimerem humanem wt - NAC

In den Kristallisationsansätzen von heterodimeren wt – NAC zeigte sich in geringer Abhängigkeit zum Fällungsmittel entweder Phasenseparation, bzw. bei hoher Proteinkonzentration Ölbildung, bei der das Protein sich in einer eigenen flüssigen Phase anreicherte (Abbildung 49). Die separierte Proteinphase zeigte für einige Ansätze ein glasartiges Verhalten. Der in Abbildung 49 C gezeigte Feststoff enthält das Protein, zeigt kein kristallines Verhalten und beugt keine Röntgenstrahlung.

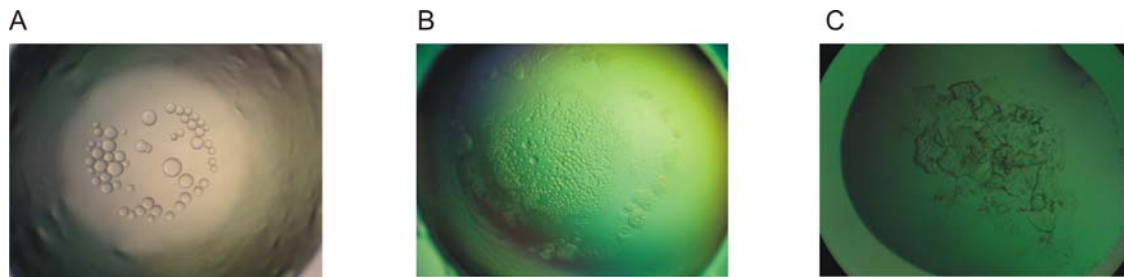


Abbildung 49 Kristallisationsphänomene von wt – NAC. Die Abbildungen A – C illustrieren das gängige Bild, das sich in Kristallisationsansätzen von humanem und Hefe NAC unabhängig von der Art des Fällungsmittels zeigte. **A** Phasenseparation oder Ölbildung **B** Phasenseparation und Niederschlag, der sich, wie in **C** gezeigt, als glasartiger Feststoff verhält.

7.3 Konservierung der hydrophoben Oberflächenreste in eukaryontischem und archaebakteriellem NAC

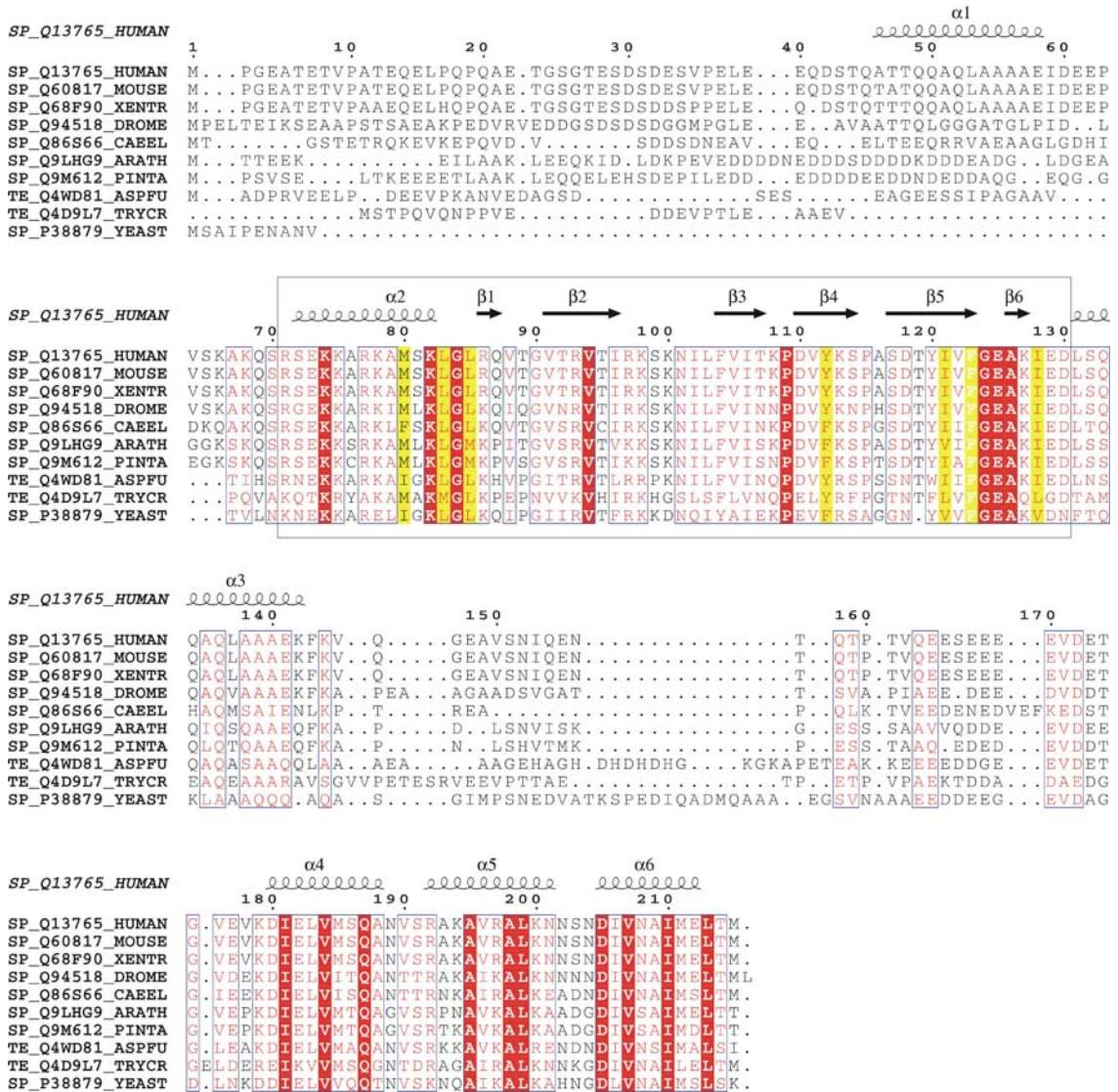


Abbildung 50 Sequenzvergleich des eukaryontischen α -NAC wie in Abbildung 39 gezeigt. Die in Abschnitt 3.6.3 erwähnten hydrophoben exponierten Seitenketten sind in Gelb dargestellt.

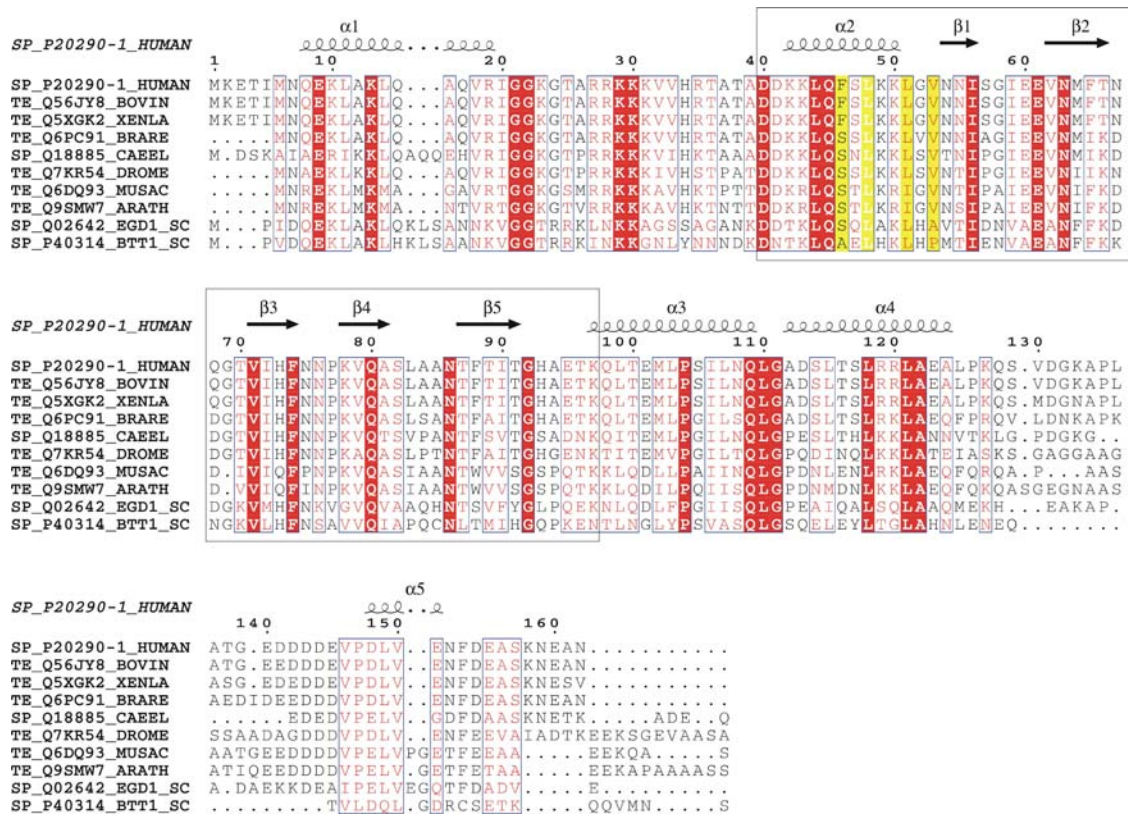
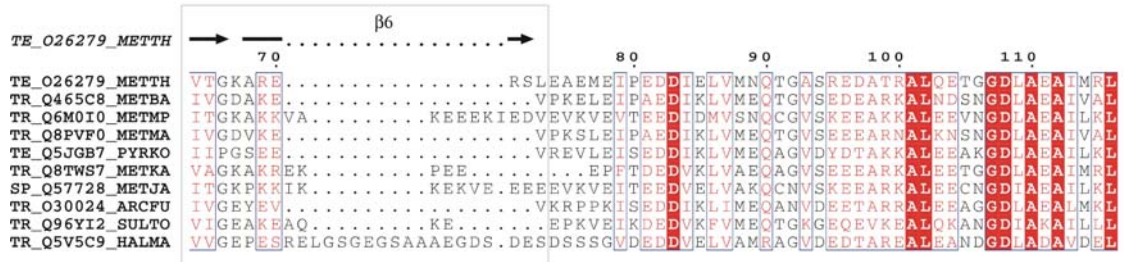
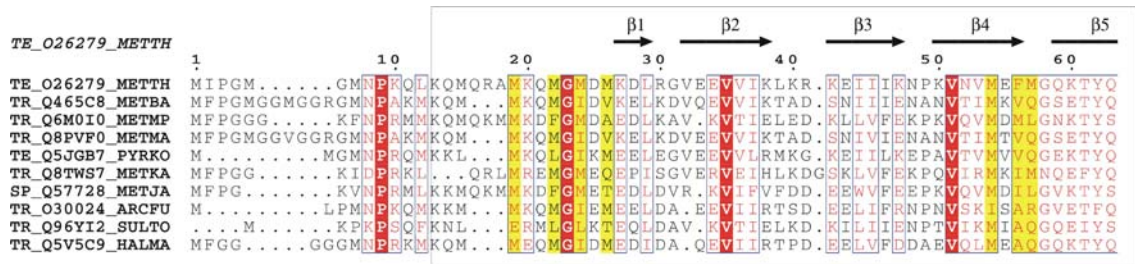


Abbildung 51 Sequenzvergleich des eukaryontischen β-NAC wie in Abbildung 39 gezeigt. Die in Abschnitt 3.6.3 erwähnten hydrophoben exponierten Seitenketten sind in Gelb dargestellt.



TE_026279_METTH

TE_026279_METTH	S
TR_Q465C8_METBA	S	SA.....
TR_Q6M0I0_METMP	G	N.....
TR_Q8PVP0_METMA	S	SA.....
TE_Q5JGB7_PYRKO	T	EG.....
TR_Q8TWS7_METKA	Q	GE.....
SP_Q57728_METJA	B	EEKEEN
TR_Q30024_ARCFU	Q	E.....
TR_Q96YI2_SULTO	T	GQET..
TR_Q5V5C9_HALMA	E

Abbildung 52

Sequenzvergleich des archaebakteriellen NAC wie in Abbildung 39 gezeigt. Die in Abschnitt 3.6.3 erwähnten hydrophoben exponierten Seitenketten sind in Gelb dargestellt.

8 Veröffentlichungen

Thomas Spreter, Markus Pech, Birgitta Beatrix. First Crystal Structure of the conserved heterodimeric NAC-domain of the Human Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC). *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

Markus Pech, Thomas Spreter, Birgitta Beatrix. Identification of the pivotal binding site of Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) on the eukaryotic ribosome. *Manuscript in preparation*

Hien Tran, Ann Kathrin Heroven, Lars Winkler, Thomas Spreter, Birgitta Beatrix, Petra Dersch. Dissection of RovA, a Transcriptional Regulator of *Yersinia Pseudotuberculosis* Virulence that acts through Antirepression and Direct Transcriptional Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (51), 42423-42432

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Birgitta Beatrix und Prof. Dr. Wolfram Saenger am Institut für Chemie-Biochemie/Kristallographie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Besonders danke ich meiner Betreuerin Dr. Birgitta Beatrix für das interessante und herausfordernde Thema, für ihre stete Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr Engagement.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Wolfram Saenger für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die Röntgenstrukturanalyse zu lernen, für seine Anregungen und für die optimalen kristallographischen Arbeitsbedingungen.

Bei Dr. Paola Fucini, Dr. Daniel Wilson und Dr. Frank Schlünzen bedanke ich mich herzlich für die interessante und anregende Kooperation zur Kokristallisation von NAC – Ribosom Komplexen und besonders dafür, dass sie mir die vorläufigen Daten der kokristallisierten Struktur zur Verfügung gestellt haben.

Timm Maier danke ich ganz besonders für seine stete Hilfe in der Lösung der kristallographischen Probleme und für seine vielen Anregungen und Hilfestellungen.

Clemens Langner danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Hilfe bei so einigen Proteinexpressionen und Reinigungen.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei meinen Freiburger Kollegen Wilhelm Weihofen und Bernhard Loll für ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei so manchem auftretenden Problem.

Markus Pech danke ich für die Hilfe in allen molekularbiologischen Fragen und Claudia Alings für ihre Anregungen und ihre Unterstützung in der Kristallisation. Bei Rita Diehl möchte ich für die gute Zusammenarbeit und so manche Protein-Präparation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe und ihren Mitarbeitern, die mich in den letzten dreieinhalb Jahre vielfältig unterstützt haben und die zusammen die Arbeitsgruppe zu einem besonderen und sehr angenehmen Ort des Arbeitens gemacht haben.

Prof. Dr. Oschkinat danke ich sehr für die unkomplizierte Aufnahme der NMR Spektren.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Behlke für die Durchführung und Auswertung der Analytischen Ultrazentrifugation.

Werner Schröder danke ich für die prompte Synthese unzähliger Oligonucleotide.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Frau und meinen Eltern für ihr unerschütterliches Vertrauen und ihr Verständnis danken.